

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 533 340**

51 Int. Cl.:

A01N 63/00

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.10.2010** **E 10768733 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.12.2014** **EP 2493317**

54 Título: **Tratamiento de plantas y simiente contra/en caso de un ataque por agentes bacterianos**

30 Prioridad:

28.10.2009 DE 102009051850

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

09.04.2015

73 Titular/es:

SOURCON-PADENA GMBH & CO. KG (100.0%)
Hechinger Strasse 262
72072 Tuebingen, DE

72 Inventor/es:

VOGT, WOLFGANG

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 533 340 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

Tratamiento de plantas y simiente contra/en caso de un ataque por agentes bacterianos

La presente invención se refiere al tratamiento de plantas o simiente contra/en caso de un ataque por el agente bacteriano *Erwinia carotovora*.

- 5 Las enfermedades vegetales causadas por bacterias se manifiestan a través de una serie de distintos síntomas. Las características más comunes son podredumbre, manchas foliares, el marchitamiento de hojas y vástagos, tumores cancerosos, podredumbre seca de hojas y ramas y la formación de agallas.

10 Una de las enfermedades vegetales bacterianas más conocidas es el "fuego bacteriano" causado por *Erwinia amylovora*, que infecta a muchos árboles ornamentales y frutales pertenecientes a las rosáceas, tales como manzanos y perales. Se cuenta entre las enfermedades vegetales cuya ocurrencia debe notificarse a las oficinas de protección fitosanitaria en Alemania y otros países debido a su peligro de infección y daño económico. El fuego bacteriano fue la primera enfermedad vegetal en la que se demostró que una bacteria era la causante. En los árboles atacados, las flores, hojas y ramas se ennegrecen y se marchitan. Con el tiempo, la enfermedad puede afectar a todo el árbol y hacerlo morir.

15 Otros ejemplos de enfermedades vegetales bacterianas son el llamado "pie negro" y la "podredumbre húmeda de los tubérculos", que atacan a las plantas de patata. El agente es la bacteria *Erwinia carotovora*, también denominada *Pectobacterium carotovorum*. A causa del pie negro se producen pérdidas de cosecha cuando una plantación tiene cerca de 15% de huecos. La podredumbre húmeda de los tubérculos es una de las enfermedades de almacenamiento más temidas. También se pueden presentar problemas importantes con patatas tempranas, en particular si el género con piel no adherente ha sido cosechado a temperaturas elevadas y se expone a grandes diferencias de temperatura a lo largo de la cadena de suministro hasta el consumidor. Esto conduce a la "formación de agua por trasudación", que favorece la aparición de la enfermedad. Las pérdidas en la mercancía almacenada pueden ocurrir con frecuencia en años con una segunda mitad de vegetación muy húmeda. Las patatas cultivadas en suelos pesados son afectadas más intensamente que las de ubicaciones más ligeras. Se producen pérdidas particularmente elevadas en el caso de encharcamientos. Se ha comprobado además que claramente surgen problemas con mayor frecuencia en el caso de una variedades particulares, por ejemplo en las "Nicola", "Satina" y "Adretta" que en el caso de otras variedades, por ejemplo "Solara".

20 Las enfermedades vegetales bacterianas se tratan a menudo con antibióticos. En una epidemia de fuego bacteriano acontecida en los años noventa del siglo XX en plantaciones hortícolas de la zona del lago Constanza se utilizó el antibiótico plantomicina o sulfato de estreptomicina. Sin embargo, el antibiótico en sí llegó a las abejas en busca de néctar, con lo cual la miel de las abejas quedó contaminada con el antibiótico, que de este modo entró en la cadena alimentaria. Por lo tanto, la plantomicina y otros antibióticos deben usarse sólo en casos particulares estrictamente controlados.

25 A esto se añade que el agente bacteriano desarrolla cada vez más resistencia contra antibióticos, haciendo ineficaz el tratamiento con esta clase de sustancias.

30 Para protegerlas contra un ataque bacteriano, a menudo se tratan las plantas o la simiente, por ejemplo las patatas de siembra, con soluciones de cobre. Sin embargo, se ha encontrado que es difícil controlar con aspersiones de cobre la infección primaria o del vástago, no sólo en el cultivo ecológico de la patata, sino también en el convencional. Además, el empleo de cobre conduce a una elevada contaminación del medio ambiente, por lo que la Comunidad Europea tiene la intención de minimizar el empleo de cobre.

35 En este contexto, la invención tiene como objetivo proporcionar una alternativa a los agentes actualmente utilizados para el tratamiento de enfermedades vegetales de origen bacteriano causadas por el agente *Erwinia carotovora* con la cual se pueda evitar o al menos reducir, preferiblemente, el uso de antibióticos y cobre.

Este objetivo se consigue mediante el uso de la bacteria *Pseudomonas sp. Proradix* (DSMZ 13134).

40 La cepa Proradix de *Pseudomonas*, que se depositó el 3 de noviembre de 1999 con el número de accesión DSM 13134 en el DSMZ, 38124 Braunschweig, Alemania, de acuerdo con el Tratado de Budapest, es una nueva especie dentro del grupo 1 de ARN de las *Pseudomonadaceae*. Aún no se ha llevado a cabo una asignación definitiva de Proradix, ya que sólo existe una similitud de secuencia relativamente pequeña con especies previamente descritas del género *Pseudomonas*.

45 La eficacia de la cepa Proradix de *Pseudomonas* contra un ataque de plantas o simiente por un agente bacteriano *Erwinia carotovora* era sorprendente y por tanto no de esperar.

La cepa de *Pseudomonas* depositada se describe con detalle en el documento WO 01/40441, al que con esto se hace referencia. Allí se describe un efecto de Proradix contra la podredumbre negra en la lechuga y la podredumbre parda en tubérculos de patata. Ambas enfermedades vegetales son provocadas por *Rhizoctonia solani*.

Rhizoctonia solani se cuenta entre los hongos verdaderos, y por tanto pertenece al reino de los hongos (Fungi). *Rhizoctonia* es la forma asexual de *Thanatephorus cucumeris* y es una especie de hongo ampliamente distribuida del grupo de los basidiomicetos. Entre los basidiomicetos se cuentan también hongos comestibles tan conocidos tales como el boleto y el champiñón.

- 5 Se afirma también en la bibliografía que se puede utilizar la cepa Proradix de *Pseudomonas* contra un ataque de plantas o simiente por el género *Fusarium* sp. *Fusarium* es asimismo un organismo perteneciente al reino de los hongos verdaderos, que puede provocar una multitud de enfermedades vegetales, que se denominan fusariosis.

Por tanto, basándose en los experimentos descritos en el documento WO 01/40441 y en el resto del estado de la técnica, un experto en la materia podría eventualmente suponer que la cepa Proradix de *Pseudomonas* podría ser

- 10 empleada para el tratamiento de plantas o simiente contra un ataque también por otros hongos.

Ha sido completamente sorprendente, sin embargo, el efecto positivo de Proradix sobre plantas o simiente en caso de un ataque por el agente bacteriano *Erwinia carotovora*.

- 15 Las bacterias se cuentan entre los procariotas, que están organizados de forma completamente diferente de los hongos, que se cuentan entre los eucariotas. En el caso de las células procariotas, el ADN no se halla en un núcleo celular, sino libre en el citoplasma. El ADN no contiene proteínas histonas, como las que en organismos superiores eucariotas están asociadas en los cromosomas con el ADN. Comparados con los procariotas, los eucariotas poseen ribosomas más pequeños. Además, contrariamente a los eucariotas, los procariotas no contienen orgánulos delimitados por membrana tales como plastos, cloroplastos y mitocondrias. Tampoco poseen aparato de Golgi, vacuolas ni retículo endoplasmático. Las paredes celulares, que a menudo representan un punto de ataque para
- 20 agentes fitoprotectores, son totalmente diferentes y están constituidas de forma más compleja que en el caso de los eucariotas.

En este contexto, se hubiera asumido que un agente eficaz contra hongos sería ineficaz en el caso de un ataque de plantas o simiente por un agente bacteriano.

La invención se resuelve por completo con la puesta a disposición de la cepa Proradix de *Pseudomonas*.

- 25 Con la cepa Proradix de *Pseudomonas* se pone a disposición por primera vez un agente que representa una alternativa verdadera a los antibióticos y el cobre. Así, los inventores han sido capaces de demostrar de manera concluyente en experimentos sobre tubérculos de patata que se pudo reducir claramente la incidencia de pie negro en plantas y vástagos, así como de podredumbre del tubérculo, en plantas tratadas con la cepa Proradix de *Pseudomonas* como agente único (monoterapia) frente a plantas no tratadas. En consecuencia, por medio de
- 30 Proradix se puede tratar efectivamente o bien prevenir una enfermedad vegetal causada por un agente bacteriano. Los efectos positivos de Proradix comprobados por los inventores son comparables a los que se pueden lograr mediante un tratamiento con cobre.

- 35 Como han podido comprobar los inventores, la cepa Proradix de *Pseudomonas* puede reducir claramente un ataque de plantas ya infectadas y por lo tanto es terapéuticamente eficaz. Sin embargo, Proradix también ha podido reducir claramente un ataque por agentes bacterianos a plantas o tubérculos no infectados, y así proteger el rendimiento de la cosecha mediante el crecimiento conjunto en la raíz.

De hecho, no se ha descrito hasta ahora en el estado de la técnica ninguna otra bacteria que proporcione resultados positivos comparables en caso o contra un ataque de plantas o simiente por un agente bacteriano.

El agente es una bacteria de la clase Gammaproteobacteria.

- 40 Esta medida tiene la ventaja de que se tratan específicamente aquellos agentes bacterianos que comprenden un gran número de patógenos importantes de plantas. Como han podido demostrar los inventores, la cepa Proradix de *Pseudomonas* muestra efecto óptimo precisamente en esta clase de bacterias.

El agente es *Erwinia carotovora*.

- 45 Esta medida tiene la ventaja de que se combate específicamente una de las especies más importantes de fitopatógenos dentro de las gammaproteobacterias. Los inventores han podido probar que Proradix protege eficazmente a patatas contra el pie negro o la podredumbre del tubérculo, provocados ambos por *Erwinia carotovora*.

En este contexto, es preferible que las plantas y/o la simiente sean las/la de la planta de patata (*Solanum tuberosum*).

- 50 Esta medida tiene la ventaja de que se puede proteger o tratar con eficacia una de las plantas de cultivo más importantes, de gran importancia económica, que muy a menudo es atacada por patógenos bacterianos. Como han podido demostrar los inventores, Proradix conduce precisamente en este caso a resultados particularmente buenos.

La cepa Proradix de *Pseudomonas* se puede utilizar en el marco de una monoterapia como único ingrediente activo, aunque también en combinación con otros ingredientes activos, tales como por ejemplo antibióticos. De este modo pueden producirse eventualmente efectos sinérgicos.

5 La cepa Proradix de *Pseudomonas* conforme a la invención se puede proporcionar en cualquier formulación, por ejemplo como solución o también como polvo. Tales formulaciones son conocidas para el técnico. En el documento WO 01/40441, al cual se hace explícitamente referencia, se ofrecen ejemplos de formulación. También son adecuadas las formulaciones puestas a disposición por la firma Sourcon-Padena GmbH & Co. KG, Tübinga, Alemania.

10 Se describe además un procedimiento para preparar un agente para el tratamiento de plantas y/o simiente contra/en el caso de un ataque por un agente bacteriano, con los siguientes pasos: (a) proporcionar la bacteria *Pseudomonas* sp. Proradix (DSMZ 13134) en una cantidad fitoterapéuticamente eficaz, (b) formular la bacteria del paso (a).

15 La invención se refiere además a un procedimiento para tratar plantas y/o simiente contra/en el caso de un ataque por el agente bacteriano *Erwinia carotovora*, con los siguientes pasos: (a) proporcionar plantas y/o simiente, (b) incubar las plantas/la simiente con una solución que contiene la bacteria *Pseudomonas* sp. Proradix (DSMZ 13134), siendo aplicada preferiblemente la solución mediante revestimiento, aspersión o tratamiento por inmersión de las plantas o la simiente.

Las características, ventajas y propiedades del uso conforme a la invención se aplican igualmente a los procedimientos conformes a la invención.

20 Se entiende que las características mencionadas en lo que antecede y las que aún se han de explicar en lo que sigue se pueden utilizar no sólo en la combinación indicada en cada caso, sino también en otras combinaciones o bien en solitario, sin salir del marco de la presente invención.

Se explica ahora con más detalle la invención por medio de ejemplos de realización, de los cuales se deducen otros objetos, características y ventajas. Los ejemplos de realización tienen fines ilustrativos y no limitan en ningún caso el alcance de la invención.

25 Ejemplo 1: Clasificación científica de la gammaproteobacteria *Erwinia carotovora*

	Clasificación:	Organismo
	Dominio:	Procaryota (bacterias)
	División:	Proteobacteria
	Clase:	Gammaproteobacteria
30	Orden:	Enterobacteriales
	Familia:	Enterobacteriaceae
	Género:	<i>Erwinia</i>
	Especie:	<i>Erwinia carotovora</i> (<i>Pectobacterium carotovorum</i>)

35 *Erwinia carotovora* pertenece por tanto a los procariotas o bacterias, pero no al reino de los hongos verdaderos (Fungi).

Por el contrario, el basidiomiceto *Rhizoctonia solani*, que se describe en el estado de la técnica como tratable con Proradix, se clasifica científicamente como sigue:

	Clasificación:	Organismo
	Dominio:	Eucaryota
40	Reino:	Hongos verdaderos (Fungi)
	División:	Basidiomycota
	Clase:	Basidiomycetes
	Orden:	Polyporales
	Familia:	Corticaceae
45	Género:	<i>Rhizoctonia</i>
	Especie:	<i>Rhizoctonia solani</i>

Rhizoctonia solani pertenece por tanto al reino de los hongos verdaderos y a la clase de los basidiomicetos, entre los que se cuentan también hongos comestibles tales como el champiñón o el boleto.

50 En el estado de la técnica está descrito, además, un efecto de Proradix contra *Fusarium*. *Fusarium* está clasificado científicamente como sigue:

	Clasificación:	Organismo
	Dominio:	Eucaryota
	Reino:	Hongos verdaderos (Fungi)
	División:	Ascomycota

Clase: Sordariomycetes
 Orden: Hypocreales
 Familia: Nectriaceae
 Género: *Fusarium*

5 También *Fusarium* pertenece por tanto a los hongos verdaderos.

Los inventores han podido así mostrar, de manera completamente sorprendente, que un ingrediente activo descrito hasta ahora sólo en relación con hongos verdaderos puede ser empleado también contra "no hongos" e incluso "no eucariotas", en concreto contra agentes bacterianos.

Ejemplo 2: Aislamiento de Proradix.

10 El aislamiento de la bacteria *Pseudomonas sp.* Proradix se describe con detalle en el documento WO 01/40441, en su Ejemplo 1. Se hace con esto explícitamente referencia y su descripción se incorpora a la descripción de la presente solicitud.

Ejemplo 3: Tratamiento de patatas contra pie negro con Proradix

15 Se revistieron con una solución de Proradix (Proradix®WG, Sourcon-Padena GmbH & Co. KG, Tubinga, Alemania) de acuerdo con las instrucciones del fabricante tubérculos de patata (*Solanum tuberosum*) de la variedad "Maxilla", que presenta una susceptibilidad de grado medio al ataque por *Erwinia sp.* (susceptibilidad 5). La concentración del revestimiento líquido acuoso era de unos 60 g de bacterias Proradix o bien 4×10^{12} UFC por 2.500 kg de tubérculos de patata.

20 En paralelo a ello, se revistieron como referencia tubérculos sanos de la misma variedad con una solución acuosa de cobre (Cuprozin®, Spiess-Urania Chemicals GmbH, Hamburgo, Alemania) según las instrucciones del fabricante. La concentración ascendía aproximadamente a 460,6 g de hidróxido de cobre por litro, lo que corresponde a aproximadamente 300 g de cobre puro por litro. Se aplicaron cerca de 0,4 litros de esta solución por hectárea o bien por aproximadamente 2.500 kg de tubérculos de patata. Sirvieron como testigo negativo tubérculos de patata no revestidos que habían sido asimismo infectados con *Erwinia carotovora*.

25 Para una mejor infección, se dejaron durante tres horas en una cámara húmeda los tubérculos así tratados e infectados. Después se plantaron los tubérculos en un invernadero en tierra de maceta prensada para hortalizas y se cultivaron en condiciones húmedas.

30 Aproximadamente 2 meses después de la plantación se determinó el número medio de tubérculos y la extensión del pie negro mediante recuento del número de plantas atacadas y vástagos atacados. El resultado se resume en la siguiente Tabla I.

Tabla I

Tratamiento	Número de tubérculos por planta	Pie negro (% de las plantas)	Pie negro (% de los vástagos)
Tubérculos no tratados	6,9	75	55,5
Tubérculos tratados con Proradix	8,0	65	42
Tubérculos tratados con cobre	8,9	57,5	35,3

35 Estos resultados muestran de manera concluyente que un tratamiento de tubérculos de patata con la bacteria *Pseudomonas sp.* Proradix conduce a una clara reducción del pie negro inducido por el agente bacteriano *Erwinia carotovora*, que es comparable a la que se logra mediante un tratamiento con cobre.

Ejemplo 4: Tratamiento de patata con Proradix contra podredumbre del tubérculo

40 Se revistieron en cada caso 30 tubérculos de patata de las variedades "Maxilla" y "Opal", como se ha indicado antes en el Ejemplo 3, con una solución de Proradix o bien con una solución de cobre. Contrariamente a la variedad "Maxilla", la variedad "Opal" tiene una baja susceptibilidad frente a la podredumbre del tubérculo (susceptibilidad 3). Como testigos negativos, se dejaron sin tratar 30 tubérculos de ambas especies. Se pesaron los tubérculos. A continuación se practicaron lesiones en los tubérculos y se infectaron con *Erwinia carotovora*. Para una mejor infección, se incubaron durante cinco días en una cámara húmeda los tubérculos así tratados e infectados.

Posteriormente, se lavó y se pesó la fracción con podredumbre. Después de ello se determinó la fracción porcentual de masa de tubérculo atacada por *Erwinia carotovora*. El resultado se resume en la siguiente Tabla II.

45

Tabla II

Tratamiento	Variantes de ejecución			Fracción de masa de tubérculo atacada por <i>Erwinia carotovora</i> (%)	
				Variedad	
				Opal	Maxilla
sin tratar		producción de lesiones	infección	25,0	64,0
Proradix	tratamiento	producción de lesiones	infección	13,4	32,0
cobre	tratamiento	producción de lesiones	infección	8,6	19,0

Este experimento prueba de manera concluyente que Proradix también es capaz, en diferentes variedades de patata, de tratar terapéuticamente una podredumbre del tubérculo inducida por *Erwinia carotovora* o bien proteger contra una podredumbre del tubérculo.

Conclusión:

Los inventores han podido probar, sorprendentemente, que la cepa Proradix de *Pseudomonas*, que hasta la fecha sólo ha sido descrita para el tratamiento de enfermedades vegetales causadas por hongos, puede ser empleada con éxito para el tratamiento de plantas y/o simiente que sean atacadas por un agente bacteriano. Esto se ha podido demostrar, por ejemplo, en *Erwinia carotovora* y la patata. La cepa Proradix de *Pseudomonas* puede ser proporcionada como una solución. La solución se puede emplear directamente para el tratamiento de las plantas y/o simiente en forma de aspersión, revestimiento o mediante tratamiento por inmersión. También se puede secar a vacío la solución, con lo cual se disuelve en agua antes de su uso el polvo obtenido.

REIVINDICACIONES

1. Uso de la bacteria *Pseudomonas sp.* Proradix (DSMZ 13134) para el tratamiento de plantas y/o simiente contra/en caso de un ataque por el agente bacteriano, *Erwinia carotovora*.
- 5 2. Uso según la reivindicación 1, caracterizado porque las plantas y/o la simiente son las/la de la planta de patata (*Solanum tuberosum*).
3. Uso según la reivindicación 2, caracterizado porque el tratamiento de las plantas y/o la simiente se realiza contra/en caso de pie negro.
4. Procedimiento para tratar plantas y/o simiente contra/en caso de un ataque por el agente bacteriano *Erwinia carotovora*, con los siguientes pasos:
 - 10 (a) proporcionar plantas y/o simiente,
 - (b) incubar las plantas/la simiente con una solución que contiene la bacteria *Pseudomonas sp.* Proradix (DSMZ 13134).
5. Procedimiento según la reivindicación 4, caracterizado porque en el paso (b) la solución se aplica mediante revestimiento, aspersión o tratamiento por inmersión de las plantas/la simiente.