

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 663 372**

51 Int. Cl.:

A01N 63/00 (2006.01)

A01P 5/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.07.2012** **PCT/US2012/047963**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.01.2013** **WO13016328**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.07.2012** **E 12769191 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.12.2017** **EP 2736340**

54 Título: **Biocontrol de nematodos**

30 Prioridad:

25.07.2011 US 201161511508 P

04.11.2011 US 201161556016 P

19.06.2012 US 201261661763 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.04.2018

73 Titular/es:

BAYER CROPSCIENCE LP (100.0%)

2 T.W. Alexander Drive

Research Triangle Park, NC 27709, US

72 Inventor/es:

ROYALTY, REED, NATHAN;

THOMAS, VARGHESE y

WHITSON, ROY

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 663 372 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

Biocontrol de nematodos

Campo de la invención

La presente invención se relaciona con el control de nematodos parásitos de plantas.

5 **Antecedentes de la invención**

Los nematodos parásitos de las plantas provocan daños significativos sobre una amplia variedad de cultivos, lo que anualmente provoca pérdidas significativas, de aproximadamente el 5 % al 12 %, en el rendimiento de los cultivos en el mundo. Frecuentemente, los nematodos provocan daños en las raíces, lo que da como resultado el desarrollo de plantas achaparradas, que tienen sistemas radiculares pequeños, que presentan síntomas de deficiencias de minerales en sus hojas y que se marchitan con facilidad. El daño de los nematodos también predispone a las plantas a las infecciones por una amplia variedad de hongos y bacterias patógenos para las plantas.

Con el fin de combatir y controlar los nematodos, los granjeros típicamente usan nematicidas químicos. Éstos varían desde una fumigación de gases como de líquidos, tal como el bromuro de metilo y la cloropicrina hasta la aplicación de nematicidas organofosfatos y carbamatos, tales como la tiazina o el oxamilo. Los nematicidas químicos de este tipo se han usado durante varias décadas. A pesar de su eficacia en el contexto del control de los nematodos diana, existen limitaciones serias en estos procedimientos. Una limitación es que los nematicidas químicos no pueden actuar sobre los nematodos que ya han penetrado en la raíz. Otra limitación es el peligro que está asociado a la producción y el uso de los nematicidas químicos. Los nematicidas químicos son altamente tóxicos y pueden provocar el envenenamiento o la muerte de los seres humanos. Como resultado, los países han restringido o incluso prohibido determinados plaguicidas. En particular, el bromuro de metilo está prohibido en la mayoría de los países, debido a que deteriora la capa de ozono. El documento WO2010/128003 desvela combinaciones de *B. subtilis* QST713 para aumentar la salud de las plantas. Nikham y col. (Nematologica Mediterranea 2003 31(2), p:239-243) desvela la cepa Bst de *B. subtilis* como un sistema inductor de resistencia en plantas. El documento EP 2 460 407 se refiere a combinaciones de fluopiram con otros agentes. Merckling y col. ("development of Serenade as a biopesticide against plant bacterial diseases; disponible en http://www.cost873.ch/uploads/files/TMerckling_Serenade.pdf) desvela que *B. subtilis* QST713 induce una respuesta sistémica de plantas.

Debido a las restricciones y las prohibiciones que se mencionaron con anterioridad, hay una carencia de soluciones viables para los nematodos. La presente invención proporciona un medio seguro y eficaz para reemplazar los plaguicidas químicos o para reducir su uso. También es única al proporcionar una solución que tanto inhibe la penetración de los nematodos en las raíces de las plantas como también impide la maduración de los nematodos que hayan podido superar esta barrera inicial.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona procedimientos y composiciones para el control de nematodos parásitos de plantas. La invención proporciona un procedimiento para el control de nematodos que comprende aplicar a una planta, a una parte de planta y/o a un lugar de la planta una cantidad eficaz de *Bacillus subtilis* QST713. En algunas realizaciones, el *Bacillus subtilis* QST713 se aplica como un producto de fermentación que incluye *Bacillus subtilis* QST713 y, opcionalmente, el cultivo de fermentación residual. En una realización, el producto de fermentación está compuesto sustancialmente de células de *Bacillus subtilis* QST713.

Las composiciones basadas en *Bacillus subtilis* de la presente invención reducen los huevos de nematodos de los nudos de la raíz, disminuye la penetración en la planta del nematodo de los nudos de la raíz, y/o inhibe la maduración de nematodos de los nudos de la raíz que penetran en las plantas. En algunas realizaciones, los nematodos diana (es decir, los nematodos que se controlan) son nematodos de los nudos de la raíz que producen enfermedades. En ciertos casos, los nematodos son de la especie *Meloidogyne*. En otras realizaciones, los nematodos diana de las composiciones de la presente invención son nematodos císticos. En ciertos casos, los nematodos diana son de la especie *Heterodera*. En otras realizaciones, los nematodos diana son de la especie *Globodera*. En otras realizaciones, los nematodos diana son de las siguientes especies: *Paratylenchus*, *Pratylenchus*, *Paratrichodorus*, *Criconebella*, *Helicotylenchus*, *Meloidogyne*, y *Criconemoides*. En un caso particular los nematodos son *Helicotylenchus pseudorobustus* (Spiral HP) o *Helicotylenchus digonicus* (Spiral HD).

En algunas realizaciones, las composiciones descritas anteriormente se mezclan con al menos otro pesticida, tal como un fungicida, insecticida, nematicida o herbicida. En una realización, el pesticida es un nematicida. En ciertas realizaciones una composición basada en *Bacillus subtilis* de la presente invención se mezcla en tanque con un nematicida formulado que puede estar disponible comercialmente. En otras realizaciones, la composición basada en *Bacillus subtilis* se mezcla con un principio activo (es decir, uno o más compuestos que son activos contra hongos, insectos, nematodos o malezas) y luego se formula con inertes, de modo que los activos múltiples forman un producto. En una realización el otro principio activo nematicida es carbamato u organofosfato. En otra es un nematicida biológico.

También se describen en el presente documento composiciones que comprenden *Bacillus subtilis* QST713 o mutantes del mismo y un segundo agente de control de nematodos. El segundo agente de control de nematodos puede ser un carbamato o un organofosfato.

La presente invención además provee cualquiera de las composiciones de la presente invención que además comprende un inerte para formulación u otro ingrediente para la formulación, tal como polisacáridos (almidones, maltodextrinas, metilcelulosas, proteínas, tal como proteínas de suero, péptidos, gomas), azúcares (lactosa, trehalosa, sacarosa), lípidos (lecitina, aceites vegetales, aceites minerales), sales (cloruro de sodio, carbonato de calcio, citrato de sodio), y silicatos (arcillas, sílice amorfa, sílices pirogenada/precipitada, sales de sílice). En algunas realizaciones, tales como aquellas en las cuales las composiciones se aplican a suelos, las composiciones de la presente invención comprenden un vehículo, tal como agua o un material mineral u orgánico, tal como turba, que facilita la incorporación de las composiciones al suelo. En algunas realizaciones, tales como aquellas en las cuales la composición se usa para el tratamiento de semillas o para sumergir raíces, el vehículo es un aglutinante o adhesivo que facilita la adherencia de la composición a la semilla o la raíz. En otra realización en la cual las composiciones se usan como un tratamiento de semillas el ingrediente para la formulación es un colorante. En otras composiciones, el ingrediente para la formulación es un conservante.

En algunas realizaciones las composiciones se aplican a plantas, partes de plantas, o lugares de las plantas, tal como el suelo, antes de la plantación. En otras realizaciones las composiciones se aplican durante la plantación. En aún otras las composiciones se aplican después de la plantación.

En ciertas realizaciones, la aplicación de las composiciones es precedida por una etapa que comprende identificar que la planta y/o el lugar de la planta para el crecimiento necesita tratamiento. En otras realizaciones, identificar incluye determinar que el sitio para el crecimiento de la planta excede los límites económicos para la infestación por nematodos.

En el presente documento también se describe un kit que incluye *Bacillus subtilis* QST713 o mutantes de los mismos e instrucciones para su uso como un nematicida. Estas instrucciones pueden ser una etiqueta del producto. Las instrucciones pueden dirigir al usuario para usar los *Bacillus subtilis* QST713 o un mutante de los mismos a una tasa de entre aproximadamente 2×10^{12} y aproximadamente 6×10^{13} ufc por 4050 m^2 ($8,09 \times 10^{11}$ a $2,43 \times 10^{13}$ ufc por hectárea). Estas instrucciones pueden ser para el uso de *Bacillus subtilis* como un nematicida en combinación con un nematicida químico. Las instrucciones también pueden dirigir al usuario para usar el nematicida químico a una tasa que es menor que la tasa recomendada en una etiqueta del producto para el nematicida químico cuando se usa como tratamiento independiente. Las instrucciones también pueden dirigir al usuario para aplicar el *Bacillus subtilis* QST713 o mutantes de los mismos al suelo en contacto con las raíces de las plantas, al suelo en la base de la planta, o al suelo a una distancia específica alrededor de la base de la planta (por ejemplo, a una distancia de aproximadamente 5 cm, aproximadamente 10 cm, aproximadamente 15 cm, aproximadamente 20 cm, aproximadamente 25 cm, aproximadamente 30 cm, aproximadamente 35 cm, aproximadamente 40 cm, aproximadamente 45 cm, aproximadamente 50 cm, aproximadamente 55 cm, aproximadamente 60 cm, aproximadamente 65 cm, aproximadamente 70 cm, aproximadamente 75 cm, aproximadamente 80 cm, aproximadamente 85 cm, aproximadamente 90 cm, aproximadamente 95 cm, aproximadamente 100 cm, o más alrededor de la base de la planta). Las instrucciones también pueden dirigir al usuario para hacer aplicaciones múltiples de *Bacillus subtilis* QST713 o mutantes de los mismos a intervalos de entre aproximadamente 10 y aproximadamente 18 días y/o a una tasa de entre aproximadamente 7×10^5 y aproximadamente 1×10^7 ufc por gramo de suelo por aplicación. Las instrucciones además pueden dirigir al usuario para usar los *Bacillus subtilis* QST713 o mutantes de los mismos en combinación con el nematicida químico durante la plantación y para usar *Bacillus subtilis* QST713 o mutantes de los mismos solos en aplicaciones posteriores. Las instrucciones también pueden dirigir al usuario para aplicar los *Bacillus subtilis* QST713 o mutantes de los mismos como una única aplicación a una tasa de entre aproximadamente 7×10^5 y aproximadamente 1×10^7 ufc por gramo de suelo. Las instrucciones también pueden dirigir al usuario para aplicar los *Bacillus subtilis* QST713 o mutantes de los mismos como aplicaciones múltiples en una relación de entre aproximadamente 1×10^5 y aproximadamente 3×10^6 ufc por gramo de suelo.

Breve descripción de las figuras

La **Figura 1** muestra el efecto del tratamiento de cultivo completo con QST713 sobre las agallas en raíces infestadas con nematodos de los nudos de la raíz. Cabe destacar que el cultivo completo de QST713 se designa como AQ713 en ésta y en otras figuras. El control no tratado se designa como "CNT" en la figura.

La **Figura 2** muestra el efecto del tratamiento con el producto SERENADE® ASO a diversas tasas sobre plántulas infestadas con nematodos de los nudos de la raíz. Específicamente, los resultados muestran la extensión de formación de agallas y la penetración de raíces y los efectos sobre el desarrollo de nematodos. La primera barra en cada conjunto de tres barras corresponde con cada tratamiento (Serenade ASO al 5,0 %, al 2,5 % y al 1,0 % y CNT) representa la formación de agallas, la segunda barra representa la penetración de nematodos y la tercera representa el desarrollo del nematodo.

La **Figura 3** representa los huevos de nematodo de los nudos de la raíz por planta tratada con diversos lotes de cultivo completo de AQ713 en comparación con plantas no tratadas (designadas como CNT en la figura).

La **Figura 4** representa huevos de nematodo de los nudos de la raíz por planta tratada con el producto

SERENADE SOIL[®], independientemente o en combinación con el producto INLINE (con los principios activos de 1,3-dicloropropeno + cloropicrina) en comparación con plantas no tratadas (designadas como CNT) y plantas tratadas solo con el producto INLINE. Los diferentes tratamientos indicados en la Tabla 2 se designan como T1, T2, T3 y T4 en la figura.

La **Figura 5** representa penetración de nematodos de los nudos de la raíz por raíz de planta (Figura 5A) y desarrollo de nematodos de los nudos de la raíz por raíz de planta (Figura 5B) tratada con cultivo completo de AQ713 y expuesta a nematodos juveniles a los intervalos de día 1, día 6, día 9 y día 14 (T1, T6, T9 y T14). En la Figura 5A, la línea punteada representa el control no tratado ("CNT") mientras que la línea sólida representa tratamiento con AQ713.

La **Figura 6** representa el total de huevos producidos por nematodo de los nudos de la raíz por raíz de planta después de que las plantas se rociasen con cultivo completo de AQ713 en el día 0 (T0) y se expusieran a nematodos tras 1, 2, o 3 semanas (T7, T14, o T21). El control no tratado (CNT) es la primera barra en cada par de barras proporcionadas para cada día de inoculación. La segunda barra en cada par representa los resultados con el tratamiento de AQ713.

La **Figura 7** representa el índice de agallas (Figura 7A) el total de huevos por raíz (Figura 7B), y el peso de los brotes frescos (Figura 7C) de plantas tratadas con aplicaciones únicas o múltiples del producto SERENADE[®] ASO.

La **Figura 8** representa el total de huevos por gramo de raíz para plantas tratadas con una aplicación única de SERENADE[®] ASO a diversas dosificaciones.

Descripción detallada de la invención

La siguiente descripción incluye información que puede ser útil para entender la presente invención. No es una admisión que cualquier información proporcionada en el presente documento es previa a la técnica o relevante para las invenciones reivindicadas actualmente, o que cualquier publicación referenciada específica o implícitamente referida es anterior a la técnica.

El producto SERENADE[®] (No. de registro de EPA 69592-12) contiene una única cepa, patentada, de *Bacillus subtilis* (cepa QST713) y muchos lipopéptidos diferentes que trabajan de manera sinérgica para destruir patógenos de enfermedades y proporcionar una actividad antimicrobiana superior. El producto SERENADE[®] se usa para proteger plantas tales como hortalizas, fruta, frutos secos y cultivos de vid frente a enfermedades tales como fuego bacteriano, botritis, podredumbre ácida, roya, esclerotinia, mildiú polvoroso, mancha bacteriana y moho blanco. Los productos SERENADE[®] se encuentran disponibles como formulaciones líquidas o secas que se pueden aplicar como tratamiento foliar y/o del suelo. Las copias de Etiquetas Maestras de EPA para los productos SERENADE[®], que incluyen SERENADE[®] ASO, SERENADE[®] MAX, y SERENADE SOIL[®], se encuentran públicamente disponibles a través del Sistema Nacional de Recuperación de Información de Pesticidas (NPIRS[®]) Sistema de Etiquetas de Productos Pesticidas (PPLS) USEPA/OPP.

SERENADE[®] ASO (Suspensión acuosa-orgánica) contiene el 1,34 % de QST713 seca como principio activo y el 98,66 % de otros ingredientes. SERENADE[®] ASO también está formulado para contener un mínimo de 1×10^9 ufc/g de QST713 mientras que se ha determinado que la máxima cantidad de QST713 es $3,3 \times 10^{10}$ ufc/g. Los nombres comerciales alternativos para SERENADE[®] ASO incluyen SERENADE BIOFUNGICIDE[®], SERENADE SOIL[®] y SERENADE[®] GARDEN DISEASE. Para información adicional, véase las Etiquetas Maestras de EPA de los EE.UU. para SERENADE[®] ASO con fecha de 4 de enero del 2010 y SERENADE SOIL[®].

SERENADE[®] MAX contiene el 14,6 % de QST713 seca como principio activo y el 85,4 % de otros ingredientes. SERENADE[®] MAX está formulado para contener un mínimo de $7,3 \times 10^9$ ufc/g de QST713 mientras que se ha determinado que la cantidad máxima de QST713 es $7,9 \times 10^{10}$ ufc/g. Para información adicional, véase las Etiquetas Maestras de EPA de los EE.UU. para SERENADE[®] MAX.

Bacillus subtilis QST713, sus mutantes, sus sobrenadantes, y sus metabolitos lipopeptídicos, y procedimientos para su uso para controlar patógenos de plantas e insectos se describen completamente en las Patentes de los EE.UU. N.º 6.060.051; 6.103.228; 6.291.426; 6.417.163; y 6.638.910. En estas patentes de los EE.UU., la cepa se cita como AQ713, que es sinónimo de QST713. *Bacillus subtilis* QST713 se ha depositado con NRRL el 7 de mayo de 1997, bajo las provisiones del Tratado de Budapest en el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos a los fines del Procedimiento en materia de patentes con el número de acceso B21661. Cualquier referencia en esta memoria descriptiva a QST713 hace referencia a *Bacillus subtilis* QST713 (también conocida como AQ713) tal como está presente en los productos SERENADE[®], depositado con el número de acceso de NRRL B21661, o preparado en biorreactores o matraz de agitación en condiciones que estimulan la producción del producto SERENADE[®].

Las patentes citadas anteriormente describen el ensayo de sobrenadante de cultivo completo de *Bacillus subtilis* QST713 contra la cepa N2 del nematodo *Caenorhabditis elegans*. Dichos ensayos demostraron que el sobrenadante carece de actividad nematocida.

En el momento de la presentación de la Solicitud de Patente de los EE.UU. N.º 09/074.870 en 1998, que corresponde con las patentes anteriores, la cepa QST713 fue designada como un *Bacillus subtilis* basándose en los procedimientos clásicos, fisiológicos, bioquímicos y morfológicos. La taxonomía de las especies de *Bacillus* ha

evolucionado desde entonces, especialmente a la luz de los avances en las tecnologías de genética y secuenciación, de modo que la designación de especie se basa principalmente en la secuencia de ADN en lugar de en los procedimientos usados en 1998. Tras alinear las secuencias de proteínas de *B. amyloliquefaciens* FZB42, *B. subtilis* 168 y QST713, aproximadamente el 95 % de las proteínas encontradas en *B. amyloliquefaciens* FZB42 son el 85 % o más de idénticas a proteínas halladas en QST713; mientras que sólo el 35 % de las proteínas en *B. subtilis* 168 son el 85 % o más de idénticas a las proteínas en QST713. Sin embargo, incluso con confianza en la genética, aún hay una ambigüedad taxonómica en la literatura científica relevante y los documentos regulatorios, que refleja el entendimiento en evolución de la taxonomía de *Bacillus* en los últimos 15 años. Por ejemplo, un producto pesticida basado en la cepa FZB24 de *B. subtilis*, la cual está tan estrechamente relacionada con QST713 como lo está FZB42, se clasifica en los documentos de la Agencia de Protección Ambiental como *B. subtilis* var. *amyloliquefaciens*. Debido a estas complejidades en la nomenclatura, esta especie particular de *Bacillus* se denomina de diversas formas, dependiendo del documento, como *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, y *B. subtilis* var. *amyloliquefaciens*. Por lo tanto, los inventores han mantenido la denominación *B. subtilis* de QST713 en lugar de cambiarla a *B. amyloliquefaciens*, como se podría esperarse actualmente basándose únicamente en la comparación de secuencias y en la taxonomía inferida.

Las composiciones de la presente invención se pueden obtener por cultivo de *Bacillus subtilis* QST713 de acuerdo con los procedimientos bien conocidos en la materia, que incluyen el uso de medios y otros procedimientos descritos en la Patente de EE.UU. N°. 6.060.051. Los procesos de cultivo microbiano a gran escala convencionales incluyen fermentación sumergida, fermentación en estado sólido, o cultivo en superficie líquida. Hacia el final de la fermentación, dado que los nutrientes disminuyen, las células de *Bacillus subtilis* comienzan la transición de fase de crecimiento a fase de esporulación, de manera que el producto final de fermentación es principalmente esporas, metabolitos y medio de fermentación residual. La esporulación es parte del ciclo de vida natural de *Bacillus subtilis* y generalmente se inicia por la célula en respuesta a la limitación de nutrientes. La fermentación se configura para obtener niveles altos de unidades formadoras de colonias de *Bacillus subtilis* y para promover la esporulación. Las células bacterianas, esporas y metabolitos en medio de cultivo que resultan de la fermentación se pueden usar directamente o se pueden concentrar por procedimientos industriales convencionales, tales como centrifugación, filtración por flujo tangencial, filtración de lecho profundo, y evaporación. El caldo de fermentación y el concentrado del caldo se citan en el presente documento como "productos de fermentación". Las composiciones de la presente invención incluyen los productos de fermentación. En algunas realizaciones, el caldo de fermentación concentrado se lava, por ejemplo, por medio del procedimiento de diafiltración, para eliminar el caldo de fermentación residual y los metabolitos.

El caldo de fermentación o concentrado de caldo se puede secar con o sin el agregado de vehículos usando procesos o procedimientos de secado convencionales tales como secado por pulverización, secado por congelación, secado en bandeja, secado en lecho fluidizado, secado en tambor, o evaporación.

Los productos de secado resultantes se pueden procesar adicionalmente, tal como por molido o granulación, para alcanzar un tamaño de partícula o formato físico específico. Los vehículos, descritos a continuación, se pueden agregar después del secado.

Las preparaciones sin células del caldo de fermentación de las nuevas variantes y cepas de *Bacillus* de la presente invención se pueden obtener por medio de cualquier medio conocido en la materia, tales como extracción, centrifugación y/o filtración del caldo de fermentación. Los expertos en la materia apreciarán que las denominadas preparaciones sin células pueden no estar desprovistas de células sino que más bien están principalmente sin células o esencialmente sin células, dependiendo de la técnica usada (por ejemplo, velocidad de centrifugación) para eliminar las células. La preparación sin células resultante se puede secar y/o formular con componentes que ayuden en su aplicación a plantas o para el medio de crecimiento de plantas. Los procedimientos de concentración y las técnicas de secado descritos anteriormente para el caldo de fermentación también se pueden aplicar a preparaciones sin de células.

Las composiciones de la presente invención pueden incluir inertes de formulación agregados a composiciones que comprenden células, preparaciones sin células o metabolitos para mejorar la eficacia, estabilidad, y utilidad y/o para facilitar el procesamiento, envasado y aplicación de uso final. Dichos inertes e ingredientes de formulación pueden incluir vehículos, agentes de estabilización, nutrientes, o agentes modificadores de propiedades físicas, que se pueden agregar individualmente o en combinación. En algunas realizaciones, los vehículos pueden incluir materiales líquidos tales como agua, aceite, y otros disolventes orgánicos e inorgánicos y materiales sólidos tales como minerales, polímeros, o complejos poliméricos derivados de síntesis biológica o química. En algunas realizaciones, el vehículo es un aglutinante o adhesivo que facilita la adherencia de la composición a una parte de la planta, tal como una semilla o raíz. Véase, por ejemplo, Taylor, A.G., y col., "Concepts and Technologies of Selected Seed Treatments", Annu. Rev. Phytopathol. 28: 321-339 (1990). Los agentes de estabilización pueden incluir agentes antiaglomerantes, agentes antioxidantes, desecantes, protectores y conservantes. Los nutrientes pueden incluir fuentes de carbono, nitrógeno, y fósforo tales como azúcares, polisacáridos, aceite, proteínas, aminoácidos, ácidos grasos y fosfatos. Los modificadores de propiedades físicas pueden incluir agentes aumentadores de volumen, tensioactivos, agentes anticongelantes o colorantes. En algunas realizaciones, la composición que comprende células, producida por fermentación se puede usar directamente con o sin agua como diluyente sin ninguna otra

preparación de formulación. En algunas realizaciones, los inertes de formulación se agregan después de concentrar el caldo de fermentación y durante y/o después del secado.

Las composiciones de la presente invención pueden incluir vehículos, que son ingredientes de formulación inertes agregados a composiciones que comprenden un producto de fermentación que contiene lipopéptido, preparaciones de lipopéptidos sin células o extractos purificados, semipurificados o crudos de lipopéptidos para mejorar la recuperación, la eficacia, o las propiedades físicas y/o para ayudar al empaquetado y administración. Dichos vehículos se pueden agregar individualmente o en combinación.

Las composiciones de la presente invención se pueden mezclar con y/o usar en rotación con otros aditivos, adyuvantes y/o tratamientos químicos y no químicos, en los que dichos tratamientos incluyen pero sin limitación fungicidas, insecticidas, miticidas, nematocidas, fertilizantes, nutrientes, minerales, auxinas, estimulantes del crecimiento químicos y no químicos y similares.

Los nematocidas con los cuales las composiciones basadas en *Bacillus subtilis* de la presente invención se pueden mezclar pueden ser nematocidas químicos o biológicos. El término "nematocida químico", tal como se usa en el presente documento, excluye fumigantes, y el término "fumigantes" abarca compuestos químicos pesticidas de amplio espectro que se aplican al suelo antes de la plantación y que difunden a través del suelo (en el aire del suelo y/o en el agua del suelo) y se pueden aplicar como gases, tales como bromuro de metilo, líquidos volátiles, tal como cloropicrina, o sólidos volátiles, tal como dazomet.

En algunas realizaciones, el nematocida químico o biológico es un producto formulado disponible comercialmente y se mezcla en tanque y/o se usa en rotación con las composiciones de la presente invención. En otras realizaciones, el principio activo (sin inertes) del nematocida químico o biológico se mezcla con la composición basada en *Bacillus subtilis* QST713 antes de la formulación (con inertes) de manera que las composiciones formen un producto formulado.

Los nematocidas químicos que usados en tales mezclas o los programas de rotación son carbamatos, carbamatos de oximas y nematocidas organofosforados. Los nematocidas de carbamatos incluyen benomil, carbofurano (FURADAN®), carbosulfán y cloetocarb. Los carbamatos de oximas incluyen alanicarb, aldicarb (TEMIK®), o como parte del tratamiento completo para semillas AVICTA®, de Syngenta), aldoxicarb (STANDAK®), oxamil (VYDATE®), tiodicarb (parte del sistema para tratar semillas AERIS®, de CropScience) y el tirpato. Los nematocidas organofosforados incluyen fensulfotión (DANSANIT®), etoprop, (MOCAP®), diamidafos, fenamifos, fostietano, fosfamidón, cadusafos, clorpirifos, diclofentión, dimetoato, fostiazato, heterofos, isamidofos, isazofos, forato, fosfocarb, terbufos, tionazina, triazofos, imiciafos y mecarfón. Los nombres entre paréntesis después de cada compuesto son formulaciones comerciales representativas de cada compuesto químico anterior. Otros nematocidas químicos útiles para tales mezclas incluyen espirotetramat (MOVENTO®), el nematocida MON37400 y fipronilo.

Los nematocidas biológicos usados en tales mezclas o programas de rotación incluyen las mezclas de quitina y urea, los extractos de compost y téis (tanto aireado como no aireado); las composiciones que comprenden el hongo *Myrothecium verrucaria* y/o sus metabolitos (disponible comercialmente de DITERA®), las composiciones que comprenden el hongo *Paecilomyces lilacinus* (que se encuentran disponibles comercialmente, por ejemplo, como MELOCON® o BIOACT); las composiciones que comprenden bacterias del género *Pasteuria*, incluyendo *P. usgae* (disponibles comercialmente, por ejemplo, como ECONEM®), las composiciones que comprenden las bacterias *Bacillus* sp., incluyendo *Bacillus firmus* (incluyendo la cepa depositada como CNMC I-1582 en la Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos del Instituto Pasteur, Francia, el 29 de mayo de 1995, y disponible comercialmente, por ejemplo, como VOTIVO®), *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus pumilus* (incluyendo la cepa depositada con NRRL como B-30087 el 14 de enero de 1999 y sus mutantes) y *Bacillus cereus*; y composiciones que comprenden al nematocida *Streptomyces* sp., tales como *Streptomyces lydicus* (disponible comercialmente como ACTINOVATE®). Los nematocidas biológicos también incluyen los nematocidas de origen botánico, tales como los productos que derivan de la planta de neem (incluyendo semillas o aceite de las plantas), azadiractina, que es un metabolito secundario de las semillas de neem, productos basados en el aceite de sésamo (tales como DRAGONFIRE®), el carvacrol y productos basados en extractos vegetales (tales como NEMA-Q®, que se obtiene del árbol *Quillaja saponaria*, de Chile). Los nematocidas biológicos también incluyen los compuestos aislados producidos por bacterias, tales como las mectinas, que se producen por *Streptomyces avermentilis*, incluyendo abamectina (que consiste en una combinación de las abamectinas B1a y B1b) y la avermectina B2a, y las proteínas en horquilla, identificadas originalmente en *Erwinia amylovora*, que incluyen la proteína en horquilla EA y la proteína en horquilla αβ.

Las composiciones de la presente invención son útiles para controlar los nematodos parásitos de plantas, tales como, por ejemplo, los nematodos de los nudos de las raíces, los de los quistes, los de las lesiones y los de los anillos, que incluyen *Meloidogyne* spp., *Heterodera* spp., *Globodera* spp., *Pratylenchus* spp. y *Criconebella* sp. Las composiciones también son útiles para controlar *Tylenchulus semipenetrans*, *Trichodorus* spp., *Longidorus* spp., *Rotylenchulus* spp., *Xiphinema* spp., *Belonolaimus* spp. (tales como *B. longicaudatus*), *Criconemoides* spp., *Tylenchorhynchus* spp., *Hoplolaimus* spp., *Rotylenchus* spp., *Helicotylenchus* spp. (por ejemplo, *Helicotylenchus pseudorobustus* (HP espiralado) y *Helicotylenchus digonicus* (HD espiralado)), *Radopholus* spp. (tales como *R. citrophilis* o *R. similis*), *Ditylenchus* spp., *Paratrichodorus* spp. y otros nematodos parásitos de plantas. En algunas

realizaciones, las dianas son los nematodos de los quistes, tales como *Heterodera glycines* (el nematodo de los quistes de la soja), *Heterodera schachtii* (el nematodo de los quistes de la remolacha), *Heterodera avenae* (el nematodo de los quistes de los cereales), *Meloidigyne incognita* (el nematodo de los nudos de las raíces del sur o del algodón), *Globodera rostochiensis* o *Globodera pallida* (los nematodos de los quistes de la patata). En otras realizaciones, las dianas son los nematodos de los nudos de las raíces, tales como *M. incognita* (el nematodo de los nudos de las raíces del algodón), *M. javanica* (el nematodo de los nudos de las raíces de Java), *M. hapla* (el nematodo de los nudos de las raíces del norte) o *M. arenaria* (el nematodo de los nudos de las raíces del cacahuete).

El término “control”, tal como se usa en el presente documento, significa eliminar, reducir en número y/o reducir su crecimiento, alimentación o desarrollo fisiológico normal, incluyendo, para los nematodos de los nudos de las raíces, la capacidad de penetrar en las raíces y de desarrollarse en ellas. Una cantidad eficaz es una cantidad capaz de reducir notablemente el crecimiento, la alimentación en raíces, la penetración en raíces, la maduración en la raíz y/o el desarrollo fisiológico general de los nematodos y/o los síntomas del hospedador vegetal que son resultado de la infección por nematodos, tales como la formación de agallas o el crecimiento reducido de las raíces y/o de la planta. En algunas realizaciones, los síntomas y/o los nematodos se reducen al menos aproximadamente el 5 %, al menos aproximadamente el 10 %, al menos aproximadamente el 20 %, al menos aproximadamente el 30 %, al menos aproximadamente el 40 %, al menos aproximadamente el 50 %, al menos aproximadamente el 60 %, al menos aproximadamente el 70 %, al menos aproximadamente el 80 % o al menos aproximadamente el 90 %.

Las composiciones de la presente invención se usan para tratar una amplia variedad de cultivos agrícolas u hortícolas, que incluyen los que se desarrollan para semillas, productos o paisajismo. Las plantas representativas que se pueden tratar usando las composiciones de la presente invención incluyen, sin limitaciones, las siguientes: verduras bulbosas; granos de cereal; frutos cítricos (tales como el pomelo, el limón o la naranja); el algodón y otros cultivos de fibras; cucurbitáceas; vegetales frutíferos; verduras de hoja (tales como el apio, las lechuga arrepollada y la de hoja verde, y la espinaca); legumbres; cultivos de semillas oleaginosas; cacahuete; fruta pomácea (tales como la manzana y la pera); frutas con hueso (tales como la almendra, la pecana y la nuez); verduras de raíz; tubérculos; verduras cormosas; tabaco; fresa y otras bayas; cultivos de col (tales como el brócoli y el repollo); uva; piña; plantas con flor y plantas de jardín u ornamentales (tales como el helecho o la hiedra). Las composiciones de la presente invención también se usan para tratar plantas perennes, que incluyen cultivos tales como la banana y el café y aquellas presentes en los bosques, en parques o en paisajismo.

Las composiciones descritas en el presente documento se aplican sobre una planta, sobre una parte de una planta, tal como una semilla, una raíz, un rizoma, un cormo, un bulbo o un tubérculo, y/o sobre una parte sobre la que se desarrolla una planta o una parte de una planta, tal como el suelo con el fin de controlar los nematodos parásitos de las plantas. Las composiciones de la presente invención se pueden administrar como un pulverizador foliar, como un tratamiento de semillas/raíces/tubérculos/rizomas/bulbos/cormos y/o como un tratamiento del suelo. Las semillas/raíces/tubérculos/rizomas/bulbos/cormos se pueden tratar antes de la plantación, durante la plantación o después de la plantación.

Las composiciones descritas en el presente documento también se aplican a una planta, una parte de una planta, tal como una semilla, una raíz, un rizoma, un cormo, un bulbo o un tubérculo, y/o sobre una parte donde crece una planta o una parte de una planta, tal como el suelo, con el fin de controlar los nematodos, aumentando así el rendimiento de los cultivos. En algunas realizaciones, el rendimiento de los cultivos aumenta al menos aproximadamente el 5 %, en otras, al menos el 10 %, y en otras más, al menos aproximadamente el 15 %, y en otras más, al menos aproximadamente el 20 %.

Cuando se usan como un tratamiento para semillas, las composiciones de la presente invención se aplican a una tasa de entre aproximadamente 1×10^2 y aproximadamente 1×10^9 ufc/semilla, dependiendo del tamaño de la semilla. En algunas realizaciones, la tasa de aplicación es entre aproximadamente 1×10^3 y aproximadamente 1×10^8 ufc/semilla o entre aproximadamente 1×10^4 y aproximadamente 1×10^7 ufc/semilla.

Las presentes composiciones también se pueden aplicar como una sumersión de la raíz a una tasa de aproximadamente 1×10^3 a aproximadamente 1×10^8 ufc/sistema radicular de planta.

Cuando se usan como tratamiento para suelo, las composiciones de la presente invención se pueden aplicar embebiendo la superficie del suelo, por vástago, inyectadas y/o aplicadas en surco o por mezcla con el agua de riego. La tasa de aplicación para los tratamientos de suelo por embebida, que se pueden aplicar en la plantación, durante o después de la siembra, o después del trasplante y en cualquier etapa del crecimiento de la planta, es entre aproximadamente 4×10^7 y aproximadamente 8×10^{14} ufc por 4050 m^2 ($1,62 \times 10^7$ a $3,24 \times 10^{14}$ ufc por hectárea) o entre aproximadamente 4×10^9 y aproximadamente 8×10^{13} ufc por 4050 m^2 ($1,62 \times 10^9$ a $3,24 \times 10^{13}$ ufc por hectárea) o entre aproximadamente 4×10^{11} y aproximadamente 8×10^{12} ufc por 4050 m^2 ($1,62 \times 10^{11}$ a $3,24 \times 10^{12}$ ufc por hectárea) o entre aproximadamente 2×10^{12} y aproximadamente 6×10^{13} ufc por 4050 m^2 ($8,09 \times 10^{11}$ a $2,43 \times 10^{13}$ ufc por hectárea) o entre aproximadamente 2×10^{12} y aproximadamente 3×10^{13} ufc por 4050 m^2 ($8,09 \times 10^{11}$ a $1,21 \times 10^{13}$ ufc por hectárea). En algunas realizaciones, la tasa de aplicación es entre aproximadamente 1×10^{12} y aproximadamente 6×10^{12} ufc por 4050 m^2 ($4,05 \times 10^{11}$ a $2,43 \times 10^{12}$ ufc por hectárea) o entre aproximadamente 1×10^{13} y aproximadamente 6×10^{13} ufc por 4050 m^2 ($4,05 \times 10^{12}$ a $2,43 \times 10^{13}$). La tasa de aplicación para tratamientos

- en surco, aplicados en la plantación, es entre aproximadamente $2,5 \times 10^{10}$ y aproximadamente 5×10^{11} ufc cada 93 metros cuadrados ($7,6 \times 10^9$ a $1,52 \times 10^{11}$ ufc por metro de fila). En algunas realizaciones, la tasa de aplicación es entre aproximadamente 6×10^{10} y aproximadamente 3×10^{12} ufc cada 93 metros cuadrados ($1,83 \times 10^{10}$ a $9,1 \times 10^{11}$ ufc por 100 metros de fila) o entre aproximadamente 6×10^{10} y aproximadamente 4×10^{11} ufc cada 93 metros cuadrados ($1,83 \times 10^{10}$ a $1,22 \times 10^{11}$ ufc por 100 metros de fila) o entre aproximadamente 6×10^{11} y aproximadamente 3×10^{12} ufc cada 93 metros cuadrados ($1,83 \times 10^{12}$ a $9,1 \times 10^{11}$ ufc por 100 metros de fila) o entre aproximadamente 6×10^{11} y aproximadamente 4×10^{12} ufc cada 93 metros cuadrados ($1,83 \times 10^{11}$ a $1,22 \times 10^{12}$ ufc por 100 metros de fila). Los expertos en la materia entenderán cómo ajustar las tasas para tratamientos comunes y otros tratamientos de suelo menos comunes.
- Las composiciones de la presente invención se pueden introducir al suelo antes de la plantación o antes de la germinación de la semilla. Las composiciones de la presente invención también se pueden introducir al suelo en contacto con las raíces de la planta, al suelo en la base de la planta, o al suelo alrededor de la base de la planta (por ejemplo, a una distancia de aproximadamente 5 cm, aproximadamente 10 cm, aproximadamente 15 cm, aproximadamente 20 cm, aproximadamente 25 cm, aproximadamente 30 cm, aproximadamente 35 cm, aproximadamente 40 cm, aproximadamente 45 cm, aproximadamente 50 cm, aproximadamente 55 cm, aproximadamente 60 cm, aproximadamente 65 cm, aproximadamente 70 cm, aproximadamente 75 cm, aproximadamente 80 cm, aproximadamente 85 cm, aproximadamente 90 cm, aproximadamente 95 cm, aproximadamente 100 cm, o más alrededor o por debajo de la base de la planta). Las composiciones se pueden aplicar utilizando una variedad de técnicas que incluyen, pero sin limitación, riego por goteo, por vástago, inyección del suelo o embebida del suelo. Las composiciones también se pueden aplicar al suelo y/o plantas en bandejas de siembra o plántulas antes de trasplantar a un diferente sitio de plantado. Cuando se aplica al suelo en contacto con las raíces de la planta, en la base de la planta, o al suelo a una distancia específica alrededor de la base de la planta, que incluye como un tratamiento por embebida del suelo, la composición se puede aplicar como una aplicación única o como aplicaciones múltiples. Las composiciones se pueden aplicar a las tasas indicadas con anterioridad para tratamientos por embebida o en una relación de entre aproximadamente 1×10^5 y aproximadamente 1×10^8 ufc por gramo de suelo, entre 1×10^5 y aproximadamente 1×10^7 ufc por gramo de suelo, entre 1×10^5 y aproximadamente 1×10^6 ufc por gramo de suelo, entre 7×10^5 y aproximadamente 1×10^7 ufc por gramo de suelo, entre 1×10^6 y aproximadamente 5×10^6 ufc por gramo de suelo, o entre 1×10^5 y aproximadamente 3×10^6 ufc por gramo de suelo. En una realización, las composiciones de la presente invención se aplican como una aplicación única en una relación de entre aproximadamente 7×10^5 y aproximadamente 1×10^7 ufc por gramo de suelo. En otra realización, las composiciones de la presente invención se aplican como una aplicación única a una tasa de entre aproximadamente 1×10^6 y aproximadamente 5×10^6 ufc por gramo de suelo. En otras realizaciones, las composiciones de la presente invención se aplican como aplicaciones múltiples en una relación de entre aproximadamente 1×10^5 y aproximadamente 3×10^6 ufc por gramo de suelo.
- Cuando las composiciones de la presente invención se aplican como aplicaciones múltiples, estas aplicaciones pueden hacerse a intervalos de entre aproximadamente 1 y aproximadamente 28 días, de entre aproximadamente 1 y aproximadamente 21 días, de entre aproximadamente 1 y aproximadamente 14 días, de entre aproximadamente 7 y aproximadamente 28 días, de entre aproximadamente 7 y aproximadamente 21 días, de entre aproximadamente 7 y aproximadamente 14 días, o de entre aproximadamente 10 y aproximadamente 18 días.
- Las composiciones basadas en *Bacillus subtilis* de la presente invención se pueden aplicar independientemente o en combinación con uno u otros nematocidas más, tales como nematocidas químicos o biológicos. En algunas realizaciones, *Bacillus subtilis* QST713 está coformulado con al menos un otro nematocida y el producto coformulado se aplica a la planta o al sitio de la planta. En algunas otras realizaciones, las composiciones basadas en *Bacillus subtilis* se mezclan en tanque con formulaciones disponibles comercialmente de los nematocidas químicos o biológicos y se aplican a plantas y lugares de plantas. En otras realizaciones, las composiciones basadas en *Bacillus subtilis* de la presente invención se aplican a plantas y/o lugares de plantas inmediatamente antes o después de las formulaciones disponibles comercialmente de nematocidas químicos o biológicos. En otras realizaciones, las composiciones basadas en *Bacillus subtilis* de la presente invención se aplican a plantas y/o lugares de plantas en rotación con las formulaciones disponibles comercialmente de los nematocidas químicos o biológicos. En un programa de rotación que implica varias aplicaciones de nematocidas, las composiciones de la presente invención se pueden aplicar solas o en combinación con otros nematocidas. En un caso, las composiciones basadas en *Bacillus subtilis* se aplican como un tratamiento para semillas o como un tratamiento en surco o por embebida, tal como se expone con más detalle a continuación.
- Si bien los inventores no desean estar ligados a ninguna teoría en particular, se cree que el *Bacillus subtilis* QST713 controla los nematodos por Resistencia Sistémica Inducida (RSI) en las plantas tratadas. Para una explicación de RSI, véase Bakker, P.A.H.M., "Induced Systemic Resistance by Fluorescent *Pseudomonas* spp." *Phytopathology* 97(2): 239- 243 (2007). La RSI puede tener efecto sólo después de cierto período de demora entre el tiempo del tratamiento con *Bacillus subtilis* QST713 y la posterior exposición de la planta a los nematodos. En algunas realizaciones las composiciones basadas en *Bacillus subtilis* se aplican en combinación con un segundo nematocida durante la plantación y las composiciones basadas en *Bacillus subtilis* se aplican solas o en combinación con otro nematocida en posteriores aplicaciones. El tratamiento inicial con el segundo nematocida puede proteger a la planta durante el período de retraso hasta que las composiciones basadas en *Bacillus subtilis* hayan desencadenado la RSI. En algunos casos de las realizaciones anteriores, la formulación disponible comercialmente del segundo

nematicida químico o biológico se aplica a una tasa por debajo de la recomendación de la etiqueta para su uso como un tratamiento nematicida independiente. En una realización, se aplica *Bacillus subtilis* QST713 con oxamil (VYDATE®) durante la plantación y se aplica *Bacillus subtilis* QST713 solo en aplicaciones posteriores.

En otras realizaciones, las composiciones basadas en *Bacillus* de la presente invención se aplican a las plantas y/o lugares de plantas luego de la aplicación de un fumigante. Los fumigantes se pueden aplicar por inyección de vástago, generalmente un mínimo de 20,3 centímetros por debajo de la superficie del suelo. Las formulaciones líquidas de fumigantes también se pueden aplicar por medio de quimigación por goteo superficial para mover el fumigante a una profundidad de 20,3 centímetros o más por debajo de la superficie del suelo. Los lechos del suelo tratado se cubren con una lona de plástico para mantener el fumigante en el suelo durante varios días. Esto se hace antes de la plantación y se permite la aireación antes de la plantación. Las composiciones basadas en *Bacillus* descritas en el presente documento se aplicarían después del período de aireado antes de, durante el tiempo de, o después de la plantación. En algunos casos, los fumigantes se aplican a una tasa que es menor que la tasa recomendada en la etiqueta del producto.

Los nematicidas químicos y biológicos se han descrito anteriormente. Los nematicidas fumigantes incluyen hidrocarburos halogenados, tales como cloropirina (CHLOR-O-PIC); bromuro de metilo (METH-O-GAS) y combinaciones de los mismos (tal como BROM-O-GAS y TERR-O-GAS); 1,3-dicloropropeno (TELONE II, TELONE EC, CURFEW) y combinaciones de 1,3-dicloropropeno con cloropirina (TELONE C-17, TELONE C-35, e INLINE); yoduro de metilo (MIDAS); liberadores de isocianato de metilo, tales como metilditiocarbamato de sodio (VAPAM, SOILPREP, METAM-SODIUM); combinaciones de 1,3 dicloropropeno e isotiocianato de metilo (VORLEX); y liberadores de disulfuro de carbono, tales como tetratiocarbonato (ENZONE); y disulfuro de dimetilo o DMDS (PALADINO). Los ejemplos de formulaciones comerciales de cada uno de los fumigantes anteriores se proporcionan entre paréntesis después del o los nombres químicos.

Las composiciones de la presente invención también se pueden aplicar como parte de un programa de manejo integrado de plagas ("MIP"). Dichos programas se describen en diversas publicaciones, especialmente por extensión cooperativa de universidades. Dichos programas incluyen la rotación de cultivos con cultivos que no pueden hospedar al nematodo diana, prácticas de cultivo y de labranza, y uso de trasplantes. Por ejemplo, las composiciones basadas en *Bacillus* se podrían aplicar tras una temporada de crecimiento con mostaza u otro cultivo represor de nematodos.

En algunas realizaciones, la aplicación de las composiciones de la presente invención a plantas, partes de plantas o lugares de plantas está precedida por identificación de un sitio con necesidad de tratamiento. Dicha identificación puede tener lugar por medio de identificación visual de plantas que aparecen cloróticas, achaparradas, necróticas, o marchitadas (es decir, que parecen tener deficiencias de nutrientes) típicamente acoplada con el conocimiento de una historia de problemas de nematodos; muestreo de la planta; y/o muestreo del suelo. El muestreo de la planta puede tener lugar durante la temporada de crecimiento o inmediatamente después de la cosecha final. Las plantas se retiran del suelo y se examinan sus raíces para determinar la naturaleza y extensión del problema con los nematodos en un campo. Para el nematodo de los nudos de la raíz, la severidad de la formación de agallas en la raíz se determina mediante medida de la proporción del sistema radicular que forma las agallas. Las agallas generadas por los nematodos de los nudos de la raíz se pueden distinguir de los nódulos de las bacterias fijadoras de nitrógeno del suelo debido a que las agallas no se separan fácilmente de la raíz. Los niveles de población de nematodos de los nudos de la raíz aumentan con la gravedad de las agallas en la raíz. En algunos casos, la detección de cualquier nivel de formación de agallas en raíces sugiere un problema con nematodos de los nudos de la raíz para plantar cualquier cultivo susceptible, especialmente en el área o cerca del área de muestreo. Los nematodos císticos también se pueden identificar mediante muestreo de plantas y observación de quistes en las raíces.

El muestro de suelo ofrece un medio para determinar el número de nematodos y/o de huevos de nematodos que infestan un cierto volumen de suelo o raíces. El muestreo de suelo se puede realizar cuando primero se sospecha de un problema, en la cosecha final, o cualquier momento antes de plantar un nuevo cultivo, que incluye antes de la destrucción del cultivo del cultivo previo. Los programas de extensión cooperativos de universidades ofrecen servicios de muestreo de suelos, que incluyen la Universidad de Florida, la Universidad del estado de Oregón y la Universidad de Nebraska-Lincoln. Adicionalmente, dichos programas proveen normativas de cómo recolectar muestras. Por ejemplo, en un procedimiento de muestreo predictivo postcosecha, las muestras se recolectan a una profundidad del suelo de entre 15,2 y 25,4 centímetros entre 10 y 20 lugares del campo en 5 ó 10 acres (1 acre = 4050 m²) (dependiendo del valor del cultivo, con unos pocos acres muestreados para cultivos de mayor valor) en un patrón en zig-zag regular. En un procedimiento para ensayar plantas establecidas, se extraen muestras de raíces y suelo a una profundidad de entre 15,2 y 25,4 pulgadas de las plantas de las que se sospecha que son sintomáticas pero no están muertas ni muriendo, es decir, descomponiéndose.

En algunas realizaciones, la identificación implica determinar si se ha alcanzado un umbral económico de infestación por nematodos; es decir, un punto en el cual las pérdidas económicas esperadas sin tratamiento exceden a los costes de tratamiento. El umbral económico varía dependiendo del cultivo, de la geografía, del clima, del tiempo de sembrado, del tipo de suelo, y/o de la temperatura del suelo. Se han publicado numerosos trabajos sobre este tema y hay disponibles guías de programas de extensión cooperativa de universidades en diferentes áreas. Véase, por

ejemplo, Robb, J.G., *et al.*, "Factors Affecting the Economic Threshold for *Heterodera schachtii* Control in Sugar Beet", Economics of Nematode Control Enero-Junio 1992; Hafez, Saad L., "Management of Sugar Beet Nematode," University of Idaho Current Information Series (CIS) 1071 (1998); y *UC MIP Pest Management Guidelines: Tomato* UC ANR Publication 3470 Nematodes A. Ploeg, Nematology, UC Riverside (Enero 2008). El determinar el umbral económico para un cultivo particular en un momento particular del año se encuentra bien dentro de la experiencia de un experto en la materia.

En algunas realizaciones, el muestreo de suelo revela que la infestación por nematodos producirá un rendimiento que es aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 90 %, o aproximadamente el 95 % del normal para suelo no infestado.

En algunas realizaciones, el umbral económico para juveniles del nodo de la raíz por kilogramo de muestra de suelo es al menos aproximadamente 250, al menos aproximadamente 300, al menos aproximadamente 500, al menos aproximadamente 750, al menos aproximadamente 1000, al menos aproximadamente 2000, al menos aproximadamente 3000, al menos aproximadamente 4000, al menos aproximadamente 5000, o al menos aproximadamente 6000.

En algunas realizaciones, el límite económico de huevos y larvas de nematodos císticos por cada 1 cm³ de suelo es al menos aproximadamente 0,5, al menos aproximadamente 1, al menos aproximadamente 2, al menos aproximadamente 3, al menos aproximadamente 4. De acuerdo a Hafez (1998), citado anteriormente, se puede estimar un quiste como 500 huevos y larvas viables.

Los siguientes ejemplos se dan con intenciones puramente ilustrativas de la presente invención.

Ejemplos

Ejemplo 1

Actividad de *Bacillus subtilis* QST713 sobre *Meloidogyne javanica*

Se llevaron a cabo estudios con semillas de pepinos de la variedad Sultan para determinar la actividad de QST713 sobre el nematodo de los nudos de las raíces *Meloidogyne javanica*. Los tubos de centrifugación de 50 ml que contenían 20 g de arena y una semilla sin germinar, trataron con diversas tasas de un caldo completo de QST713 o del producto disponible comercialmente SERENADE® ASO. El caldo completo y el producto SERENADE® ASO difieren en que el producto es mucho más concentrado en términos de unidades formadoras de colonias (ufc) y de metabolitos, teniendo el producto al menos 1 log mayor de ufc que el caldo completo. Además, el producto se formula con, entre otras cosas, conservantes, por lo que resulta más ácido que el caldo completo. Para obtener cultivos de caldo completo, los matraces de cultivo que contienen caldo Luria (LB, del inglés *Luria broth*) se inocularon con QST713 y se dejó crecer durante la noche a 30 °C. Al día siguiente, se inocularon alícuotas de cada matraz de cultivo en 200 ml de un medio basado en soja en un matraz de agitación de 1 l y se dejó crecer hasta la esporulación. Brevemente, el cultivo del matraz de agitación se mantuvo a una temperatura de entre 30 °C y 32 °C y en un agitador programado de 200 a 220 rpm. Tras aproximadamente 3 días, cuando se había detenido el crecimiento de las células y la producción de metabolito, se recolectó el caldo del cultivo. Se permitió que las semillas tratadas germinaran y se las cultivó en el invernadero. Entre cuatro y cinco días después del tratamiento (DDT), cada tubo se inoculó con 100 nematodos de los nudos de las raíces juveniles de la segunda etapa. 10 DDT, se determinó el porcentaje de agallas en las raíces de las plántulas sobre una escala de entre 0 y 4, tal como se describe en la tabla 1.

Después se tiñeron las raíces con fucsina ácida para determinar la penetración y el desarrollo de los nematodos y se observaron bajo un microscopio de disección Leica. Para la penetración de los nematodos, se determinó la cantidad total de nematodos juveniles en el interior de cada raíz. Para el desarrollo de los nematodos, se determinó la cantidad total de nematodos juveniles hinchados, incluyendo los juveniles del segundo estadio (J2) y los juveniles del tercer estadio (J3). La penetración de los nematodos en las raíces y el desarrollo de los nematodos después de la penetración se punturaron tal como se detalla en la tabla 1. Para los detalles sobre las técnicas usadas, véase C. O. Omwega y col., "A Nondestructive Technique for Screening Bean Germ Plasm for Resistance to *Meloidogyne incognita*", Plant Disease (1988) 72(11): 970-972.

Tabla 1. Esquema para calificar la actividad antagónica de nematodos de caldos completos de las bacterias. El índice de formación de agallas se basó en el porcentaje de formación de agallas en las raíces. La escala de la penetración se calculó como la cantidad total media de nematodos juveniles en relación con la cantidad de nematodos juveniles en el control sin tratar (CNT). La escala del desarrollo refleja la cantidad total de nematodos juveniles hinchados (estadio J2 tardío/estadio J3) en el interior de la raíz.

Índice de formación de agallas		Escala de penetración		Escala del desarrollo	
0	Ninguna	0	Ninguna	0	Ninguno
1	1-24 %	1	1-10 %	1	1-3

(continuación)

Índice de formación de agallas		Escala de penetración		Escala del desarrollo	
2	25-49 %	2	11-50 %	2	3-10
3	50-74 %	3	51-75 %	3	11-30
4	>75 %	4	76-100 %	4	>30

La figura 1 muestra que la aplicación del caldo completo de QST713 disminuye la cantidad de agallas en las raíces. La figura 2 muestra que la aplicación a diversas tasas del producto SERENADE® ASO disminuye la cantidad de agallas en las raíces, la penetración y el desarrollo, en comparación con el control sin tratar. Cabe destacar que, debido a que los datos se basan en el sistema de calificación anterior, no siempre es posible observar la respuesta a la dosis.

Ejemplo 2

Eficacia de AQ713 en el control de los huevos de los nematodos de los nudos de las raíces en tomates

Se llevó a cabo otro experimento con semillas de tomate para probar la eficacia de QST713 sobre los huevos de los nematodos de los nudos de las raíces. El lote 1 de AQ713 fue un caldo completo de un cultivo que se preparó tal como se describe en el ejemplo 1. Los lotes 2 y 3 de AQ713 se prepararon en un biorreactor. Brevemente, se descongeló un frasco que contenía un cultivo madre y se lo transfirió a un matraz esterilizado que contenía un caldo nutritivo Difco. Después se incubó el matraz de cultivo en un agitador rotativo, a una temperatura de entre 28 °C y 32 °C y con una velocidad de rotación de entre 200 y 220 rpm, para promover el crecimiento de las células y obtener una densidad elevada de células y después se añadió a 12 l de un medio de cultivo basado en soja en un biorreactor de 20 l. El biorreactor se programó a una temperatura de entre 30 °C y 32 °C, la agitación se programó entre 500 y 1000 rpm, el pH se tamponó entre 6 y 8, y la aireación se fijó entre 0,5 y 1,0 VVM. Después de aproximadamente 3 días de incubación, cuando se había detenido el crecimiento de las células y la producción de metabolito, se recolectó el caldo de cultivo. Se trataron plantas de tomate de tres semanas de edad embebiéndolas con QST713. Posteriormente, las macetas se mantuvieron en un invernadero durante diez días, antes de inocularlas con 5000 huevos de los nematodos de los nudos de las raíces ("RKN", del inglés *root-knot nematode*) por maceta. Las plantas se recolectaron cuarenta y dos días después de inocular los nematodos. Los huevos se recogieron de las raíces de las plantas de tomate usando una solución de NaOCl al 1 %, tal como se detalla en Hussey RS, Barker KR, "A Comparison of Methods of Collecting Inocula of *Meloidogyne* spp., Including a New Technique", Plant Disease Reporter, 1973; 57:1025–1028. AQ713 disminuyó el número de huevos de los nematodos de los nudos de las raíces que se observaron en cada planta. Los datos representan los conteos directos de los huevos, en lugar de un sistema de calificación. En la figura 3 se ilustra la comparación de los resultados con una muestra sin tratar (CNT).

Ejemplo 3

Eficacia del producto SERENADE SOIL® frente a diversos nematodos

Se llevaron a cabo estudios de "bolsas enterradas" para determinar la eficacia del producto SERENADE SOIL® sobre nematodos de diversos tipos en un campo con fresas. Los estudios basados en bolsas enterradas frecuentemente se emplean para determinar la eficacia de los tratamientos de suelos, especialmente de los fumigantes. Se colocó una muestra de suelo que contenía una concentración conocida de los nematodos en bolsas de malla de nylon y se enterraron en un campo sembrado con fresas, a una profundidad aproximada de entre quince y veinte centímetros. Se aplicaron los diversos tratamientos tal como se muestra en la tabla 2. El producto INLINE se usó como control positivo o en combinación con el producto SERENADE SOIL®.

Tabla 2

Tratamiento N°	Nombre del tratamiento	Relación	Código de la aplicación	Fecha de la aplicación
1	Control sin tratar	-	-	
2	Serenade Soil®	4 qt/ac	BCD	24/11/11, 27/1/11, 1/4/11
3	Inline seguido por Serenade Soil®	20 gal/ac 4 qt/ac	A BCD	3/11/10 24/11/10, 27/1/11, 1/4/11
4	Inline	20 gal/ac	A	3/11/10

Las bolsas se recogieron el 8 de diciembre de 2010, después del tratamiento B, y se contaron los nematodos (los adultos y las larvas). Los resultados se muestran a continuación.

Nematodo analizado	Control sin tratar	4 qt de Serenade Soil®	20 gal de Inline	20 gal de Inline más 4 qt de Serenade Soil®
Nematodo de los nudos de las raíces (<i>Meloidogyne</i>)	578 a	69 b	18 b	20 b
Nematodo de los anillos (<i>Criconebella</i>)	1,322 a	36 b	10 b	10 b
Nematodo con forma de alfiler (<i>Paratylenchus</i>)	15 a	2 a	11 a	6 a

Las medias seguidas por una misma letra no difieren de manera significativa con $p = 0,05$ (Student-Newman-Kewls).

5 Unas pocas semanas después de la última aplicación que se muestra anteriormente, se retiraron algunas plantas de las macetas y se analizaron sus raíces para determinar la cantidad de nematodos de los nudos de las raíces tal como se describe en el ejemplo 2. La figura 4 muestra que todos los tratamientos redujeron la cantidad de huevos de los nematodos de los nudos de las raíces por raíz.

10 En experimentos posteriores, se demostró el que producto SERENADE SOIL® es eficaz para controlar *Paratrichodorus* sp. y *Paratylenchus* sp. en las plantas de patata, en comparación con los controles sin tratar. También se demostró que el producto SERENADE SOIL® presenta actividad frente a *Helicotylenchus pseudorobustus* (HP espiralado), frente a *Helicotylenchus digonicus* (HD espiralado) y frente a *Criconebella* sp. en las plantas de fresa, y frente a *Criconeboides* sp. en las plantas de tomate y frente a *Paratylenchus* sp. en las plantas de patata, en comparación con los controles sin tratar.

Ejemplo 4

15 Período de retraso entre el tratamiento con *Bacillus subtilis* QST713 y eficacia frente a *Meloidogyne javanica*

Las técnicas experimentales descritas anteriormente en el ejemplo 1 se usaron para el siguiente experimento con plantas de pepino. Brevemente, se prepararon cultivos de caldo completo de AQ713 y se usaron para tratar semillas de pepino (10^5 UFC/g de semillas) el día 0 (T0). Las plantas de pepino se expusieron a nematodos juveniles a intervalos de 1 día, 6 días, 9 días o 14 días (T1, T6, T9 y T14). Cada punto temporal se recolectó a los 14 días 20 después de la inoculación (DDI) con nematodos juveniles. Se determinó la cantidad de nematodos de los nudos de las raíces *Meloidogyne javanica* (RKN) que penetraron en las raíces (véase la figura 5A) y la cantidad de juveniles que se desarrollaron (véase la figura 5B). Cada punto de datos representa la media de nematodos en 6 plantas de pepino. En comparación con el control sin tratar (CNT), AQ713 fue eficaz para controlar la penetración y el desarrollo del RKN cuando hubo un retraso superior a 6 días entre el tratamiento con AQ713 y la exposición de las plantas de pepino a los nematodos. 25

Para confirmar la observación de que AQ713 es eficaz cuando hay algún período de retraso entre el tratamiento y la exposición a los nematodos, se embebieron plántulas de plantas de tomate que tenían una edad de 4 semanas con un caldo completo de AQ713 (10^5 UFC/g de arena) el día 0 (T0) y se expusieron tras 1, 2 o 3 semanas (T7, T14 o T21), con 1000 juveniles de RKN por maceta, tal como se describe en el ejemplo 2. 42 DDI, se recolectaron las plantas correspondientes a cada punto temporal y se determinó la cantidad total de huevos en cada raíz. Cada punto de datos representa la cantidad media de huevos en 5 plantas de tomate. El período de retraso entre el tratamiento de AQ713 y la posterior exposición a nematodos requerido para la eficacia en la disminución del número de huevos de RKN en las raíces del tomate por debajo de los niveles del control sin tratar (CNT) fue de aproximadamente 14 días o más en el presente experimento (véase la figura 6).

35 Ejemplo 5

SERENADE® ASO aplicado múltiples veces en comparación con la aplicación de una vez

El producto SERENADE® ASO se aplicó en el momento del trasplante, sobre plantas de tomate en macetas que tenían un diámetro de aproximadamente veinte centímetros y cada dos semanas (es decir, bisemanalmente) desde entonces para tratamientos con múltiples aplicaciones tal como se detalla en la tabla 3. El producto SERENADE® ASO se aplicó al suelo, alrededor de la base de la planta, a aproximadamente entre 5 y 7,6 centímetros. Una dosis de 6 qt/A es equivalente a aproximadamente 1×10^5 UFC/g de suelo (es decir, el suelo a una distancia de entre cinco y siete centímetros desde la base de la planta). Las macetas se mantuvieron en un invernadero durante diez días, antes de que se inoculasen con 1000 larvas J2 de los nematodos de los nudos de las raíces por maceta. Las plantas se recolectaron 42 días después de inocular los nematodos, se calificaron las agallas (véase la figura 7A) y se determinó la cantidad total de huevos (véase la figura 7B) tal como se describe en los ejemplos 1 y 2. También se 45 pesaron los brotes frescos para identificar los efectos de los tratamientos sobre el crecimiento de las plantas (véase

la figura 7C). Todos los puntos de datos representan la media de 4 mediciones. En general, las múltiples aplicaciones del producto SERENADE® ASO generalmente mejoraron en el control de los nematodos y el correspondiente crecimiento de la planta en comparación con las aplicaciones individuales.

Tabla 3.

Tratamiento	Dosis	Aplicación
Serenade ASO	6 qt/A	En el trasplante
Serenade ASO	3 qt/A	3 aplicaciones cada dos semanas
Serenade ASO	6 qt/A	3 aplicaciones cada dos semanas
Serenade ASO	12 qt/A	3 aplicaciones cada dos semanas
Serenade ASO	18 qt/A	3 aplicaciones cada dos semanas
Control sin tratar	Ninguna	Ninguna

5

Ejemplo 6

SERENADE® ASO aplicado una vez en el momento del trasplante a diversas dosis

El producto SERENADE® ASO se aplicó sobre plantas de tomate en macetas, en el momento del trasplante y en las diversas dosis que se detallan en la tabla 4.

10

Tabla 4

Tratamiento	Dosis	Aplicación
Serenade ASO	4 qt/A	En el trasplante
Serenade ASO	20 qt/A (5x)	En el trasplante
Serenade ASO	40 qt/A (10x)	En el trasplante
Serenade ASO	80 qt/A (20x)	En el trasplante
Serenade ASO	160 qt/A (40x)	En el trasplante
Control sin tratar	Ninguna	Ninguna

Tal como se indicó con anterioridad, una dosis de 6 qt/A es equivalente a aproximadamente 1×10^5 UFC/g de suelo. Las macetas se mantuvieron después en un invernadero durante diez días, para luego inocular cada maceta con 3000 huevos de los nematodos de los nudos de las raíces. 7 semanas después de inocular los nematodos, se recolectaron las plantas y se determinó la cantidad total de huevos (véase la figura 8). Todos los puntos de datos representan la media de 4 mediciones. En general, las tasas superiores a 4 qt/A dieron como resultado un control superior de la producción de los huevos de los nematodos, y en particular, el tratamiento con 40 qt/A dio como resultado un control de aproximadamente el 70 %, en comparación con el grupo de plantas que no fueron tratadas.

15

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de control de nematodos que comprende aplicar a una planta y/o un sitio para el crecimiento de plantas una cantidad eficaz de *Bacillus subtilis* QST713.
- 5 2. El procedimiento de la reivindicación 1 en el que la aplicación está precedida por la identificación de que la planta y/o el sitio para el crecimiento de la planta necesita tratamiento.
3. El procedimiento de la reivindicación 1 en el que el lugar es el suelo.
4. El procedimiento de la reivindicación 3 en el que el *Bacillus subtilis* QST713 se aplica antes de la plantación, durante la plantación en surcos o después de la plantación.
- 10 5. El procedimiento de la reivindicación 3 en el que el *Bacillus subtilis* QST713 se aplica a una tasa de 2×10^{12} a 6×10^{13} ufc por 4050 m^2 que se corresponde con $8,09 \times 10^{11}$ a $2,43 \times 10^{13}$ ufc por hectárea para tratamientos por embebida del suelo o 6×10^{10} a 4×10^{12} ufc cada 93 metros cuadrados que se corresponde con $1,83 \times 10^{11}$ a $1,22 \times 10^{12}$ por 100 metros de fila para tratamientos en surco.
- 15 6. El procedimiento de la reivindicación 5 en el que la tasa es de 1×10^{13} a 6×10^{13} ufc por 4050 m^2 que se corresponde con $4,05 \times 10^{12}$ a $2,43 \times 10^{13}$ ufc por hectárea o $7,5 \times 10^{11}$ a 4×10^{12} ufc por 93 metros cuadrados que se corresponde con $2,29 \times 10^{12}$ a $1,22 \times 10^{13}$ ufc por 100 metros de fila.
7. El procedimiento de la reivindicación 3 en el que el *Bacillus subtilis* QST713 se aplica al suelo en contacto con las raíces de la planta o suelo en la base de una planta.
8. El procedimiento de la reivindicación 7 en el que el *Bacillus subtilis* QST713 se aplica como una aplicación única a una tasa de 7×10^5 a 1×10^7 ufc por gramo de suelo.
- 20 9. El procedimiento de la reivindicación 8 en el que el *Bacillus subtilis* QST713 se aplica como una aplicación única a una tasa de 1×10^6 a 5×10^6 ufc por gramo de suelo.
10. El procedimiento de la reivindicación 5 en el que el *Bacillus subtilis* QST713 se aplica en aplicaciones múltiples a una tasa de 2×10^{12} a 6×10^{13} ufc por 4050 m^2 que se corresponde con $8,09 \times 10^{11}$ a $2,43 \times 10^{13}$ ufc por hectárea para tratamientos de inundación del suelo por aplicación.
- 25 11. El procedimiento de la reivindicación 7 en el que el *Bacillus subtilis* QST713 se aplica en aplicaciones múltiples a una tasa de 1×10^5 a 3×10^6 ufc por gramo de suelo por aplicación.
12. El procedimiento de la reivindicación 1 en el que el *Bacillus subtilis* QST713 se aplica a semillas.
13. El procedimiento de la reivindicación 1 que comprende adicionalmente la aplicación de un segundo nematicida.
- 30 14. El procedimiento de la reivindicación 13 en el que el *Bacillus subtilis* QST713 se aplica en combinación con el segundo nematicida en la plantación y *Bacillus subtilis* se aplica solo en posteriores aplicaciones.
15. El procedimiento de la reivindicación 14 en el que el segundo nematicida es oxamilo y en el que las posteriores aplicaciones tienen lugar a intervalos de 10 a 18 días.
16. Una composición que comprende *Bacillus subtilis* QST713 y un segundo nematicida seleccionado de un nematicida biológico que es un producto formulado.

35

Figura 1

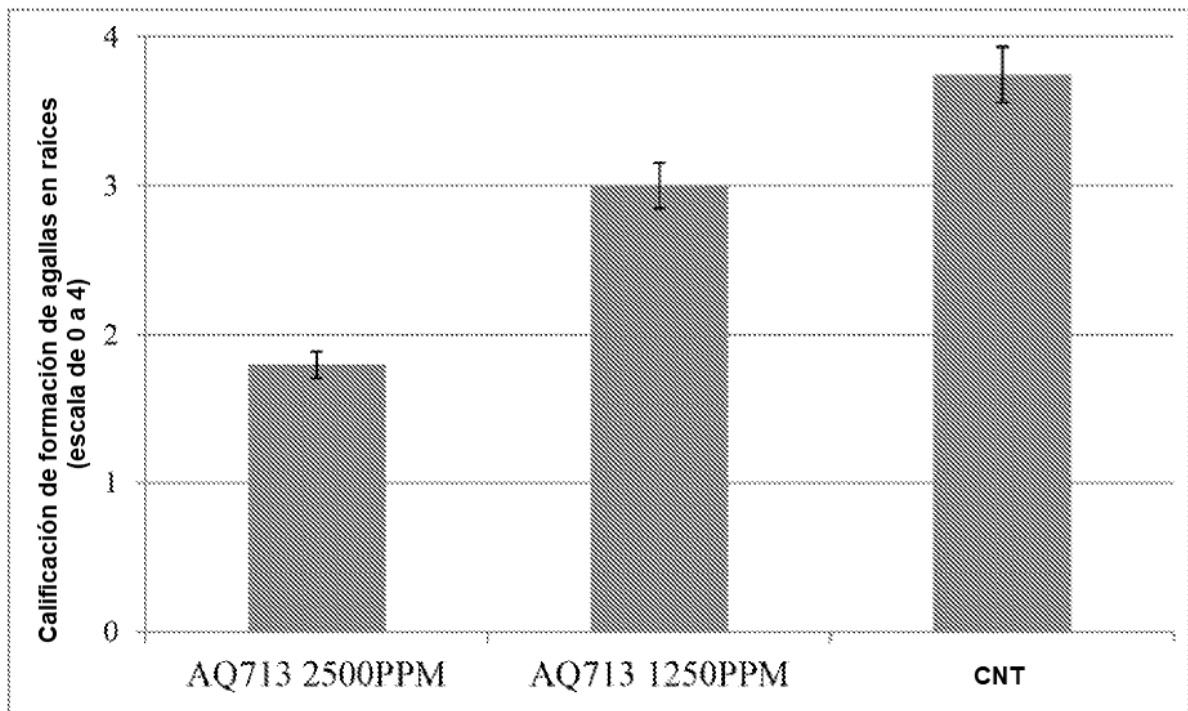


Figura 2

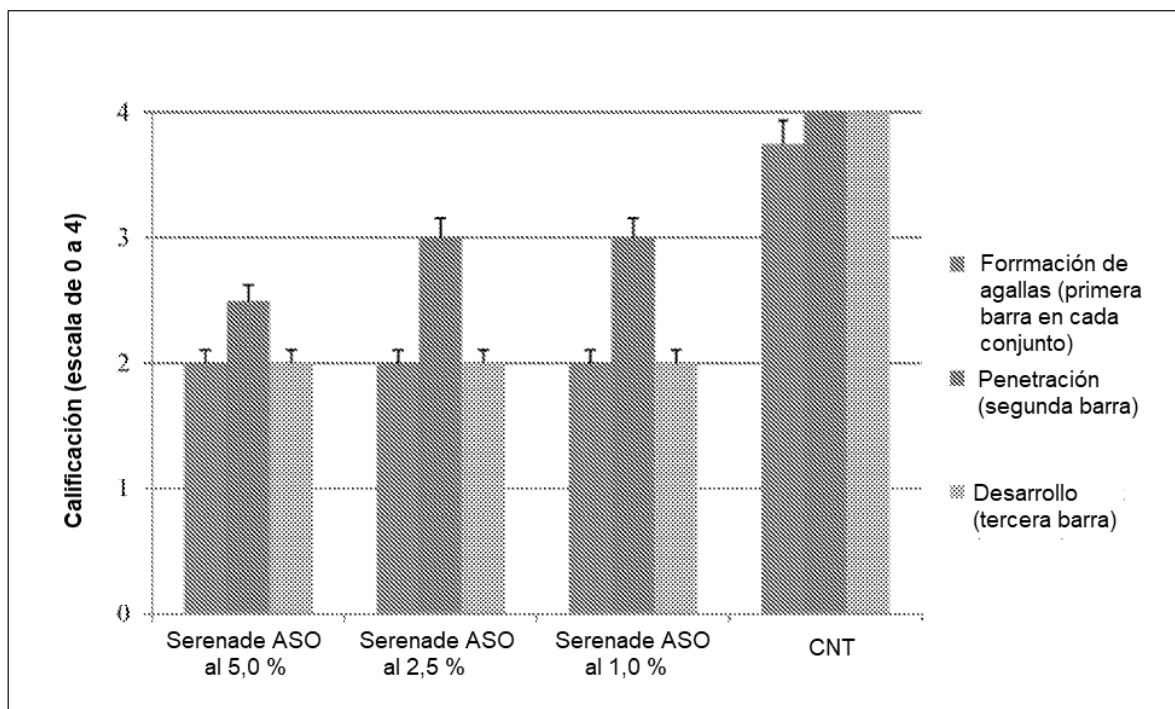


Figura 3

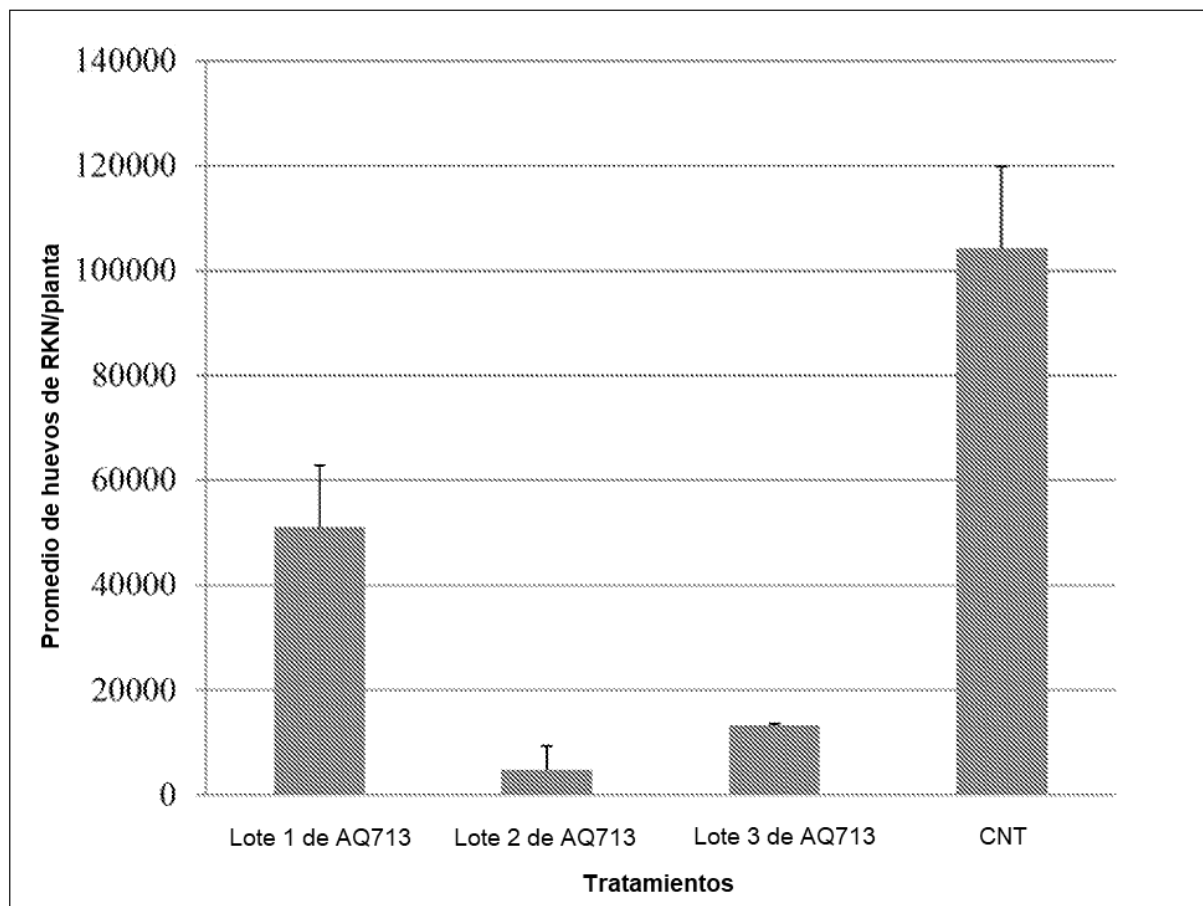


Figura 4

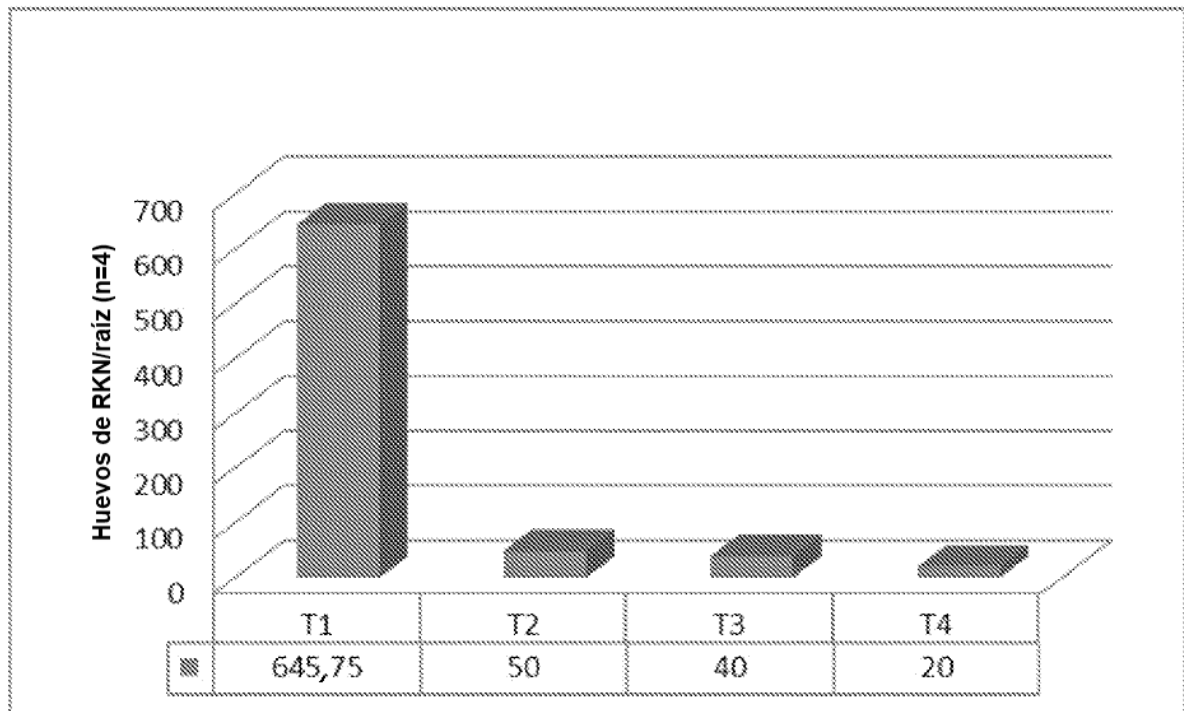


Figura 5A

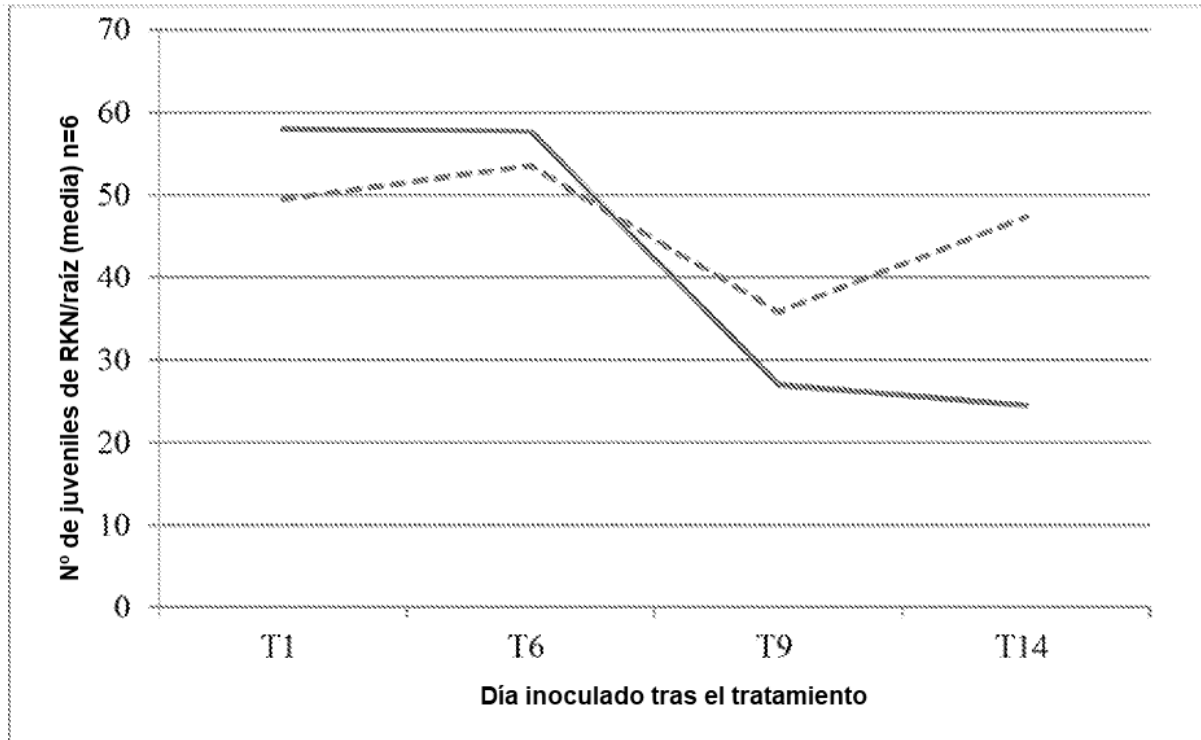


Figura 5B

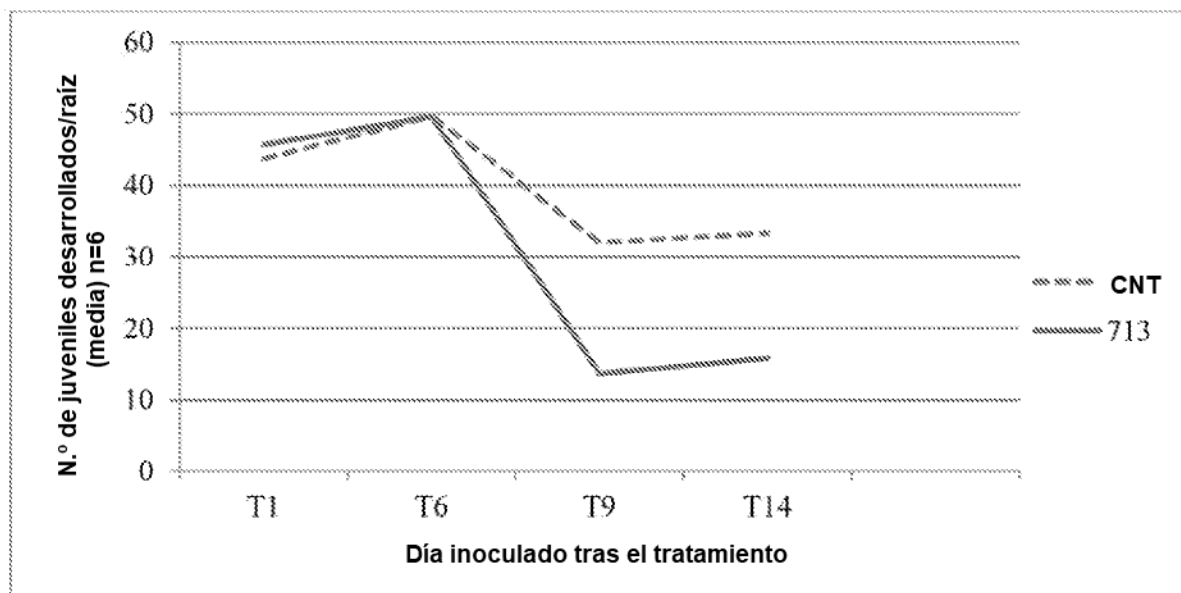


Figura 6

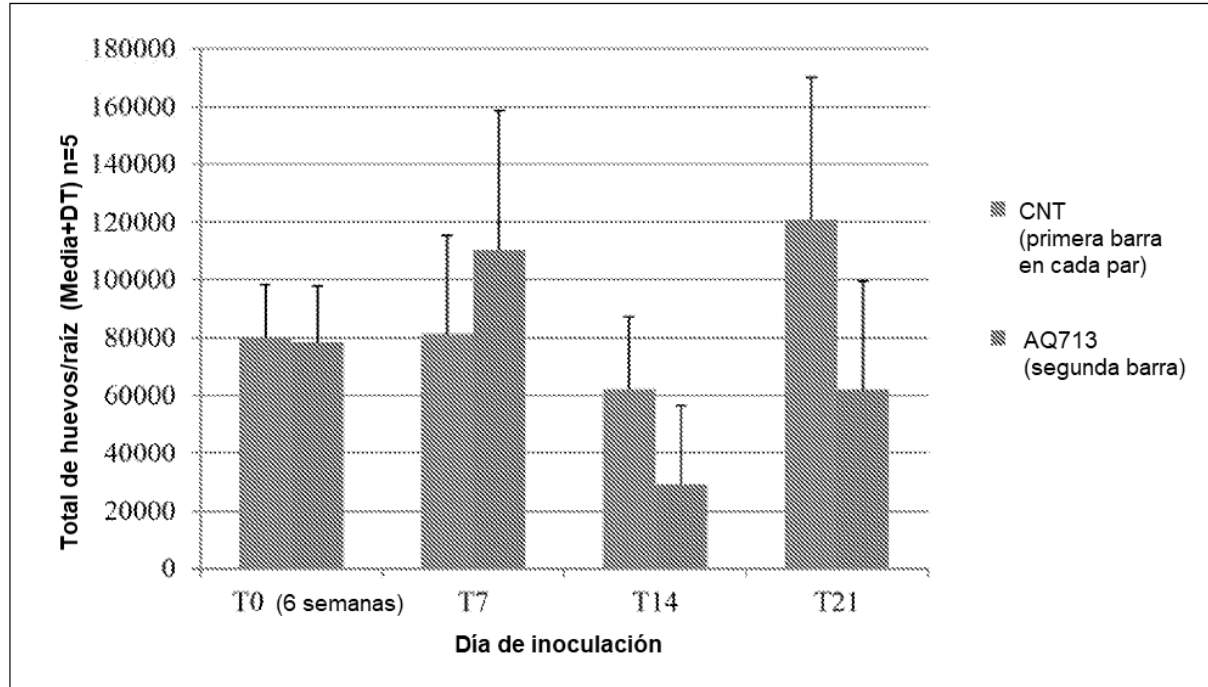


Figura 7A

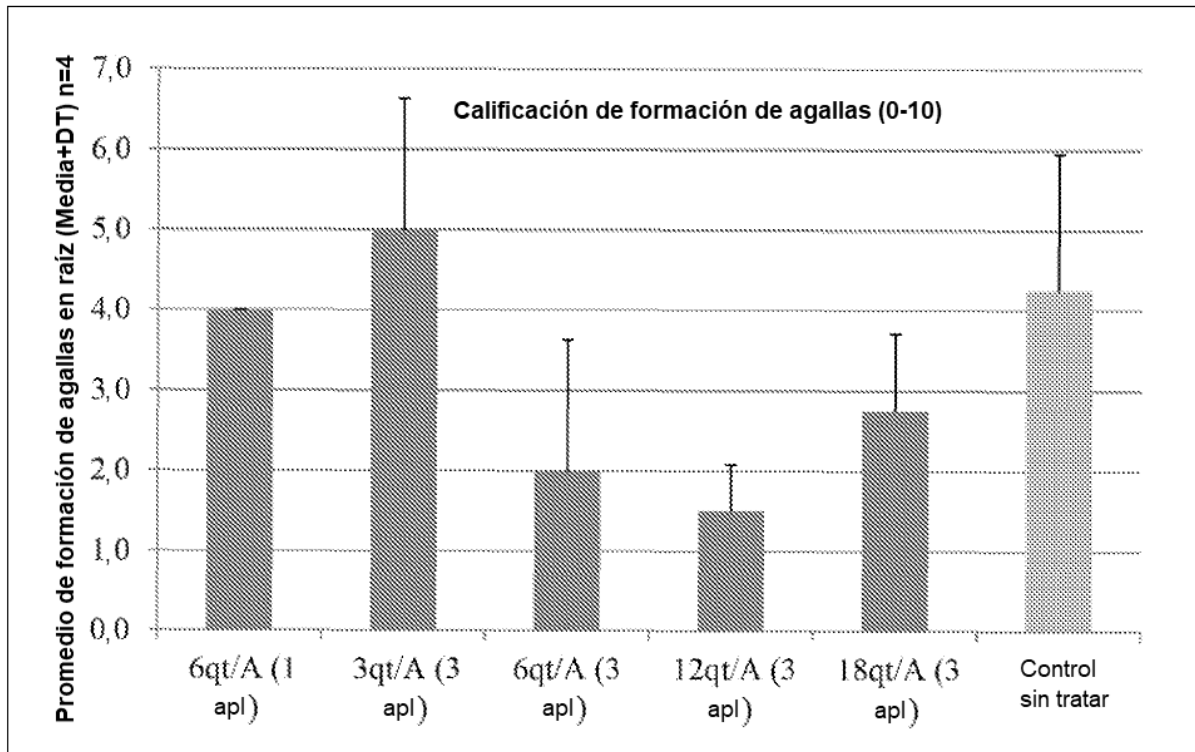


Figura 7B

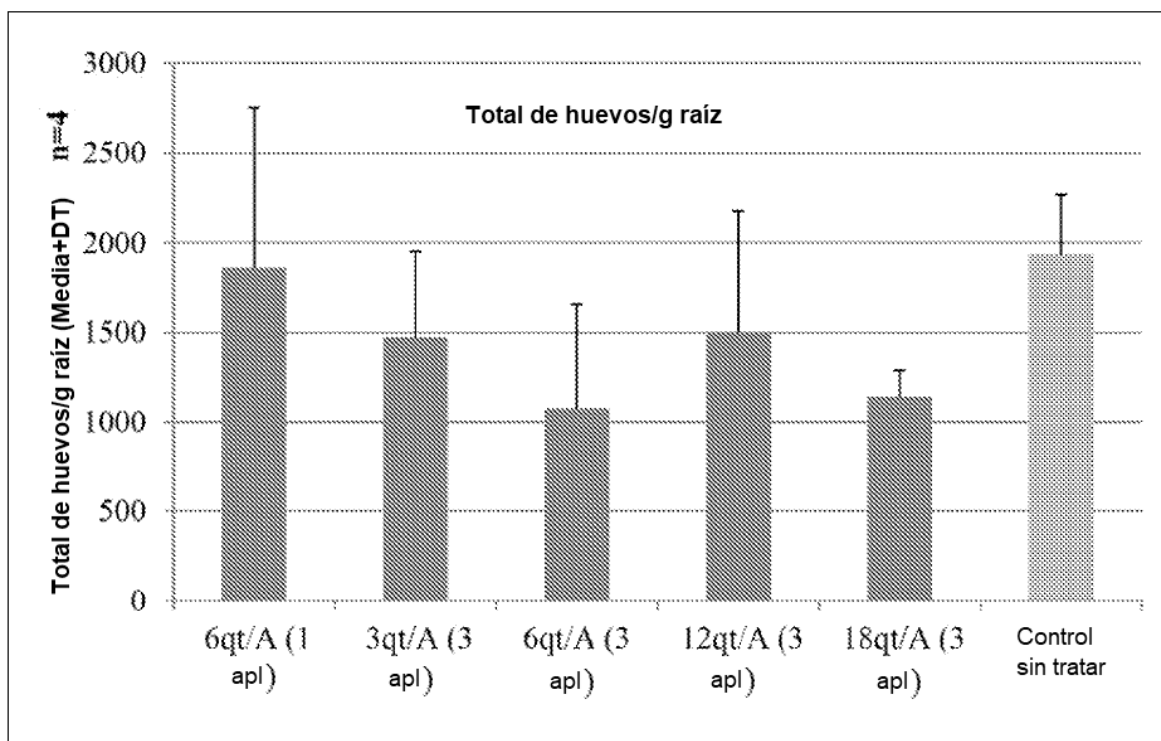


Figura 7C

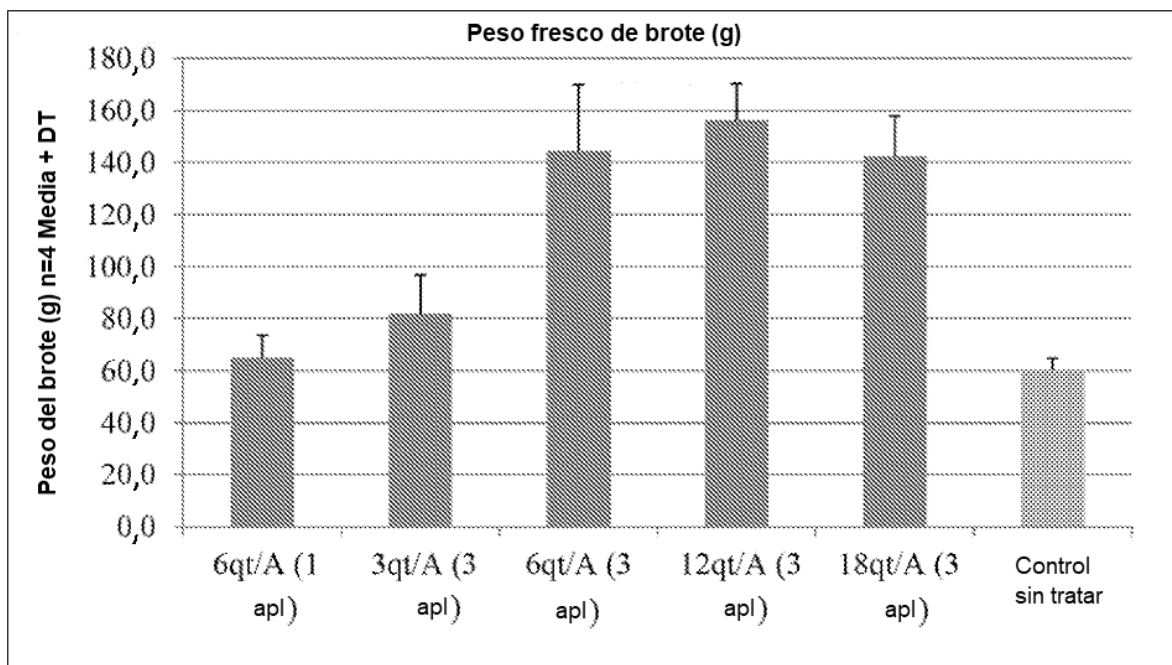


Figura 8

