

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 610 359**

51 Int. Cl.:

A01N 63/00 (2006.01)

C12N 1/20 (2006.01)

C12R 1/125 (2006.01)

C12R 1/10 (2006.01)

A01P 5/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.08.2011 PCT/EP2011/063685**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.02.2012 WO12020014**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.08.2011 E 11740944 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.11.2016 EP 2603086**

54 Título: **Composición nematocida que comprende Bacillus subtilis y Bacillus licheniformis**

30 Prioridad:

10.08.2010 EP 10172373

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

27.04.2017

73 Titular/es:

CHR. HANSEN A/S (100.0%)

Boege Allé 10-12

2970 Hoersholm, DK

72 Inventor/es:

ALESSANDRI, ABILIO;

KNAP, INGE y

SEKITO DE FREITAS ZAMBELLI, LUCIANA

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 610 359 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

Composición nematicida que comprende *Bacillus subtilis* y *Bacillus licheniformis*

5 Resumen de la invención

[0001] La presente invención se refiere a una composición que comprende un *Bacillus subtilis* que tiene las características de la cepa depositada como DSM 17231 y un *Bacillus licheniformis* que tiene las características de la cepa depositada como DSM 17236 con efecto nematicida contra los fitonematodos en plantas y/o su hábitat, a su uso, a un proceso para su preparación, a procesos para controlar, combatir y/o conferir resistencia específica a fitonematodos incluyendo la composición, y a un kit.

Campo de la invención

15 [0002] La intensificación de la actividad agrícola ha provocado un desequilibrio ecológico, haciendo necesario usar productos selectivos que no afecten al equilibrio entre plagas y sus depredadores, parasitoides y patógenos, responsables de gran parte del control biológico natural, ya que ellos retienen niveles de población de plagas aceptable (DENT, D., Insect pest management. Cambridge: Cabi Bioscience 2000).

20 [0003] Para invertir esta situación, se recomienda desarrollar programas para la gestión de plagas integrada, definidos como un sistema de decisión para el uso de tácticas de control, individualmente o combinados armoniosamente en una estrategia de gestión basada en el coste / beneficio que tiene en cuenta el interés y / o impacto en agricultores, sociedad y medio ambiente.

25 Entre las medidas de control disponibles para estos sistemas de gestión están los nematodos entomopatogénicos y parasitoides de insectos, que cubren diferentes áreas de control de plagas biológicas.

En el contexto actual de una sociedad moderna y ecológica, que se preocupa por con la preservación del medio ambiente, el control biológico se considera una alternativa atractiva y/o complementaria a los métodos convencionales de control.

30 El control biológico es el uso de un organismo (depredador, parásito o patógeno) que ataca a otro organismo que causa daño económico a los cultivos.

Esta es una estrategia muy común en sistemas agroecológicos, así como en la agricultura convencional que confía en la gestión integrada de plagas (GIP).

35 [0004] Aunque el control biológico conlleva respuestas positivas en la reducción o retirada del uso de pesticida y en la mejora de los beneficios de los agricultores, el análisis del conjunto de experimentos a nivel mundial muestra que los resultados siguen concentrados en sólo unos pocos cultivos.

Todavía hay mucho que desarrollar en las áreas de control de plagas y enfermedades.

40 [0005] Se ha puesto un gran énfasis en la investigación del control biológico con el uso de bacterias que colonizan las raíces de plantas, llamadas rizobacterias.

Las rizobacterias beneficiosas para promover el crecimiento y / o actuar en el control biológico de bacterias patógenas de plantas son denominadas rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal o PGPR.

45 Las PGPR aumentan la disponibilidad de nutrientes para la planta y pueden producir combinaciones y concentraciones de sustancias que promueven el crecimiento.

Sin embargo, el efecto principal de estas rizobacterias es suprimir patógenos de planta deletéreos para el crecimiento de estas plantas.

50 La inhibición de estas bacterias nocivas es a través de la producción de sideróforos, sustancias que actúan bajo condiciones de baja disponibilidad de fósforo reduciendo el fósforo disponible para otros microorganismos de la rizosfera o la producción de antibióticos.

Estado de la técnica

[0006] La presión de la sociedad para reemplazar los nematicidas con productos aceptables para el medioambiente o técnicas ecológicas ha fomentado la búsqueda de métodos alternativos para controlar los nematodos.

55 En este contexto, el control biológico ha sido considerado como una de las alternativas dentro de un método integrado, en el que se busca asegurar el desarrollo sostenible de agricultura.

El uso de enemigos naturales se ha convertido un campo de investigación, que puede actuar para reducir poblaciones de nematodos por debajo del nivel de umbral de daño económico.

60 [0007] Los riesgos para los seres humanos y el medio ambiente presentados usando pesticidas sintéticos enfatizan la necesidad de herramientas tales como el control biológico para optimizar sistemas agrícolas sostenibles.

La solicitud de patente europea EP 0705807A1 se refiere a una preparación bacteriana para el acondicionamiento del suelo que comprende bacterias del género *Bacillus*, tales como *Bacillus subtilis* y *Bacillus licheniformis*.

65 Se menciona brevemente en la página 30, líneas 23-25, que la preparación puede evitar el daño a las raíces de plantas de cultivo provocadas por nematodos.

Sin embargo, la preparación exacta a la que se hace referencia no se especifica y no se proporciona ningún dato en

absoluto.

[0008] La solicitud de patente brasileña BR PI 0604602-9A se refiere al uso de un *Bacillus subtilis* conjuntamente con *Bacillus licheniformis* para el control de fitonematodos.

5 No se menciona ninguna cepa específica y no se proporciona ningún dato.

[0009] Siddiqui y Mahmood (1999) describen el papel de las bacterias en la gestión de nematodos parasitarios de plantas.

10 Las tablas 7 y 8 resumen los resultados de 8 estudios diferentes que demuestran que *Bacillus subtilis* y *Bacillus licheniformis* pueden ser útiles contra los fitonematodos, tal como *Meloidogyne spp.*, *Heterodera spp.* y *Rotylenchulus*.

Ninguna de las combinaciones de *B. licheniformis* y *Bacillus subtilis* se describe.

[0010] Zaid, K.A. et al. (2009) describe la actividad nematocida de una cepa de *B. Subtilis* designada ARC-BS.7 y una cepa de *B. Licheniformans* BL-ATCC.1480 contra *M. Incognita*.

15 No se describe ninguna combinación.

[0011] Shahnaz Dawar et al. (2008) describe el efecto de la cepa de *B. subtilis* Bs-12 contra *M. javanica*.

20 [0012] Li Bin et al., (2005) describe cuatro cepas de *B. Subtilis* (B5, B7, B8, y B2) que mostraron una fuerte actividad nematocida al matar las larvas del segundo estadio de *M. Javanica* a grados variables en el invernadero.

[0013] Zaki et al., (2009) describe los efectos de *B. Subtilis* (Ehrenberg) Cohn contra *M. Incognita*.

25 [0014] Los inventores de la presente invención han procedido a la selección e investigación exhaustiva para resolver el objeto de proporcionar métodos biológicos de control de nematodos basados en la identificación de dos cepas de tipo salvaje de *Bacillus subtilis* y *Bacillus licheniformis*, que son particularmente capaces de reducir los daños a las raíces de plantas de cultivo provocados por nematodos.

30 Breve descripción de los dibujos

[0015]

Figura 1 - flujo de las condiciones de funcionamiento de los procesos de fabricación de mezcla.

Figura 2 - porcentaje de inhibición de movimiento de juveniles después del efecto de productos biológicos.

35 A: *Meloidogyne incognita*; B: *M. javanica*, C: *M. Paranaensis*.

Figura 3 - porcentaje de inhibición de la eclosión después del efecto de productos biológicos. A: *Meloidogyne incognita*; B: *M. javanica*, C: *M. Paranaensis*.

40 Figura 4 - número medio de juveniles del segundo estadio de *Meloidogyne exigua* penetrados, porcentajes de penetración e inhibición de penetración en raíces de tomate. "Santa Cruz Kada Gigante", tres semanas después de la inoculación.

Descripción detallada de la invención

Rizobacterias

45 [0016] Los suelos son el hogar de una comunidad biológica compleja, de la cual microorganismos, procariontes y eucariotas forman una mayoría, tanto en número como en diversidad.

Algunas procariontes tienen nichos ecológicos como la rizosfera, y/o el rizoplaneo de plantas, donde se multiplican, sobreviven y se protegen del resto de la acción antagonística de la microflora de la tierra.

50 Estos organismos han sido genéricamente denominados rizobacterias.

[0017] En asociación con plantas, las rizobacterias pueden tener un efecto deletéreo, nulo o beneficioso.

Las que ejercen un efecto beneficioso - estimulación del crecimiento y control biológico de enfermedades - son denominadas PGPR (rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal)

55 Se estima que solo 0,6 % de las rizobacterias tienen algún efecto beneficioso para la planta a la cual están asociadas.

Las PGPR como agentes de control biológico

60 [0018] Las PGPR han sido usadas para el control biológico de enfermedades de las plantas y aumentan así la productividad de los cultivos.

Cómo y por qué se lleva a cabo este control biológico sigue siendo un tema que necesita estudios complementarios.

65 [0019] En algunas situaciones es posible que el control biológico ocurra por antagonismo directo ejercido por PGPR contra el patógeno, con implicación de los mecanismos conocidos de antibiosis: producción de sustancias antimicrobianas, parasitismo directo, competición por nutrientes y nichos ecológicos.

La investigación ha demostrado que ciertas PGPR parecen actuar de elicitor de ISR (resistencia sistémica inducida), en el sentido de que la planta se vuelve protegida sistémicamente contra más de un patógeno, a diferencia del control biológico tradicional, que pretende implementar el control más específicamente.

5 [0020] Cuando las PGPR colonizan el sistema de raíz, las moléculas constituyentes de la célula bacteriana o sintetizadas por ésta hacen de elicitors de una señal bioquímica. Esta señal se transloca a sitios distantes desde su sitio de origen. Los genes que codifican la síntesis de componentes de la resistencia dinámica son desactivados y expresados en la resistencia sistémica inducida.

10 [0021] Algunas rizobacterias producen metabolitos tóxicos que afectan al movimiento de los nematodos *in vitro*, mientras que otras inhiben la eclosión de juveniles y el proceso por el que éstos penetran en las raíces.

Efecto de las rizobacterias en nematodos parasitarios de plantas

15 [0022] El control que las rizobacterias ejercen en los nematodos se puede implementar de varias maneras y puede afectar a estadios diferentes del ciclo de vida del nematodo:

- Huevo: los antibióticos y toxinas producidos por bacterias de la rizosfera se diseminan en la tierra y pueden ser absorbidos por los huevos de los nematodos, matando las células y evitando su desarrollo embrionario.
- 20 – Eclosión: las rizobacterias degradan los exudados de la raíz que actúan como factor de eclosión para muchas especies de nematodos y luego existe la posibilidad de que los compuestos absorbidos por el huevo de nematodo inactiven o causen una deformación durante el desarrollo que evite la eclosión.
- Direccionamiento y movilidad: la transformación de exudados de la raíz en los subproductos metabólicos de las rizobacterias puede hacer que el nematodo sencillamente no reconozca el estímulo quimiotrópico, así que éste seguiría moviéndose de forma aleatoria, y finalmente agotaría su reserva de energía y moriría sin entrar en la raíz. Si el nematodo reconoce los exudados de la raíz y se mueve hacia las raíces, algunos productos bacterianos pueden presentar características nematostáticas y reducir la movilidad del nematodo para impedir que éste alcance la raíz.
- 25 – Reconocimiento del huésped: las sustancias producidas por las rizobacterias son absorbidas por las raíces y pueden alterar su composición química, haciendo que los nematodos no reconozcan a su huésped. También se cree que las rizobacterias se unen a lectinas en la superficie de las raíces, caracterizada por ser el sitio de unión entre el nematodo y su huésped vegetal, evitando así el reconocimiento.
- Penetración en la raíz: la toxina o repelente producido por las rizobacterias en alta concentración en la región del rizoplano o en el contenido celular de la epidermis de las raíces puede desfavorecer la penetración de nematodos en la planta huésped.
- 30 – Alimento: las rizobacterias, o sus productos metabólicos, se pueden absorber por la planta y estos últimos, para percibir la presencia del nematodo, desencadenan una reacción hipersensible en las células gigantes, que es el mecanismo principal de resistencia del huésped contra nematodos del género *Meloidogyne*. Esta resistencia, llamada resistencia sistémica, no es intrínseca a la planta, es decir, es una reacción que se induce en ésta por la presencia de PGPR.
- 35 – Reproducción: algunas rizobacterias tienen un efecto mayor en la reducción de huevos que en la reducción del número de gallas, esto puede ser uno de los mecanismos operativos.

El entorno de la rizosfera

45 [0023] Uno de los métodos más convenientes de introducción de una rizobacteria en el entorno de la raíz es a través de su aplicación en las semillas antes de la siembra. El proceso de germinación de las semillas libera carbohidratos y aminoácidos en abundancia en forma de exudados de semilla.

50 Así, estos organismos introducidos con las semillas en la tierra utilizan exudados como fuente de nutrición y colonizan las raíces a medida que emergen. Las rizobacterias aisladas que tienen una capacidad superior para utilizar exudados de raíz de semillas pueden tener una ventaja selectiva en la colonización de raíces.

55 [0024] Las rizobacterias del género *Bacillus* han sido asociadas con el control de nematodos. Sikora, R.A. (Interrelationship between plant health promoting rhizobacteria, plant parasitic nematodes and soil microorganisms. Medicine Faculty Landbouww Rijksuniv Gent, Landbouww, v.53, n.2b, p. 867-878, 1988) observó reducciones en la infección de *Meloidogyne arenaria*, *M. Incognita* y *Rotylenchulus reniformis* de alrededor del 60-65% con tratamiento de semillas de varias plantas de cultivo con una cepa de *Bacillus*.

60 Ventajas de las rizobacterias para aplicación comercial

[0025] Las rizobacterias tienen varias ventajas respecto a los nematicidas o incluso respecto a otros agentes de control biológico: son fáciles de producir masivamente, son fáciles de almacenar, son adaptables a la tecnología de formulación y no requieren ninguna manipulación genética.

65

[0026] Las rizobacterias se pueden aplicar por tratamiento del sustrato, inmersión de los sistemas de raíz de plántulas en suspensiones bacterianas, riego de la planta con suspensión bacteriana por inmersión de las semillas en suspensión de rizobacterias o por aplicación de PGPR con la granulación de semillas en alginato.

5

Bacterias del género *Bacillus*

[0027] Las especies de *Bacillus* son bacterias gram-positivas caracterizadas porque tienen paredes celulares gruesas y por la ausencia de membranas externas, lo que difiere de las bacterias gram-negativas. Gran parte de las paredes de las bacterias gram-positivas está compuesta de peptidoglicano.

10

[0028] Las especies gram-positivas se dividen en grupos según sus características morfológicas y bioquímicas. El género *Bacillus* pertenece al grupo de las bacterias esporuladas.

15

Las especies con estructuras formadoras de esporas que son resistentes a los cambios medioambientales soportan calor seco y determinados desinfectantes químicos durante periodos moderados de tiempo. Persisten durante años en terreno seco.

Uso de *Bacillus* spp. en el control de nematodos

20

[0029] Los nematodos son responsables de pérdidas graves en la producción agrícola. Las pérdidas estimadas son de alrededor de 100.000 millones de \$ por año a nivel mundial en cultivos importantes económicamente.

25

[0030] El uso de cultivares resistentes a los nematodos no siempre es posible debido a la falta de fuentes de resistencia para el cultivo, la falta de adaptabilidad de los cultivares resistentes a ciertas regiones y estaciones de siembra, o la descomposición de la resistencia en las condiciones de campo.

El control químico de los nematodos generalmente no está recomendado porque no es muy eficaz; es costoso, debido a los residuos que deja en el alimento y la contaminación del ambiente que causa.

30

Debido a estas desventajas, hay una presión aumentada de la sociedad para limitar el uso de productos químicos, lo que resulta en una demanda por parte de los agricultores de productos que al mismo tiempo no sean tóxicos para los seres humanos y animales, que sean económicos y que controlen muy eficazmente los nematodos.

35

[0031] Muchos microorganismos del suelo son conocidos como parásitos o depredadores de nematodos.

La acción de estos microorganismos puede resultar de un efecto directo o indirecto a través de la interferencia con estadios en el ciclo de vida del patógeno.

Bacillus subtilis

40

[0032] El efecto beneficioso de *B. subtilis*, cuando se aplica cerca de la semilla o la tierra, no es solamente debido al antagonismo alcanzado para patógenos.

La bacteria tiene una influencia positiva en la germinación, desarrollo y rendimiento de planta de cultivo debido también a la producción de sustancias que promueven el crecimiento y la mejora en la nutrición de la planta por la solubilización de fósforo.

45

Género *Meloidogyne*

50

[0033] Los nematodos del género *Meloidogyne* (nematodos inductores de agallas) muestran una gran diversidad en huéspedes vegetales y existen en varias regiones del planeta, causando pérdidas en diferentes cultivos.

El síntoma principal es la presencia de agallas en las raíces de las plantas.

Estas agallas son malformaciones o engrosamientos del sistema de raíz.

Las plantas afectadas tienen un aspecto débil, tienen una baja producción, una defoliación temprana y un declive prematuro, y ocasionalmente puede producirse la muerte de la planta, con síntomas potenciados bajo condiciones de falta de nutrientes y sequía.

55

[0034] Inicialmente, los juveniles del segundo estadio (J2) de *Meloidogyne* penetran en las raíces y establecen un sitio de alimentación en la región del cilindro central de las raíces.

A lo largo del desarrollo de los nematodos, los J2 se diferencian en adultos macho o hembra.

Los machos adultos abandonan el sistema de raíz y las hembras permanecen en las raíces.

Durante el desarrollo de la hembra *Meloidogyne* se ponen aproximadamente 500 huevos.

60

Éstos son depositados en una matriz gelatinosa fuera de las raíces de las que los J2 eclosionan, y de este modo reinfectan el sistema de raíz.

El ciclo de vida de los nematodos inductores de agallas es de aproximadamente cuatro semanas y puede extenderse bajo condiciones de temperatura menos favorables.

65

Las temperaturas inferiores a 20°C o por encima de 35°C y las condiciones de sequía o de imbibición del suelo reduce el desarrollo y la supervivencia del nematodo.

El control de *Meloidogyne incognita* y *M. Javanica* puede hacerse con el uso de productos químicos que contienen

determinados ingredientes activos tales como carbofurano, etoprofos, aldicarb, metam-sodio o fenamifos, entre otros, depediendo del cultivo en cuestión.

La práctica de la rotación de cultivos también es importante en el control debido a la utilización de plantas de cultivo no huéspedes tales como cacahuete, piña, arroz, o a la utilización de especies vegetales como sotobosque, también no huéspedes tales como la avena.

[0035] El nematodo *Meloidogyne exigua* es muy agresivo y está muy extendido en las plantaciones.

Los distintos métodos de control de sustancias químicas en áreas infestadas por *M. exigua* incluyen el uso de productos químicos que contienen cualquiera de los ingredientes activos terbufos o carbofurano, dependiendo del tipo de cultivo.

Entre las plantas de cultivo no huéspedes destacan el algodón, cacahuete, arroz y avena.

[0036] Al igual que *M. exigua*, *M. Paranaensis* está extendido en el cultivo de café, pero no es un problema en otros cultivos.

En cuanto a su control, se han obtenido resultados positivos con el hongo *Paecilomyces lilacinus*, que redujo las poblaciones de nematodos en raíces del tomate "Santa Clara" en el invernadero.

El uso de rizobacterias en relación con control biológico ya es conocido.

Sin embargo, el solicitante actualmente ha desarrollado una composición que comprende dos especies de *Bacillus*, a saber: *Bacillus subtilis* DSM 17231 (conocida también como DSM 5750) y *bacillus licheniformis* DSM 17236 (conocida también como DSM 5749) con efecto nematocida contra los fitonematodos en un cultivo vegetal.

Así, el primer aspecto de la invención se refiere a una composición que comprende las cepas descritas aquí, y excipientes aceptables agroquímicamente y/o portadores de los mismos.

[0037] Se considera ampliamente a los fitonematodos como cualquier nematodo con un impacto negativo en plantas de cultivo comerciales.

Los nematodos que se pueden combatir utilizando la composición de la presente invención incluyen nematodos del género: *Meloidogyne*, *Pratylenchus*, *Heterodera*, *Globodera*, *Ditylenchus*, *Tylenchulus*, *Xiphinema*, *Radopholus*, *Rotylenchulus*, *Helicotylenchus* y *Belonolaimus*.

Las especies del género *Meloidogyne* son consideradas de particular relevancia, ya que son responsables de alrededor de 95% de todas las infestaciones en cultivos causando aproximadamente el 5% de todas pérdidas de cultivos a nivel mundial.

La composición de la presente invención, además de los componentes activos, contiene excipientes aceptables agroquímicamente y/o portadores de los mismos.

[0038] La composición de esta invención sirve particularmente para combatir nematodos en plantas de cultivo.

[0039] Entre los principales cultivos de plantas están la caña de azúcar, café, semillas de soja, algodón, maíz, patatas, tomates, tabaco, plátano, arroz, trigo, aguacate, piña, calabacín, cacao, coco, avena, cebolla, lechuga, remolacha, zanahoria, mandioca, alubias, girasol, pimienta, nabo, manzana, fresa, okra, rábano y cebolla.

[0040] Con respecto a la fruticultura: cítricos, uva, guayaba, papayo, higo, melocotón, ciruela y níspero son de relevancia particular y con respecto a horticultura: berenjena y crucíferas.

[0041] Con respecto a floricultura: rosa, crisantemo, lisianthus, gerbera, amarilis, begonia y celosía.

[0042] La presente invención se refiere a una composición que comprende *Bacillus subtilis* DSM 17231, y *Bacillus licheniformis* DSM 17236, y a un kit que comprende la composición, o preparado por el proceso de preparación de la composición, así como instrucciones y un receptor adecuado.

[0043] También se proporciona un proceso para la preparación de una composición que comprende *Bacillus subtilis* DSM 17231 y *Bacillus licheniformis* DSM 17236 junto con portadores, vehículos y/o adyuvantes aceptables agroquímicamente, y uso de dicha composición para controlar, combatir y/o conferir una resistencia específica contra fitonematodos.

[0044] Además, la invención se refiere al uso de cantidades eficaces de *Bacillus subtilis* DSM 17231 y *Bacillus licheniformis* DSM 17236 en la producción de una composición agroquímica con efecto nematocida contra los fitonematodos en un cultivo vegetal, al igual que procesos para controlar, combatir y/o conferir una resistencia específica contra fitonematodos.

[0045] Los ejemplos ilustrativos presentados a continuación sirven para describir mejor la presente invención.

Ejemplos

Composición de la invención

[0046]

ES 2 610 359 T3

Bacillus subtilis (DSM 17231): $1,6 \times 10^{10}$ ufc/g
Bacillus licheniformis (DSM 17236): $1,6 \times 10^{10}$ ufc/g

Ingredientes	Porcentaje min. (%)	Porcentaje max. (%)
<i>Bacillus subtilis</i> (DSM 17231)	2,4	3,0
<i>Bacillus licheniformis</i> (DSM 17236)	2,4	3,0
Maltodextrina	94,2	93,0
Dióxido de silicio	1,0	1,0

5 [0047] La composición se puede emplear como polvo mojable.
Sin embargo, la composición también se puede proporcionar en cualquier otra forma adecuada, por ejemplo como un polvo, solución, lodo, gránulos, etc.

10 Condiciones de funcionamiento de los procesos de fabricación de la mezcla:

[0048]

15 Ingredientes / materiales principales: la recepción se lleva a cabo por personal cualificado para la verificación y control de los productos recibidos. Según los objetivos de producción, se emite una lista de ingredientes y sus cantidades y la información se envía a la fábrica.

20 Pesado de los ingredientes / materiales: los ingredientes se reciben en la fábrica, son pesados y colocados en una mezcladora de acero inoxidable.

Mezcla: los ingredientes son mezclados después del tratamiento descrito en SOP (procedimiento operativo estándar).

25 Análisis: se recogen muestras para contar el número de colonias en UFC/ g.

Embotellado: el producto se envasa en bolsas con cartón kraft de protección interna que contienen 20 kg o botes de plástico de polietileno que contienen 1,0 o 5,0 kg.

30 Cierre: las bolsas se sellan y se grapán. Los botes se sellan con tapa y se pasan por inducción magnética.

Paletizado: Aún en la fábrica, los envases se colocan en palés de madera a la espera de una revisión por el Control de Calidad (QC).

35 Almacenaje: el producto final es almacenado, sellado e identificado debidamente. Cada lote se registra en un programa electrónico, disponible para todos los operadores en cada sector de interés.

Envío: Una vez liberado por el QC, el producto permanece almacenado en el almacén de envío hasta el momento de la venta.

40 [0049] Este flujo se muestra en la figura 1.

Pruebas *in vitro*:

Prueba 1

45 [0050] Objetivo: evaluar el efecto *in vitro* de productos biológicos basados en bacterias *Bacillus* para el control de fitonematodos, a saber, *Meloidogyne incognita*, *M. Javanica*, y *M. Paranaensis*.

Material y métodos:

50 [0051] Hemos estudiado tres especies de fitonematodos del género *Meloidogyne*: *M. incognita*, *M. javanica*, *M. Paranaensis* y dos productos biológicos en dos dosis diferentes: un producto de japonés de referencia basado en una especie de *Bacillus* y el producto Nemix® compuesto por *Bacillus subtilis* y *Bacillus licheniformis* tal y como se define en la reivindicación 1 97,8% lactosa y dióxido de silicio.

55 El nematicida usado como un estándar de eficacia fue 150G TEMIK® (aldicarb), cuyas características son:

- Marca registrada: TEMIK® 150
- Solicitante de registro: Bayer CropScience Ltda.
- Categorías(s): acaricida - insecticida - nematicida
- Formulación: GR - granulosa
- 60 – Principio activo (i.a.) aldicarb

- Concentración de i.a.: 150 g/Kg
- Método de aplicación: terrestre
- Modo de empleo: suelo
- Clasificación toxicológica: 1 -extremadamente tóxico

5

[0052] El experimento tuvo seis tratamientos:

- Agua: control absoluto;
- P1D2: producto japonés a una dosis de 2 kg.ha⁻¹
- P1D4: producto japonés a una dosis de 4 kg.ha⁻¹
- Producto nemix a una dosis de 2 kg.ha⁻¹
- Producto nemix a una dosis de 4 kg.ha⁻¹
- Nematicida aldicarb (TEMIK® 150G) a una dosis de 15 kg.ha⁻¹.

10

Prueba para la evaluación de productos en la actividad del nematodo:

15

Obtención de juveniles del segundo estadio de *Meloidogyne*

[0053] Las raíces de café y de tomate infectadas por especies de *Meloidogyne* fueron lavadas para eliminar el exceso de tierra adherida a ellas, cortadas y procesadas por la técnica de mezcladora (BONETI, J. I. S. & FERRAZ, S.: Modificação de método de Hussey e descortezador para extração de ovos de *Meloidogyne exigua* de raízes de cafeeiro. Fitopatologia Brasileira, Brasília, DF, v.6; n.3,553p, 1981).

20

[0054] Las raíces fueron cortadas en fragmentos de aproximadamente 1 cm de largo, fueron colocadas en una mezcladora, llena de una solución de hipoclorito sódico 0,5% cloro activo para cubrir el material.

25

La mezcladora fue encendida a su velocidad mínima durante una media de 40 segundos. Luego, la suspensión obtenida fue pasada a través de un tamiz de malla 100 superpuesto en una malla 500. Los residuos fueron recogidos de un tamiz de malla 500 con la ayuda de chorros de agua eyectados a un vaso de Becker, cuidadosamente de modo que el volumen final fuera lo más concentrado posible.

30

[0055] Las suspensiones fueron centrifugadas durante 5 m a una velocidad de 650 gravedades. Cuidadosamente, el sobrenadante fue desechado y la pared interna del tubo del centrifugador fue limpiada para eliminar impurezas orgánicas.

35

[0056] Se añadió al residuo de cada tubo una solución de sacarosa (de una concentración de 454 g de azúcar por un litro de agua), se mezcló bien y la centrifugadora se encendió a la misma velocidad durante 1 min como se ha descrito anteriormente.

40

[0057] El sobrenadante fue vertido a través de un tamiz de malla 500, lavado con agua para eliminar el exceso de sacarosa y recogido con la ayuda de chorros de agua a partir de una pisseta en un vaso de Becker.

[0058] Había placas de Petri con un diámetro de 5 cm dentro de una capa de toallitas de papel tisú que contenía nylon.

La suspensión de huevos fue añadida sobre la capa de papel tisú y las placas de Petri fueron colocadas en una incubadora a 30°C durante 24 horas.

45

Después de 24 h, el filtro con el tejido fue suspendido con la ayuda de fórceps y el fluido de dentro de la placa de Petri fue retirado a una placa de Becker y lavado con agua.

El filtro fue sustituido con una placa de papel y se añadió agua.

Las placas permanecieron en la incubadora durante 48 h.

50

[0059] Después de 48 h, los filtros fueron retirados y el líquido fue recogido con la ayuda de chorros de agua de una pisseta en un vaso de Becker.

La suspensión se calibró para contener 250, 50, 20 y 100 de juveniles del segundo estadio / mL de *Meloidogyne incognita*, *M. Javanica*, y *M. Paranaensis* para ensamble de prueba *in vitro*, respectivamente.

55

Instalación y evaluación del *in vitro*

[0060] Unas placas de Petri con un diámetro de 11 cm con una capa de agar de agua 2% recibieron 1 mL de la suspensión de juveniles de segundo estadio y 1 mL de cada tratamiento para ser evaluados: solución de agua destilada TEMIK® 150G (nematicida); solución del producto japonés basado en *Bacillus* en dos fuerzas; solución Nemix del producto en dos fuerzas.

60

Con agitación, las dos fueron mezcladas íntegramente mL.

Las placas fueron mantenidas en la incubadora a 30°C durante 7 días.

65

[0061] Después de 7 días, cada placa fue examinada bajo una lupa para verificar y contar los nematodos. Se prepararon pruebas para la evaluación de la inhibición de la eclosión de juveniles del segundo estadio de

Meloidogyne de raíces de tomate y café para la mezcladora (BONETI, J. I. S.; FERRAZ, S.: Modificação de método de Hussey e descortezador para extração de ovos de *Meloidogyne exigua* de raíces de cafeeiro.

Fitopatologia Brasileira, Brasília, DF, v.6, n.3,553p., 1981), previamente descritas en la sección "Obtención de juveniles del segundo estadio de *Meloidogyne*". Las suspensiones fueron calibradas para contener 1500 huevos / mL, 100 huevos / mL, 500 huevos / mL y 200 huevos / mL de *M. Incognita*, *M. Javanica*, y *M. Paranaensis* respectivamente.

Instalación y evaluación del *in vitro*

[0062] Unas placas de Petri con un diámetro de 5 cm, conteniendo en su interior tejido de nylon con una capa de papel tisú humedecido, recibieron 1 mL de cada tratamiento siendo evaluado y 1 mL de la suspensión de huevos. Las placas fueron mantenidas en incubadora a 30°C durante 7 días.

[0063] Después de 7 días, los filtros fueron retirados y el líquido de cada placa fue recogido, usando chorros de agua, de una piseta a un cristal.

[0064] Cada suspensión fue examinada bajo el microscopio con la ayuda de un cámara de recuento para verificar y contar los J₂ de *Meloidogyne*.

Diseño y análisis estadístico

[0065] El experimento fue un diseño completamente aleatorizado con seis tratamientos y cinco reproducciones para cada nematodo.

Cada plato de petri era la unidad experimental.

[0066] Los datos fueron sometidos al programa de procedimientos estadísticos Sisvar (FERREIRA, D. F.: Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA., 45, 2000, São Carlos: UFSCar, 2000, p. 255-258, 2000).

En el análisis estadístico, los datos fueron sometidos a análisis de varianza y media comparadas por prueba de Scott-Knott con un 5% de probabilidad. (los resultados sin una diferencia estadísticamente significativa están marcados con letras minúsculas idénticas en las figuras).

[0067] En la evaluación del efecto de los pesticidas en el control de nematodos, se calcularon la inhibición porcentual del movimiento y la inhibición porcentual de la eclosión de juveniles.

La fórmula usada para el cálculo de estos porcentajes fue la siguiente:

$$\frac{(B-A)}{B} \times 100$$

donde:

A = número de nematodos activos o eclosionados en cada repetición de cada tratamiento.

B = número de nematodos usado en el ensayo para evaluar la inhibición del movimiento o la inhibición de la eclosión.

Resultados y discusión

[0068] La Figura 2 y 3 ilustran el efecto inhibitorio de diferentes nematicidas en los movimientos (figuras 2) y eclosión (figuras 3) de los nematodos *M. incognita* (A), *M. Javanica* (B) y *M. Paranaensis* (C).

[0069] Los datos presentados en la figura 2A ilustran que sólo el nematicida TEMIK® difirió significativamente de otros tratamientos presentando los mejores resultados para mortalidad e inhibición de la eclosión de juveniles de *M. Incognita*.

Con respecto a la inhibición de la eclosión de juveniles, se observó que los tratamientos no difirieron del control y sólo el tratamiento químico con TEMIK® redujo la eclosión.

[0070] Para la inhibición de *Meloidogyne javanica* no se observó ninguna diferencia significativa entre los productos biológicos evaluados y TEMIK®, lo que demostró que los productos biológicos tenían un efecto satisfactorio en la inhibición del movimiento del nematodo (figura 2B).

El efecto en la eclosión no fue significativo y sólo el producto químico TEMIK inhibió la eclosión (figura 3B).

[0071] Para la inhibición de *Meloidogyne paranaensis*, la dosis de Nemix de 4 kg ha⁻¹ dio un resultado significativamente igual al nematicida (figura 2C).

A continuación están los productos japoneses en dosis de 2 y 4 kg ha⁻¹ y Nemix a una dosis de 2 kg ha⁻¹, y todos los productos orgánicos tuvieron un efecto superior al tratamiento de control.

Con respecto a la inhibición de la eclosión de juveniles, el producto Nemix con dos dosis tuvo efectos similares, mostrando los mejores resultados entre los productos biológicos evaluados (figura 3C). Todos los productos evaluados difirieron del control absoluto y el efecto del nematicida fue superior a todos los otros tratamientos.

5 [0072] El producto TEMIK® y Nemix en una dosis de 4 kg ha⁻¹ fueron los más eficaces y no difieren significativamente respecto a la mortalidad de *M. parananensis*.

Con relación a la inhibición de la eclosión, TEMIK® difirió significativamente de todos los otros tratamientos al ser superior a ellos.

10 Sin embargo, el producto Nemix fue más eficaz que el producto japonés (figura 3C).

[0073] Así, la composición Nemix mostró una inhibición significativa de los nematodos *M. Javanica* y *M. Paranaensis*, una inhibición comparable al producto químico TEMIK.

15 Prueba 2

[0074] Objetivo: evaluar la penetración de *Meloidogyne javanica* en las raíces de tomate respecto a dosis diferentes del producto biológico Nemix que comprende *Bacillus subtilis* y *Bacillus licheniformis* según la reivindicación 1 bajas condiciones de invernadero. Obtención del inóculo

20 [0075] La obtención del inóculo se realizó a partir del procesamiento de muestras de raíces de café infectadas por *M. javanica*.

Las muestras se llevaron al Agricultural Nematology Laboratory of Institute of Agricultural Sciences y, para el tratamiento, las raíces fueron cortadas en fragmentos de 2 cm y colocadas en un vaso mezclador del hogar que contenía solución de hipoclorito sódico (1 parte de lejía: 4 partes de agua).

25 [0076] La solución fue agitada durante 20 segundos. Después de este periodo, la suspensión pasó a través de un conjunto de tamices de malla 200 y 500, respectivamente, superpuestos.

30 El residuo de los tamices de malla 500 fue recogido con la ayuda de una botella comprimible a un vaso de precipitados.

La suspensión obtenida se calibró para contener 800 huevos de nematode.mL⁻¹.

35 Instalación y prueba de transmisión

[0077] El diseño experimental fue un diseño completamente aleatorizado con cinco tratamientos y cinco reproducciones.

40 [0078] El cultivar de tomate usado fue "Santa Cruz Kada Gigante", con las dosis usadas del producto biológico NEMIX de 4, 6 y 8 kg ha⁻¹.

El nematicida aldicarb (TEMIK® 20 G 150 kg ha⁻¹) fue usado como un control estándar y control sin ningún producto de tomate y el nematodo parasitario vegetal *M. javanica* para la penetración estándar.

45 [0079] Las semillas de cultivar de tomate "Santa Cruz Kada Gigante" fueron sembradas en bandejas de poliestireno extruido de 128 alveolos llenas de substrato Plantmax®.

Para la inoculación, se abrieron tres agujeros con 2 cm de profundidad y separados 2 cm del tallo de la plántula.

En estos tres agujeros se distribuyeron 5 ml de inóculo de suspensión calibrada (4000 nematodos / vaso de plástico).

50 Poco después, las dosis de los productos fueron añadidas en pequeños vasos de plástico en fosas abiertas alrededor de cada plántula.

Evaluación de la penetración de juveniles del segundo estadio de *M. javanica* en raíces de tomate

55 [0080] La evaluación se llevó a cabo después de 3 semanas de inoculación, donde las raíces, después del corte de los brotes y la separación del suelo, fueron preparadas para la coloración de los nematodos en los tejidos vegetales (Byrd Jr. Et al., An improved technique for clearing and staining plant tissues for detection of nematodes. Journal of Nematology, Lakeland, v. 5, n. 1, p. 142-143, 1983).

Las raíces fueron cortadas en trozos de 1-2 cm y transferidas a un vaso de Becker con 50 mL de agua a la que se añadieron 20 mL de lejía comercial (5,25% de NaOCl), lo que resultó en una concentración final de 1,5% de NaOCl.

60 Los segmentos de raíz permanecieron 6 min en esta solución, promoviendo una agitación manual durante 10 s en intervalos de 1 min. Las raíces fueron lavadas bajo agua corriente durante 30 a 45 s y se mantuvieron en reposo durante 15 s en agua para eliminar el hipoclorito sódico residual.

[0081] Después, se realizó un drenaje completo y se añadieron 30 mL de agua destilada más 1 mL de solución de tinte (3.35 g fucsina ácida + 25 mL de ácido acético glacial + 75 mL de modo acuoso).

65 Las raíces de esta solución fueron calentadas hasta el punto de ebullición, se las dejó en ebullición durante 30

segundos, y poco después el contenedor fue colocado en la mesa para alcanzar una temperatura ambiente. Posteriormente, se eliminó la solución de tinte restante, y el material fue lavado con agua del grifo y colocado en 20-30 mL de glicerina acidificada con unas pocas gotas de 5N HCl.

5 Los segmentos de raíz fueron prensados entre portaobjetos de microscopio y observadas con un microscopio óptico. Se contaron los juveniles del segundo estadio que penetraron en las raíces.

Análisis estadístico

10 [0082] Los datos fueron sometidos al programa de procedimientos estadísticos SISVAR (FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA., 45, 2000, São Carlos: UFSCar, 2000, p. 255-258, 2000). En el análisis estadístico, las medias se compararon mediante la prueba de Tukey a una probabilidad del 5%.

Resultados y discusión

15 [0083] A partir de los datos presentados en la tabla 3 parece que la penetración de los juveniles del segundo estadio de *M. javanica* se vio afectada en todos los tratamientos en comparación con el control sin ningún producto. El tratamiento con el producto aldicarb a 20 kg ha⁻¹ mostró la penetración más baja. De las diferentes dosis de NEMIX, la mejor fue la de 8 kg ha⁻¹, que proporcionó una mayor inhibición que las otras
20 dosis evaluadas.

Tabla 3 - Número de juveniles del segundo estadio de *Meloidogyne javanica* penetrados y porcentaje de penetración en cultivar de raíces de tomate "Santa Cruz Kada Gigante", 3 semanas después de la inoculación. Uberlândia, UFU, 2007.

25

Productos	Penetrado	Penetración %	% Inhibición de la penetración
Aldicarbe (TEMIK 150 G® 20 kg. Ha ⁻¹) _{referencia}	10,20* a**	0,26***a	88,00
<i>Bacillus</i> spp. (NEMIX 8 kg. Ha ⁻¹)	28,80 b	0,72b	66,12
<i>Bacillus</i> spp. (NEMIX6 Kg. Ha ⁻¹)	50,40 c	1,26c	40,70
<i>Bacillus</i> spp. (NEMIX4 Kg. Ha ⁻¹)	62,20 d	1,57d	26,82
Control (sin aplicación de producto)	85,00 e	2,13e	-

C.V (%)= 12,5
 * promedio de cinco repeticiones
 ** Las medias seguidas por la misma letra en la columna no difieren entre sí por prueba de Tukey a probabilidad del 5%
 *** % Penetración= N° de J₂ / 4.000 huevos

[0084] Se ha observado que el porcentaje de penetración de nematodos osciló entre 0,26 para la dosis de aldicarb y 2,13 para el control sin aplicación de producto.

30 [0085] Con respecto al producto biológico, este puede haber participado en la orientación de los juveniles del segundo estadio de *M. Javanica* causando la dispersión de juveniles, obstaculizando su penetración, o tal reducción puede haber sido provocada por interferencia en el proceso de emergencia de los juveniles de *M. Javanica*. Sigue existiendo la posibilidad de que los compuestos absorbidos por el huevo inactiven los nematodos o causen deformaciones durante el desarrollo que eviten la eclosión.

35 [0086] Entre las tres dosis evaluadas del producto biológico basado en *Bacillus* spp., la dosis de 8 kg ha⁻¹ mostró mejores resultados para la reducción de la penetración de los juveniles del segundo estadio de *M. Javanica* en raíces de cultivar de tomate "Santa Cruz Kada Gigante" con penetración de 0,72 por ciento.

40 Prueba 3

[0087] Objetivo: evaluar la penetración de *Meloidogyne exigua* en las raíces de tomate expuestas a dosis diferentes de producto biológico según la reivindicación 1 basado en *Bacillus* spp. bajo condiciones de invernadero.

45 Obtención del inóculo

[0088] La obtención del inóculo fue realizada a partir del procesamiento de muestras de raíces de café infectadas por *M. exigua*.

Las muestras se llevaron al Agricultural Nematology Laboratory of Institute of Agricultural Sciences y, para el tratamiento, las raíces fueron cortadas en fragmentos de 2 cm y colocadas en un vaso mezclador del hogar que contenía una solución de hipoclorito sódico (1 parte de lejía: 4 partes de agua).

- 5 [0089] Hubo trituración en el aspa inferior durante 20 segundos.
Después de este periodo, la suspensión se pasó a través de un conjunto de tamices de malla 200 y 500, respectivamente, superpuestos.
El residuo de los tamices de malla 500 fue recogido, con la ayuda de una botella comprimible con agua a un becker (BONETI, J. I. S.; FERRAZ, S. Modificação de método de Hussey e Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua* de raíces de cafeeiro. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, DF, v.6, n.3, 553p., 1981).
10 La suspensión obtenida fue calibrada para contener 800 huevos de nematodo / mL.

Instalación y prueba de transmisión

- 15 [0090] El diseño experimental fue un diseño completamente aleatorizado con cinco tratamientos y cinco reproducciones.
El genotipo de tomate usado fue el "Santa Cruz Kada Gigante", con las dosis usadas del producto según la reivindicación 1 basado en *Bacillus* (NEMIX®) siendo de 4,6 y 8 kg ha⁻¹, nematicida Aldibarbe (Temik® 150 G) a una dosis de 20 kg de producto comercial por hectárea como control estándar y plantas de tomate de control sin ningún producto para la penetración estándar.

- [0091] Las semillas de cultivar de tomate "Santa Cruz Kada Gigante" fueron sembradas en bandejas de poliestireno extruido de 128 alveolos y, después de 8 días, las semillas fueron trasplantadas en vasos de plástico de 500 mL de capacidad llenas de sustrato Plantmax®.
25 Para la inoculación, se abrieron tres agujeros con 2 cm de profundidad y separados 2 cm del tallo de la plántula.
En estos tres agujeros se distribuyeron 5 ml de inóculo de suspensión calibrada (4000 nematodos / vaso de plástico).
Poco después, las dosis del producto basado en *Bacillus* spp. según la reivindicación 1 se añadieron en vasos de plástico con una botella comprimible.
30 El nematicida aldicarb también se añadió inmediatamente después de la inoculación, con una ranura abierta alrededor de cada plántula.

Evaluación de la penetración de juveniles del segundo estadio de *M. exigua* en raíces

- 35 [0092] La evaluación se realizó después de 3 semanas de inoculación, donde las raíces, después del corte de los brotes y la separación del suelo, fueron preparadas para la coloración de nematodos en los tejidos vegetales (Byrd Jr., et. al., An improved technique for clearing and staining plant tissues for detection of nematodes. *Journal of Nematology*, Lakeland, v. 5, n. 1, p. 142-143, 1983).
Las raíces se cortaron en trozos de 1-2 cm y se transfirieron a un vaso de Becker que contenía 50 mL de agua al que se añadieron 20 mL de lejía comercial (5.25% de NaOCl), lo que resultó en una concentración final de 1,5% de NaOCl.
Los segmentos de raíz permanecieron durante 6 min en esta solución, promoviendo una agitación manual durante 10 s a intervalos de 1 min. Las raíces fueron lavadas bajo agua corriente durante 30 a 45s y se mantuvieron en reposo durante 15 s en agua para eliminar el hipoclorito sódico residual.

- 45 [0093] Después, hubo un drenaje completo y se añadieron 30 mL de agua destilada más 1 mL de solución de tinte (3.35 g de fucsina ácida + 25 mL de ácido acético glacial + 75 mL de modo acusoso).
Las raíces de esta solución se calentaron hasta el punto de ebullición, se dejaron en ebullición durante 30 segundos y, poco después, el contenedor fue colocado en la mesa para alcanzar la temperatura ambiente.
50 Posteriormente, eliminamos el tinte restante, y el material fue lavado en agua del grifo y colocado en 20-30 mL de glicerina acidificada con unas pocas gotas de 5N HCl.
Los segmentos de raíz fueron prensados entre portaobjetos de microscopio que fueron observados con un microscopio óptico.
Observamos los fragmentos de raíz y determinamos el número de juveniles del segundo estadio que penetraron en las raíces de tomate.

Temperaturas máximas y mínimas del aire en el interior del invernadero

- 60 [0094] Las temperaturas máxima y mínima diarias del aire en el interior del invernadero se registraron con el fin de calcular promedios para el periodo del experimento.
Las temperaturas promedio máxima y mínima del aire fueron 35,9°C y 15,3°C, respectivamente.

Análisis estadístico

- 65 [0095] Los datos se sometieron al programa de procedimientos estadísticos SISVAR FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. en: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA

SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA., 45, 2000, São Carlos. Anais. São Carlos: UFSCar, 2000, p. 255-258, 2000), verificando la homogeneidad de varianza y la normalidad de los errores.

En el análisis estadístico, las medias fueron comparadas mediante la prueba de Tukey a un nivel de probabilidad del 5%.

5 Resultados y discusión

[0096] A partir de los datos presentados en la tabla 4 e ilustrados en la figura 3, se observa que la penetración de juveniles del segundo estadio de *M. Exigua* se vio significativamente afectada en todos los tratamientos en comparación con el control sin ningún producto.

El tratamiento con el producto aldicarb (TEMIK) a 20 kg ha⁻¹ fue la penetración más afectada.

Entre las dosis del producto NEMIX, la mejor fue 8 kg ha⁻¹, que mostró un porcentaje más alto de inhibición, 54,13%, en comparación con el nematicida aldicarb, que mostró una inhibición significativa de 81,95%.

15 Tabla 4 - Número de juveniles del segundo estadio de *Meloidogyne exigua* penetrados, porcentaje de penetración y porcentaje de inhibición en raíces de tomate "Santa Cruz Kada Gigante", tres semanas después de la inoculación. Uberlândia, UFU, 2007.

Productos	N° de J ₂ de <i>M. exigua</i> penetrados	Porcentaje	
		Penetración	Inhibición de penetración
Aldicarbe (TEMIK® 150 G 20 kg. Ha ⁻¹)ref	19,40* a**	0,48***	81,95***
Bacillus spp. (NEMIX8 Kg. Ha ⁻¹)	49-00 b	1,22	54,13
Bacillus spp.(NEMIX6 kg. Ha ⁻¹)	66,20 c	1,65	37,97
Bacillus spp.(NEMIX4 kg. Ha ⁻¹)	81,00 c	2,02	24,06
Control (sin aplicación)	106,60 d	2,66	-----

C.V (%) 13,04
 *promedio de cinco repeticiones
 ** Las medias seguidas de la misma letra en la columna no difieren entre sí por prueba de Tukey a una probabilidad del 5%
 *** % Penetración= N° de J₂ / 4,000 huevos
 *** valores comparados con la población inicial de 4000 huevos de *M. exigua*

20 [0097] También se observó que no hubo ninguna diferencia en el efecto entre las dosis de 4 y 6 kg ha⁻¹ del producto NEMIX con porcentajes de penetración de 1,65 y 2,02% respectivamente. El porcentaje de penetración de nematodos oscilaba entre 0,48 y 2,66% en el control y modelo de control de penetración, respectivamente, para la población inicial.

25 [0098] El efecto de los pesticidas en la migración de *M. Exigua* muestra que hay interferencia en la dirección causando la dispersión de juveniles. La reducción en la presencia de juveniles que han penetrado las raíces de tomate respecto al control también puede haber sido debida a la interferencia en los procesos de la eclosión y orientación de juveniles de *M. Exigua*.

30 [0099] La hipótesis de reducción en la penetración de nematodos en las raíces se puede clarificar como la capacidad de la bacteria, que comprende el producto, de fijarse o conectarse a las lectinas de superficie, que en este caso puede ser mínima debido a las bacterias gram-positivas.

35 [0100] Las temperaturas en el interior del invernadero también pueden influir en la penetración de juveniles en las raíces. Algunos autores informan de que la acción de antagonista de algunos microorganismos en poblaciones de *Meloidogyne* spp. es superior con temperaturas que varían de 23-25°C que 18-32°C (AL-HAZMI, A. S.; SCHIMITT, D. P.; SASSER, J. N. The effect of *Arthrobotrys conoides* on *Meloidogyne incognita* populations densities in corn as influenced by temperature, fungus inoculum density and of fungus introduction in the soil. *Journal of Nematology*, DeLeon Springs, v. 14, n. 2, p. 168-174, Apr., 1982).

40 [0101] Entre las tres dosis evaluadas del producto según la reivindicación 1 basado en *Bacillus* spp., la dosis de 8 kg ha⁻¹ demostró ser más efectiva para reducir la penetración de los juveniles del segundo estadio de *M. Exigua* en raíces de cultivar de tomate "Santa Cruz Kada Gigante" con el porcentaje de penetración de 1,22% y 54,13% inhibición.

45 En conclusión

[0102] La combinación específica de una cepa de *Bacillus subtilis* con una cepa de *Bacillus licheniformis* tal como

por ejemplo *Bacillus subtilis* (DSM 17231) y *Bacillus licheniformis* (DSM 17236) demuestra ser una alternativa fuerte a los productos nematocidas químicos y también una composición mejorada en comparación con los productos biológicos disponibles.

5 El efecto combinado de las dos cepas es beneficioso para la inhibición de los nematodos que causan pérdidas de los cultivos.

Depósitos y solución del experto

10 [0103] La cepa de *Bacillus subtilis* se depositó el 07-04-2005 en Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1 b, D-38124 Braunschweig (DSMZ) y se le asignó el número de depósito: DSM 17231.

15 [0104] La cepa de *Bacillus licheniformis* se depositó el 07-07-2005 en Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1 b, D-38124 Braunschweig (DSMZ) y se le asignó el número de depósito: DSM 17236.

Los depósitos se hicieron según el Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos a los fines del Procedimiento en materia de Patentes.

Referencias

20

[0105]

EP 0705807

BR PI 0604602-9

Siddiqui y Mahmood (1999).Bioresource Technology 69,167-179.

25

REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición, que comprende como ingredientes activos un *Bacillus subtilis* que tiene las características de la cepa depositada en Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen con número de depósito DSM 17231 y un *Bacillus licheniformis* que tiene las características de la cepa depositada en Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen con número de depósito DSM 17236, y excipientes y / o portadores de los mismos aceptables agroquímicamente.
- 10 2. Composición según la reivindicación 1, que comprende el *Bacillus subtilis* y el *Bacillus licheniformis* en una mezcla de maltodextrina y dióxido de silicio, donde dichos componentes están presentes en un índice mínimo de 2,4 (%), 2,4 (%), 94,2 (%) y 1,0 (%), respectivamente, y en un índice máximo de 3,0 (%), 3,0 (%), 93,0 (%) y 1,0(%), respectivamente.
- 15 3. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, en forma de un polvo mojable.
- 20 4. Proceso para la preparación de una composición, tal y como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende mezclar, en proporciones deseadas, cantidades eficaces del *Bacillus subtilis* y el *Bacillus licheniformis* para aplicar, junto con portadores aceptables agroquímicamente, vehículos y/o adyuvantes.
- 25 5. Uso de una composición, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, u obtenible a partir de un proceso tal y como se define en la reivindicación 4, para controlar, combatir y/o conferir resistencia específica a fitonematodos.
- 30 6. Uso según la reivindicación 5, donde los fitonematodos se seleccionan del grupo consistente en *Meloidogyne*, *Pratylenchus*, *Heterodera*, *Globodera*, *Ditylenchus*, *Tylenchulus*, *Xiphinema*, *Radopholus*, *Rotylenchulus*, *Helicotylenchus* y *Belonolaimus*.
- 35 7. Uso según la reivindicación 6, donde el fitonematodo se selecciona del grupo consistente en *Meloidogyne incognita*, *Meloidogyne javanica*, *Meloidogyne exigua*, *Meloidogyne paranaensis*, *Heterodera glicinas* y *Pratylenchus zaeae*.
- 40 8. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, donde el cultivo vegetal se selecciona del grupo consistente en caña de azúcar, semilla de soja, patata, zanahoria, café y plátano.
9. Proceso para controlar y/o combatir fitonematodos en plantas y/o su hábitat, donde la composición tal y como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 se deja actuar sobre los fitonematodos y/o su hábitat.
10. Proceso para conferir resistencia específica a fitonematodos, que comprende aplicar una cantidad eficaz de una composición, tal y como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, sobre plantas y/o su hábitat.
11. Kit, que comprende la composición, tal y como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, u obtenible a partir de un proceso tal y como se define en la reivindicación 4, instrucciones y un receptor adecuado.

FIGURA 1

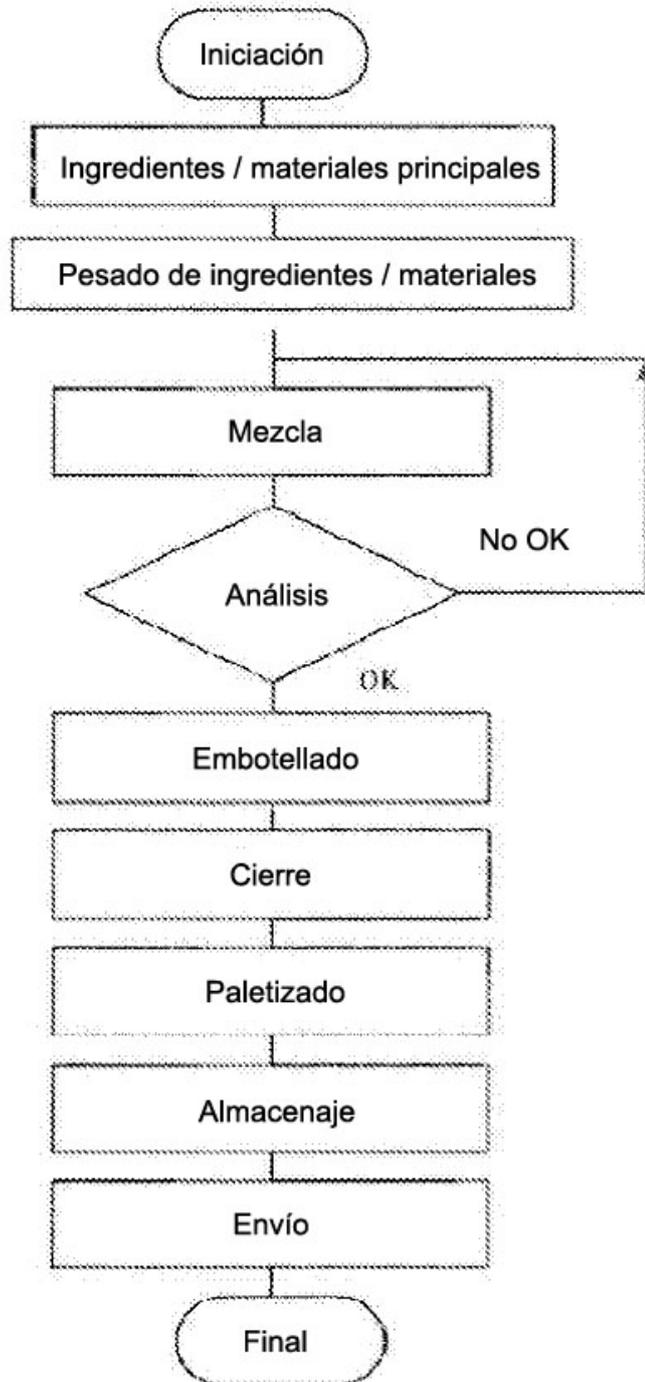


FIGURA 2

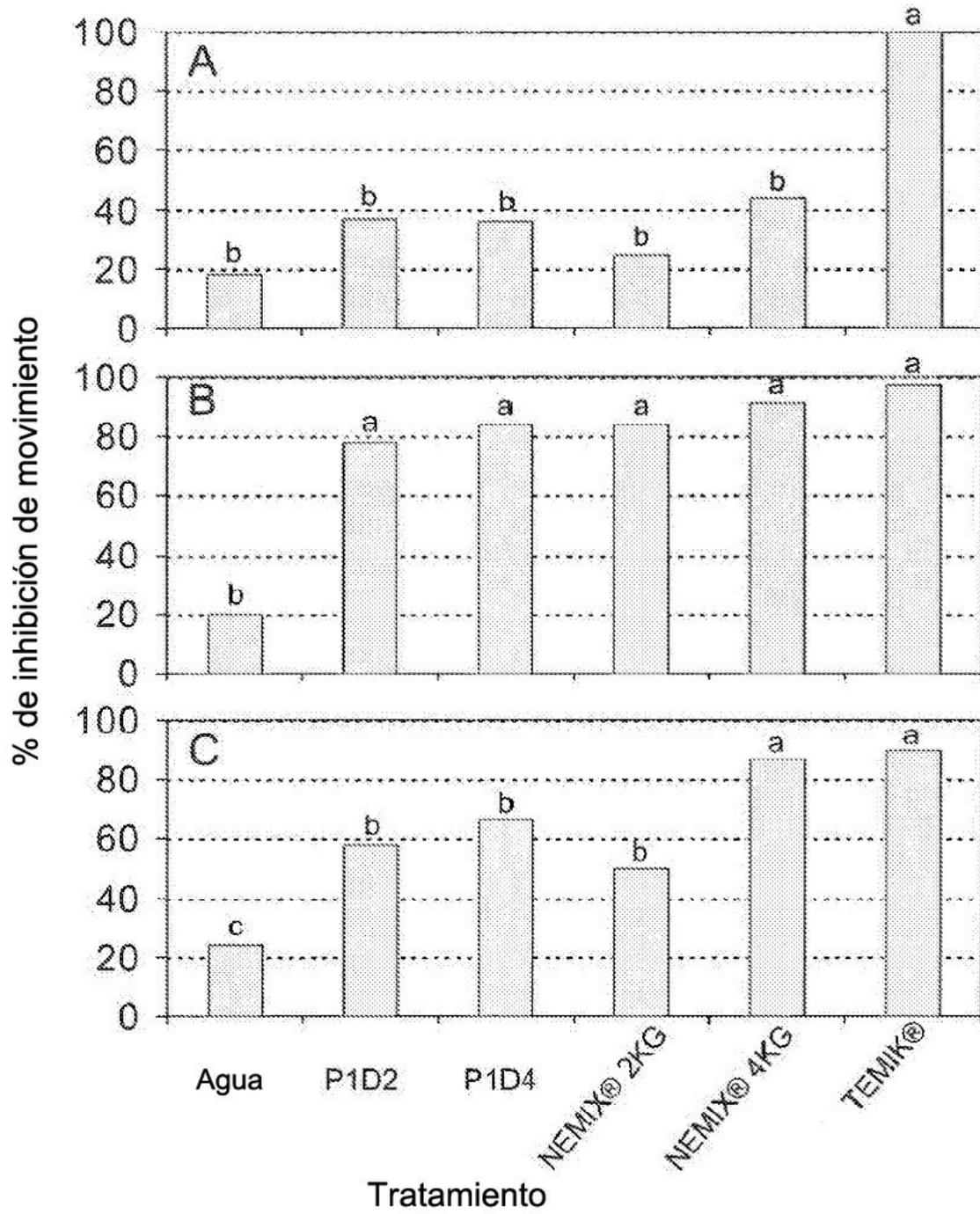


FIGURA 3

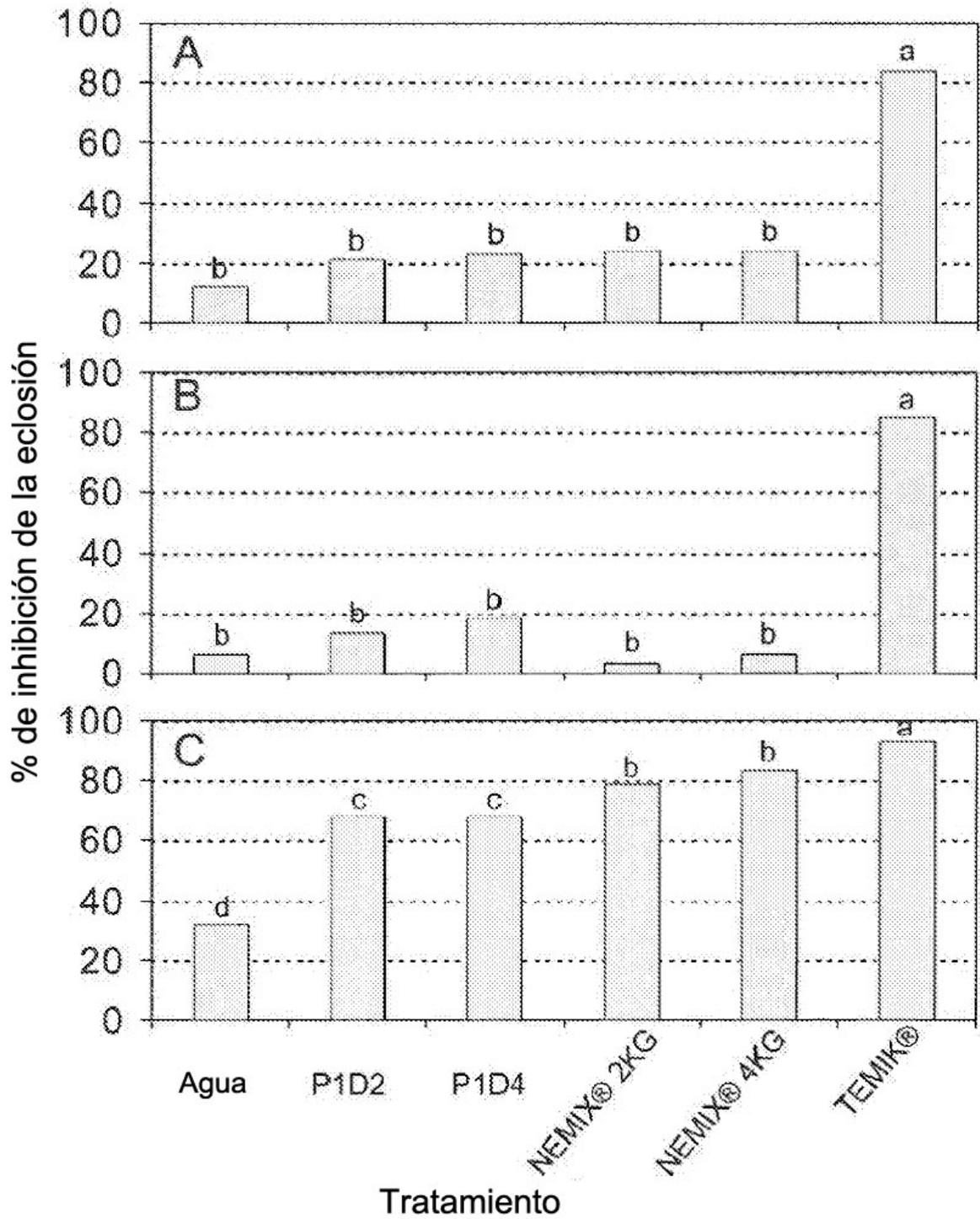


FIGURA 4

