

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 681 889**

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: **02.11.2012 PCT/US2012/063195**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.05.2013 WO13067275**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.11.2012 E 12795139 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.05.2018 EP 2773214**

54 Título: **Control biológico de nematodos**

30 Prioridad:

04.11.2011 US 201161556001 P

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

17.09.2018

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 y
THOMAS, VARGHESE PHILIP**

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 2 681 889 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

Control biológico de nematodos

Antecedentes de la invención

5 Los nematodos parásitos de las plantas provocan daños significativos en una amplia variedad de cultivos, lo que da como resultado pérdidas globales estimadas en el rendimiento de los cultivos de entre 5 % y 12 % por año. Frecuentemente, los nematodos provocan daños en las raíces, lo que da como resultado plantas achaparradas, caracterizadas por sistemas radiculares más pequeños, que presentan síntomas de deficiencia de minerales en sus hojas y que se marchitan con facilidad. El daño provocado por los nematodos también predispone a las plantas a las infecciones de bacterias y hongos patogénicos diversos.

10 Con el propósito de combatir y controlar los nematodos, los granjeros típicamente recurren al uso de nematicidas químicos. Éstos suelen administrarse a través de fumigaciones gaseosas o líquidas, como es el caso del bromuro de metilo y la cloropicrina, o a través de aplicaciones directas, como es el caso de los organofosfatos y los carbamatos, tales como la tiazina y el oxamilo. Los nematicidas químicos de este tipo han sido usados durante varias décadas. A pesar de la efectividad que presentan los nematicidas químicos en el control de los nematodos blanco, los procedimientos relacionados tienen limitaciones severas. Una de estas limitaciones es el hecho de que los nematicidas químicos no pueden actuar sobre los nematodos que ya han penetrado en las raíces. Otra limitación es el peligro que está asociado a la producción y el uso de los nematicidas químicos. En este contexto, los nematicidas químicos son altamente tóxicos y pueden provocar envenenamiento y muerte entre los seres humanos. Como resultado, en diversos países se han restringido o incluso prohibido algunos de estos plaguicidas. Por ejemplo, el bromuro de metilo está prohibido en la mayoría de los países a causa de sus efectos perjudiciales sobre la capa de ozono.

Debido a estas restricciones y prohibiciones, se necesitan soluciones viables para el problema de los nematodos. En la presente invención, se provee un medio seguro y eficaz con el que pueden reemplazarse los plaguicidas químicos o puede disminuirse su uso. Esta invención también es única porque en ella se provee una solución con la que puede inhibirse la penetración de los nematodos en las raíces de las plantas y puede prevenirse la maduración de los nematodos que pudieran haber superado esta barrera inicial. Los documentos WO 00/58442 y WO 99/10477 divulgan ejemplos nematicidas de *Bacillus pumilus*.

Sumario de la invención

30 En la presente invención se proveen procedimientos y composiciones con los que pueden controlarse los nematodos parásitos de las plantas. En esta invención se provee un procedimiento con el que pueden controlarse los nematodos, que comprende aplicar sobre una planta, sobre una parte de una planta o sobre el sitio en el que se encuentra una planta, una cantidad eficaz de *Bacillus pumilus* QST2808. En algunas formas de realización, *Bacillus pumilus* (por ejemplo, *Bacillus pumilus* QST2808) se aplica como un producto de la fermentación que comprende *Bacillus pumilus*, sus metabolitos y opcionalmente caldo residual de la fermentación.

35 En algunas formas de realización, los nematodos blanco son nematodos que provocan enfermedades asociadas a los nudos en las raíces. En determinados casos, los nematodos pertenecen a diversas especies del género *Meloidogyne*. Con las composiciones que se describen en el presente documento, es posible exterminar los huevos de los nematodos que provocan nudos en las raíces, es posible disminuir la penetración de los nematodos que provocan nudos en las raíces y/o es posible inhibir la maduración de los nematodos que provocan nudos en las raíces que ya han penetrado en las plantas.

En otras formas de realización, los nematodos blanco son nematodos que provocan quistes. En determinados casos, estos nematodos pertenecen a diversas especies del género *Heterodera*. En otros casos, estos nematodos pertenecen a diversas especies del género *Globodera*.

45 En algunas formas de realización, las composiciones que se describieron con anterioridad se mezclan con al menos un plaguicida adicional, que puede ser un fungicida, un insecticida, un nematicida o un herbicida. En una forma de realización, el plaguicida es un nematicida. En determinadas formas de realización, el nematicida basado en *Bacillus pumilus* QST2808 se mezcla en un tanque con un nematicida formulado disponible comercialmente. En otras formas de realización, la composición basada en *Bacillus pumilus* (por ejemplo, *Bacillus pumilus* QST2808) se mezcla con al menos un plaguicida adicional y se formula, lo que da como resultado un producto con múltiples ingredientes activos.

55 La presente invención provee además cualquiera de las composiciones de acuerdo con la presente invención que además comprenden una formulación inerte u otro principio de formulación, tales como polisacáridos (almidones, maltodextrinas, metilcelulosas, proteínas, tal como proteína del 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 de humo/precipitados, sales de silicato). En algunas formas de realización, tales como aquellas en las cuales las composiciones se aplican a la tierra, las composiciones de acuerdo con 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 en la tierra. En algunas formas de realización, tales como aquellas en donde se usa la composición para el tratamiento de semillas o como una inmersión radicular, el vehículo es un aglutinante o adhesivo que facilita la adherencia de la composición a la semilla o raíz. En otra forma de realización en donde las composiciones se usan como un tratamiento de semillas, el principio de formulación es un colorante. En otras composiciones, el principio de formulación es un conservante.

En algunas formas de realización, las composiciones se aplican sobre las plantas, sobre partes de las plantas o sobre la localización en la que se encuentran las plantas, por ejemplo, sobre la tierra, antes de la siembra. En otras formas de realización, las composiciones se aplican en el momento de la siembra. En aun otras formas de realización, las composiciones se aplican después de la siembra.

En determinadas formas de realización, la aplicación de las composiciones se realiza después de identificar las plantas o la localización en la que se encuentran las plantas que se desea tratar. En algunas formas de realización, la identificación abarca el descubrimiento de una localización donde se cultivan plantas, que presenta un umbral de infestación de nematodos que es superior al que resultaría aceptable desde el punto de vista económico.

En algunas formas de realización, en la presente invención se provee un conjunto de elementos que comprende *Bacillus pumilus* e instrucciones para usarlo como nematocida. El *Bacillus pumilus* de acuerdo con la presente invención, es *Bacillus pumilus* QST2808. En algunas formas de realización, las instrucciones toman la forma de una etiqueta sobre el producto. En algunas formas de realización, las instrucciones están relacionadas con el uso de *Bacillus pumilus* QST2808 como nematocida en combinación con un nematocida químico. En determinados casos, las instrucciones sirven para que el usuario sepa que la tasa de uso del nematocida químico es inferior a la tasa que sería recomendable si se lo usara como un tratamiento individual.

Descripción detallada de la invención

Bacillus pumilus QST2808, sus mutantes, los sobrenadantes que la comprenden y los procedimientos para usarla en el control de los patógenos de las plantas y de los insectos que afectan las plantas se describen en detalle en las Patentes de los EEUU N° 6245551 y 6586231. En estas patentes de los EEUU, la cepa se denomina NRRL N° B-30087, que es sinónimo de QST2808. *Bacillus pumilus* QST2808 fue depositada en la colección NRRL el 14 de Enero de 1999, bajo las condiciones del Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos para el Propósito de Procedimientos de Patentes, bajo el número de acceso B-30087. En el presente documento, las referencias a QST2808 son referencias a *Bacillus pumilus* QST2808.

Las composiciones de acuerdo con la presente invención pueden obtenerse cultivando *Bacillus pumilus*, y particularmente la cepa de *Bacillus pumilus* QST2808, de acuerdo con procedimientos bien conocidos en la técnica, lo que abarca el uso de los medios y los procedimientos que se describen en la Patente de los EEUU N° 6245551. Los procesos convencionales con los cuales pueden cultivarse los microbios a gran escala incluyen la fermentación sumergida, la fermentación en estado sólido y el cultivo en una superficie líquida. A los fines de la fermentación, a medida que se van agotando los nutrientes, las células de *Bacillus pumilus* comienzan la transición de la fase de crecimiento a la fase de esporulación, de manera tal que el producto de fermentación final comprende mayormente esporas, metabolitos y medio de fermentación residual. La esporulación forma parte del ciclo de vida natural de las células de *Bacillus pumilus*, y en general es iniciado por la célula como respuesta a la limitación de nutrientes. La fermentación está configurada para obtener niveles altos de unidades formadoras de colonias ("ufc") de *Bacillus pumilus* y para promover la esporulación. El medio de cultivo resultante de la fermentación se puede usar directamente o se pueden concentrar usando procedimientos industriales convencionales, tales como centrifugación, filtración por flujo tangencial, filtración profunda y evaporación. En el presente documento, tanto el caldo de fermentación como el caldo concentrado se denominan "productos de fermentación". En algunas formas de realización, el caldo de fermentación concentrado se lava, por ejemplo, mediante un proceso de diafiltración, para eliminar el caldo de fermentación residual y los metabolitos.

usando procesos o procedimientos que incluyen, sin limitaciones, procedimientos de secado convencionales tales como secado por aspersión, secado por congelamiento, secado en bandeja, secado en lecho fluido, secado en tambor o evaporación.

Los productos secos resultantes pueden ser sometidos a un procesamiento adicional, tal como una trituración o una granulación, por ejemplo, para obtener partículas con un formato físico o un tamaño específico (por ejemplo, un tamaño de partícula promedio de aproximadamente 1 a aproximadamente 5.000, de aproximadamente 1 a aproximadamente 2.500, de aproximadamente 1 a aproximadamente 500, de aproximadamente 1 a aproximadamente 250, de aproximadamente 1 a aproximadamente 100, de aproximadamente 1 a aproximadamente 50, de aproximadamente 1 a aproximadamente 25, de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 μm , o cualquier otro tamaño de partícula o intervalo de los mismos deseado y conocido en la técnica). También se pueden agregar vehículos, que se describirán más adelante, después del secado.

Las preparaciones sin células del caldo de fermentación de las nuevas variantes y cepas de *Bacillus* de acuerdo con la presente invención se pueden obtener mediante cualquier medio conocido en la materia, tal como extracción, centrifugación y/o filtración del caldo de fermentación. Los especialistas en la materia podrán apreciar que las

denominadas preparaciones sin células no carecerán de células sino que mayormente no contienen células o esencialmente no contienen 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 ayudan en su aplicación a las plantas o al medio de crecimiento vegetal. Los procedimientos de concentración y las técnicas de secado descritas previamente para el caldo de fermentación también son aplicables a las preparaciones sin células.

Los procedimientos de concentración y las técnicas de secado descritos previamente para la formulación del caldo de fermentación también son aplicables a los metabolitos.

Las composiciones de acuerdo con la presente invención pueden incluir principios de formulación inertes que se agregan a las composiciones que comprenden células, para mejorar la eficacia, la estabilidad y utilidad y/o para facilitar el procesamiento, el envasado y la aplicación de uso final. Dichos principios de formulación inertes pueden incluir vehículos, agentes de estabilización, nutrientes o agentes modificadores de las propiedades físicas, que se pueden agregar individualmente o combinados. En algunas formas de realización, los vehículos pueden incluir materiales líquidos tales como agua, aceite y otros solventes orgánicos o inorgánicos y materiales sólidos tales como minerales, polímeros o complejos de polímeros derivados biológicamente o mediante síntesis química. En algunas formas de realización, el vehículo es un aglutinante o un adhesivo que facilita la adherencia de la composición a una parte de planta, tal como una semilla o raíz. Véase, por ejemplo, Taylor, A.G., y col., "Concepts y Technologies de Selected Seed Tratamientos" *Annu. Rev. Phytopathol.* 28: 321-339 (1990), que se incorpora específicamente en el presente documento a modo de referencia en su totalidad. Los agentes de estabilización pueden incluir agentes anti-aglutinantes, agentes anti-oxidantes, desecantes, protectores o 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 las propiedades físicas pueden incluir agentes de carga, agentes humectantes, espesantes, modificadores del pH, modificadores de la reología, dispersantes, adyuvantes, agentes tensioactivos, agentes anticongelantes o colorantes. En algunas formas de realización, la composición que comprende células producidas por fermentación se puede usar directamente con o sin agua como diluyente sin ninguna otra preparación de formulación. En algunas formas de realización, los principios de formulación inertes se agregan después de concentrar el caldo de fermentación y durante y/o después del secado.

Las composiciones de acuerdo con la presente invención pueden comprender diversos vehículos, que son principios de formulación inertes que pueden combinarse con los productos de la fermentación o con las preparaciones libres de células para mejorar la recuperación, la eficacia o las propiedades físicas y/o para contribuir en el envasado o en la administración. Los vehículos pueden agregarse solos o combinados.

Las composiciones de acuerdo con la presente invención se pueden mezclar con otros aditivos químicos y no químicos, adyuvantes y/o tratamientos, en donde tales tratamientos incluyen, sin limitaciones, fungicidas, insecticidas, miticidas, nematocidas, fertilizantes, nutrientes, minerales, auxinas, estimulantes del crecimiento químicos y no químicos y semejantes.

Los nematocidas con los cuales pueden combinarse las composiciones basadas en *Bacillus pumilus* de acuerdo con la presente invención pueden ser nematocidas químicos o biológicos. El término "nematocida químico", según se usa en el presente documento, excluye a los fumigantes, y el término "fumigantes" abarca sustancias químicas plaguicidas de amplio espectro que se aplican a la tierra de pre-siembra y que difunden por la tierra (en aire-tierra y/o agua-tierra) y se pueden aplicar como gases, tales como bromuro de metilo, líquidos volátiles, tal como cloropicrina, o sólidos volátiles, tal como dazomet.

En algunas formas de realización, el nematocida químico o biológico es un producto formulado disponible comercialmente y se mezcla en tanque con las composiciones de acuerdo con la presente invención. En otras formas de realización, los nematocidas químicos o biológicos se mezclan con las composiciones basadas en *Bacillus pumilus* (que por ejemplo, puede ser *Bacillus pumilus* QST2808) antes de la formulación, de manera tal de obtener un único producto formulado.

Los nematocidas químicos usados en tales mezclas son carbamatos, carbamatos de oxima y nematocidas organofosforados. Los nematocidas de carbamato incluyen benomilo, carbofurano, (FURADAN[®]), carbosulfán y cloetocarb. Los carbamatos de oxima incluyen alanicarb, aldicarb (TEMIK[®] o como parte del tratamiento de semillas AVICTA[®] Complete Pak de Syngenta), aldoxicarb (STANDAK[®]), oxamilo (VYDATE[®]), tiodicarb (parte del sistema aplicado a semillas AERIS[®] de Bayer CropScience) y tirpató. Los nematocidas organofosforados incluyen el fensulfotión (DANSANIT[®]), el etoprop (MOCAP[®]), el diamidafos, el fenamifos, el fostietán, el fosfamidón, el cadusafos, el clorpirifos, el diclofentión, el dimetoato, el fostiazato, el heterofos, el isamidofos, el isazofos, el forato, el fosfocarb, el terbufos, la tionazina, el triazofos, el imiciafos y el mecarfón. Los nombres entre paréntesis que le siguen a cada compuesto son formulaciones comerciales representativas de cada una de las sustancias químicas anteriores. Otros nematocidas químicos de utilidad para tales mezclas incluyen espirotetramat (MOVENTO[®]), el nematocida MON37400 y fipronilo.

Los nematocidas biológicos incluyen las mezclas de quitina y urea, los extractos compuestos, el té (que puede estar aireado o no), las composiciones que comprenden el hongo *Myrothecium verrucaria* y/o metabolitos derivados de

éste (que se encuentran disponibles comercialmente bajo la marca DITERA®), las composiciones que comprenden hongos del género *Paecilomyces*, lo que abarca *P. lilacinus* (que se encuentran disponibles comercialmente, por ejemplo, bajo las marcas MELOCON® o BIOACT®), las composiciones que comprenden bacterias del género *Pasteuria*, lo que abarca *P. usgae* (que se encuentran disponibles comercialmente, por ejemplo, bajo la marca ECONEM®), las composiciones que comprenden bacterias del género *Bacillus*, lo que abarca *Bacillus firmus* (como es el caso de la cepa CNMC I-1582, que fue depositada en la Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos del Instituto Pasteur, Francia, el 29 de Mayo de 1995, y que se encuentra disponible comercialmente, por ejemplo, bajo la marca VOTIVO®), *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens* y *Bacillus cereus*, y las composiciones que comprenden hongos nematocidas del género *Streptomyces*, como es el caso de *Streptomyces lydicus* (que se encuentra disponible comercialmente bajo la marca ACTINOVATE®). Los nematocidas biológicos también incluyen nematocidas basados en vegetales, tal como productos basados en las plantas de neem (incluyendo semillas o aceite de las plantas) o azadiractina, un metabolito secundario de las semillas de neem, productos basados en aceite de sésamo (tal como DRAGONFIRE®), carvacrol, y productos basados en extractos vegetales (tal como NEMA-Q®, obtenido del árbol *Quillaja saponaria* de Chile). Los nematocidas biológicos también incluyen compuestos aislados producidos por bacterias, tal como las metcinas, que son producidas por *Streptomyces avermentilis*, incluyendo abamectina (que consiste de una combinación de abamectina B_{1a} y B_{1b}) y avermectina B_{2a}, y las proteínas harpina, identificadas originalmente en *Erwinia amylovora*, incluyendo harpina_{EA} y harpina_{qβ}.

Las composiciones de acuerdo con la presente invención son de utilidad para controlar nematodos parásitos de plantas, tales como, por ejemplo, nematodos de los nudos de la raíz, quísticos, de lesiones y en anillo, incluyendo *Meloidogyne* spp., *Heterodera* spp., *Globodera* spp., *Pratylenchus* spp. y *Criconebella* sp. Las composiciones también son de utilidad 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., *Radopholus* spp. (tales como *R. citrophilis* y *R. similis*), *Ditylenchus* spp. y otros nematodos parásitos de plantas. En algunas formas de realización los blancos son nematodos quísticos, tales como *Heterodera glificina* (nematodo quístico de soja), *Heterodera schachtii* (nematodo quístico de remolacha), *Heterodera avenae* (nematodo quístico de cereales), *Meloidogyne incognita* (nematodo de los nudos de la raíz de algodón (o del sur)), *Globodera rostochiensis* y *Globodera pallida* (nematodo quístico de papa). En otras formas de realización, los blancos son nematodos de los nudos de la raíz, tal como *M. incognita* (nematodo de los nudos de la raíz del algodón), *M. javanica* (nematodo de los nudos de la raíz javanés), *M. hapla* (nematodo de los nudos de la raíz del norte) y *M. arenaria* (nematodo de los nudos de la raíz del maní).

El término "control", tal como se usa en el presente documento, hace referencia a la exterminación de los nematodos, a la reducción en su cantidad, a la reducción de su capacidad fisiológicamente normal de crecer, de alimentarse o de desarrollarse, en cualquier etapa de su vida (en particular, en el contexto de los nematodos que provocan nudos en las raíces, esto abarca su capacidad de penetrar en las raíces y de desarrollarse en su interior), a la reducción de los efectos de las infestaciones que provocan (por ejemplo, la formación de agallas, la penetración y/o el desarrollo en las raíces), al desarrollo de resistencia a las infestaciones de nematodos en las plantas, al desarrollo de resistencia a los efectos de las infestaciones de nematodos en las plantas (por ejemplo, la formación de agallas y/o la penetración), al desarrollo de tolerancia a las infestaciones de nematodos en las plantas, al desarrollo de tolerancia a los efectos de las infestaciones de nematodos en las plantas (por ejemplo, la formación de agallas y/o la penetración) o a cualquier combinación de estos efectos. La resistencia y la tolerancia de las plantas a los nematodos parásitos son conocidas en la técnica y se describen, por ejemplo, en Trudgill, D. L. "Resistance to and Tolerance of Plant Parasitic Nematodos in Plants", Annual Review of Phytopathology. 1991; 29:167-192, que se incorpora específicamente en el presente documento a modo de referencia en su totalidad. Una cantidad eficaz es una cantidad que da como resultado una reducción notable en la capacidad de los nematodos de crecer, de alimentarse, de penetrar en las raíces o de madurar en ellas, en su desarrollo general fisiológicamente normal o en los síntomas resultantes de las infestaciones que provocan. En algunas formas de realización, se reducen los síntomas y/o los nematodos, en al menos aproximadamente un 5 %, al menos aproximadamente un 10 %, al menos aproximadamente un 20 %, al menos aproximadamente un 30 %, al menos aproximadamente un 40 %, al menos aproximadamente un 50 %, al menos aproximadamente un 60 %, al menos aproximadamente un 70 %, al menos aproximadamente un 80 % o al menos aproximadamente un 90 %, a diferencia de lo que ocurre en los controles sin tratar.

Las composiciones de acuerdo con la presente invención pueden usarse para tratar una amplia variedad de cultivos agrícolas y/u hortícolas, lo que abarca aquellos que se desarrollan para generar alimentos, para obtener productos diversos o con fines decorativos. Las plantas representativas que se pueden tratar usando las composiciones de acuerdo con la presente invención incluyen, sin limitaciones, las siguientes: las verduras bulbosas, los cereales con granos, los cítricos (tales como el pomelo, el limón o la naranja), el algodón u otros cultivos fibrosos, las cucurbitáceas, las plantas frutales, las plantas con hojas grandes (tales como el apio, la lechuga o la espinaca), las legumbres, los cultivos oleaginosos, el maní, las frutas de pomo (tales como la manzana o la pera), las frutas secas (tales como la almendra, la pecana o la nuez), las plantas que desarrollan raíces, las plantas que desarrollan tubérculos, las plantas con tallos ramificados, el tabaco, la frutilla u otras bayas, las coles (tales como el brócoli o el repollo), la vid, el ananá, las plantas que desarrollan flores, las plantas que se emplean para desarrollar lechos o las plantas ornamentales (tales como la hiedra o el césped). Las composiciones de acuerdo con la presente invención también se usan para tratar plantas perennes, incluyendo cultivos de plantación tales como banana y café y aquellos

que están presentes en bosques, parques o jardines.

Las composiciones que se describen en el presente documento pueden aplicarse sobre las plantas, sobre partes de las plantas, tales como las semillas, las raíces, los rizomas, los tallos ramificados, los bulbos o los tubérculos y/o sobre la localización en la que se desarrollan las plantas o en la que se encuentran las partes de las plantas, lo que abarca la tierra, con el propósito de controlar los nematodos parásitos. Las composiciones de acuerdo con la presente invención pueden administrarse a través de una atomización sobre las hojas o por medio de un tratamiento sobre las semillas, sobre las raíces, sobre los rizomas, sobre los bulbos, sobre los tallos o sobre la tierra. Las semillas, las raíces, los rizomas, los bulbos, los tallos, el follaje y/o la tierra pueden tratarse antes de la siembra, durante de la siembra o después de la siembra.

- 5
- 10 Las composiciones que se describen en el presente documento también pueden aplicarse sobre las plantas, sobre partes de las plantas, tales como las semillas, las raíces, los rizomas, los tallos ramificados, los bulbos o los tubérculos y/o sobre la localización en la que se desarrollan las plantas o en la que se encuentran las partes de las plantas, lo que abarca la tierra, con el propósito de incrementar el rendimiento de los cultivos. En algunas formas de realización, el rendimiento de los cultivos se incrementa al menos aproximadamente 5 %. En otras formas de realización, el rendimiento de los cultivos se incrementa al menos aproximadamente 10 %. En aun otras formas de realización, el rendimiento de los cultivos se incrementa al menos aproximadamente 15 %. En aun otras formas de realización, el rendimiento de los cultivos se incrementa al menos aproximadamente 20 %. En algunas formas de realización, el peso de las raíces se incrementa al menos aproximadamente 5 %. En otras formas de realización, el peso de las raíces se incrementa al menos aproximadamente 10 %. En aun otras formas de realización, el peso de las raíces se incrementa al menos aproximadamente 15 %. En aun otras formas de realización, el peso de las raíces se incrementa al menos aproximadamente 20 %.
- 15
- 20

- 25 Cuando se usan como un tratamiento de semillas, las composiciones de acuerdo con 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 formas de realización, la tasa de aplicación es de entre 1×10^4 y aproximadamente 1×10^7 ufc/semilla. En algunas formas de realización, la tasa de aplicación es de entre aproximadamente 1×10^2 y aproximadamente 1×10^6 , entre aproximadamente 1×10^2 y aproximadamente 1×10^7 , entre aproximadamente 1×10^2 y aproximadamente 1×10^6 , entre aproximadamente 1×10^2 y aproximadamente 1×10^5 , entre aproximadamente 1×10^2 y aproximadamente 1×10^4 , entre aproximadamente 1×10^2 y aproximadamente 1×10^3 o entre aproximadamente 1×10^3 y aproximadamente 1×10^5 ufc/semilla, o preferentemente es de aproximadamente 1×10^4 ufc/semilla. Cuando dichas composiciones se combinan o se usan con al menos un principio activo ("pa") adicional, el al menos un principio activo adicional puede estar presente en una cantidad de entre aproximadamente 0,001 y aproximadamente 1000 gramos, entre aproximadamente 0,01 y aproximadamente 500, entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 300, entre aproximadamente 1 y aproximadamente 100, entre aproximadamente 1 y aproximadamente 50, entre aproximadamente 1 y aproximadamente 25 gramos por cada 100 kg de semillas, y preferentemente está presente en una cantidad de entre aproximadamente 1 y aproximadamente 10 gramos por cada 100 kg de semillas y/o de entre aproximadamente 1×10^2 y aproximadamente 1×10^8 , entre aproximadamente 1×10^2 y aproximadamente 1×10^7 , entre aproximadamente 1×10^2 y aproximadamente 1×10^6 , entre aproximadamente 1×10^2 y aproximadamente 1×10^5 , entre aproximadamente 1×10^2 y aproximadamente 1×10^4 , entre aproximadamente 1×10^2 y aproximadamente 1×10^3 , entre aproximadamente 1×10^3 y aproximadamente 1×10^5 , o preferentemente en una cantidad de aproximadamente 1×10^4 ufc/semilla.
- 30
- 35
- 40

- 45 Las presentes composiciones también pueden aplicarse sobre las raíces por inmersión, en una tasa de entre aproximadamente 1×10^3 y aproximadamente 1×10^9 ufc/sistema radicular de la planta. Cuando las composiciones se combinan o se usan con al menos un principio activo adicional, el al menos un principio activo adicional puede estar presente en una cantidad de entre aproximadamente 0,001 y aproximadamente 1000, entre aproximadamente 0,01 y aproximadamente 500, entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 400 o entre aproximadamente 1 y aproximadamente 300, entre aproximadamente 10 y aproximadamente 250 mg/l, y preferentemente en una cantidad de entre aproximadamente 25 y aproximadamente 200 mg/l y/o en una cantidad de entre aproximadamente 1×10^3 y aproximadamente 1×10^8 ufc/sistema radicular de la planta.

- 50 Cuando se usan como un tratamiento de tierra, las composiciones de acuerdo con la presente invención se pueden aplicar como un riego de la superficie de la tierra, por introducción con una caña, inyección y/o aplicación en surcos o mezclados con el agua de irrigación. La tasa de aplicación para los tratamientos de riego, que pueden llevarse a cabo en el momento de la siembra, durante la etapa de producción de semillas, después de dicha etapa, después del trasplante o en cualquier etapa del desarrollo de las plantas, puede ser de entre aproximadamente $1,6 \times 10^7$ - $3,2 \times 10^{14}$, $1,6 \times 10^9$ - $3,2 \times 10^{13}$, $1,6 \times 10^{11}$ - $3,2 \times 10^{12}$, 8×10^{11} - $2,4 \times 10^{13}$, 8×10^{11} - $1,2 \times 10^{13}$ o $1,6 \times 10^{13}$ - 8×10^{13} ufc por ha. En algunas formas de realización, la tasa de aplicación es de entre aproximadamente 4×10^{11} - $2,4 \times 10^{12}$ o 4×10^{12} - $2,4 \times 10^{13}$ ufc por ha. La tasa de aplicación para los tratamientos en surcos, aplicada en el momento de la siembra, es de entre aproximadamente $8,3 \times 10^9$ - $1,7 \times 10^{11}$ ufc por hilera de 100 m. En algunas formas de realización, la tasa de aplicación es de entre aproximadamente 2×10^{10} - 10^{12} , 20×10^{10} - $1,3 \times 10^{11}$, 2×10^{11} - 10^{12} o 2×10^{11} - $1,3 \times 10^{12}$ ufc por hilera de 100 m. En el contexto de una inyección o una aplicación similar, la tasa de aplicación puede ser de entre aproximadamente $1,6 \times 10^7$ - $3,2 \times 10^{14}$, $1,6 \times 10^{13}$ - 8×10^{13} , $1,6 \times 10^8$ - $3,2 \times 10^{13}$, $1,6 \times 10^9$ - $3,2 \times 10^{12}$, 8×10^9 - $2,4 \times 10^{11}$, $1,6 \times 10^7$ - $3,2 \times 10^{13}$, $1,6 \times 10^7$ - $3,2 \times 10^{12}$, $1,6 \times 10^7$ - $3,2 \times 10^{11}$, $1,6 \times 10^7$ - $3,2 \times 10^{10}$, $1,6 \times 10^7$ - $3,2 \times 10^9$, $1,6 \times 10^7$ - $3,2 \times 10^8$ ufc por ha). Los especialistas en la materia podrán ajustar las tasas para los
- 55
- 60

tratamientos a voleo (donde las aplicaciones se aplican a menor tasa pero son más frecuentes) y otros tratamientos menos comunes de la tierra. Cuando las composiciones se combinan o se usan con al menos un principio activo adicional, el al menos un principio activo adicional puede estar presente en una cantidad de entre aproximadamente 10 y aproximadamente 1000, entre aproximadamente 10 y aproximadamente 750, entre aproximadamente 10 y aproximadamente 500, entre aproximadamente 25 y aproximadamente 500 o entre aproximadamente 25 y aproximadamente 250 g/ha, y preferentemente en una cantidad de entre aproximadamente 50 y aproximadamente 200 g/ha. En otros términos, el al menos un principio activo adicional puede estar presente en una cantidad de entre aproximadamente $1,6 \times 10^7$ - $3,2 \times 10^{14}$, $1,6 \times 10^{13}$ - 8×10^{13} , $1,6 \times 10^8$ - $3,2 \times 10^{13}$, $1,6 \times 10^9$ - $3,2 \times 10^{12}$, 8×10^9 - $2,4 \times 10^{11}$, $1,6 \times 10^7$ - $3,2 \times 10^{13}$, $1,6 \times 10^7$ - $3,2 \times 10^{12}$, $1,6 \times 10^7$ - $3,2 \times 10^{11}$, $1,6 \times 10^7$ - $3,2 \times 10^{10}$, $1,6 \times 10^7$ - $3,2 \times 10^9$, $1,6 \times 10^7$ - $3,2 \times 10^8$ ufc por ha). Las composiciones de acuerdo con la presente invención pueden introducirse en la tierra antes de la siembra o antes de la germinación de las semillas. Las composiciones de acuerdo con la presente invención también pueden aplicarse sobre la localización en la que se encuentran las plantas, sobre la tierra que está en contacto con las raíces de las plantas, sobre la tierra que se halla en la base de las plantas o sobre la tierra que se encuentra alrededor de la base de las plantas (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 o aproximadamente 100 cm alrededor de la base de las plantas, o más). Las composiciones pueden aplicarse con una variedad de procedimientos, lo que abarca, sin limitaciones, el goteo, el rociado, la inyección y el riego. Las composiciones también pueden aplicarse sobre la tierra y/o sobre las plantas, cuando se encuentran en forma de retoños en bandejas, o bien pueden aplicarse sobre los brotes, antes de transportarlos a una localización diferente. Cuando se las aplica sobre la tierra que se halla en contacto con las raíces de las plantas, sobre la base de las plantas o sobre la tierra que se encuentra a una distancia específica alrededor de la base de las plantas, por ejemplo, en el contexto de un tratamiento de riego, las composiciones pueden aplicarse en una sola ocasión o en múltiples ocasiones. Las composiciones (que incluyen aquellas que comprenden al menos un principio activo adicional) pueden aplicarse en las tasas que se indicaron con anterioridad para los tratamientos de riego. Como alternativa, es posible aplicarlas en una tasa de entre aproximadamente 1×10^5 y aproximadamente 1×10^8 ufc por gramo de tierra, entre aproximadamente 1×10^5 y aproximadamente 1×10^7 ufc por gramo de tierra, entre aproximadamente 1×10^5 y aproximadamente 1×10^6 ufc por gramo de tierra, entre aproximadamente 7×10^5 y aproximadamente 1×10^7 ufc por gramo de tierra, entre aproximadamente 1×10^6 y aproximadamente 5×10^6 ufc por gramo de tierra o entre aproximadamente 1×10^5 y aproximadamente 3×10^6 ufc por gramo de tierra. En otros términos, las composiciones pueden aplicarse en una tasa de entre aproximadamente $1,6 \times 10^7$ - $3,2 \times 10^{14}$, $1,6 \times 10^{13}$ - 8×10^{13} , $1,6 \times 10^8$ - $3,2 \times 10^{13}$, $1,6 \times 10^9$ - $3,2 \times 10^{12}$, 8×10^9 - $2,4 \times 10^{11}$, $1,6 \times 10^7$ - $3,2 \times 10^{13}$, $1,6 \times 10^7$ - $3,2 \times 10^{12}$, $1,6 \times 10^7$ - $3,2 \times 10^{11}$, $1,6 \times 10^7$ - $3,2 \times 10^{10}$, $1,6 \times 10^7$ - $3,2 \times 10^9$, $1,6 \times 10^7$ - $3,2 \times 10^8$ ufc por ha. En una forma de realización, las composiciones de acuerdo con la presente invención se aplican en una sola ocasión, en una tasa de entre aproximadamente 7×10^5 y aproximadamente 1×10^7 ufc por gramo de tierra. En otra forma de realización, las composiciones de acuerdo con la presente invención se aplican en una sola ocasión, en una tasa de entre aproximadamente 1×10^6 y aproximadamente 5×10^6 ufc por gramo de tierra. En otras formas de realización, las composiciones de acuerdo con la presente invención se aplican en múltiples ocasiones, en una tasa de entre aproximadamente 1×10^5 y aproximadamente 3×10^6 ufc por gramo de tierra.

Preferentemente, las composiciones basadas en *Bacillus pumilus* de acuerdo con la presente invención constituyen entre aproximadamente 1 % p/p y aproximadamente 99 % p/p de una formulación mayor. Más preferentemente, las composiciones basadas en *Bacillus pumilus* de acuerdo con la presente invención constituyen entre aproximadamente 1 % p/p y aproximadamente 80 % p/p, entre aproximadamente 1 % p/p y aproximadamente 60 % p/p, entre aproximadamente 1 % p/p y aproximadamente 50 % p/p, entre aproximadamente 1 % p/p y aproximadamente 40 % p/p, entre aproximadamente 1 % p/p y aproximadamente 30 % p/p, entre aproximadamente 1 % p/p y aproximadamente 20 % p/p o entre aproximadamente 1 % p/p y aproximadamente 10 % p/p de una formulación mayor, y más preferentemente constituyen entre aproximadamente 5 % p/p y aproximadamente 50 % p/p de una formulación mayor.

Las composiciones basadas en *Bacillus pumilus* de acuerdo con la presente invención pueden aplicarse de manera independiente o en combinación con uno o más nematocidas adicionales, los cuales pueden ser nematocidas químicos o biológicos. En algunas formas de realización, *Bacillus pumilus* QST2808 se formula con al menos un nematocida adicional, y el producto combinado se aplica sobre las plantas o sobre la localización donde se encuentran. En otras formas de realización, las composiciones basadas en *Bacillus pumilus* se mezclan en tanques con formulaciones de nematocidas químicos o biológicos disponibles comercialmente y se aplican sobre las plantas o sobre la localización donde se encuentran. En otras formas de realización, las composiciones basadas en *Bacillus pumilus* de acuerdo con la presente invención se aplican sobre las plantas y/o sobre la localización donde se encuentran inmediatamente antes o después de aplicar formulaciones de nematocidas químicos o biológicos disponibles comercialmente. En otras formas de realización, las composiciones basadas en *Bacillus pumilus* de acuerdo con la presente invención se aplican sobre las plantas y/o sobre la localización donde se encuentran de manera alternada con formulaciones de nematocidas químicos o biológicos disponibles comercialmente. En un caso, las composiciones basadas en *Bacillus pumilus* se aplican como un tratamiento de semillas o como un tratamiento en surcos o de embebimiento, como se describen con más detalle a continuación. En algunos casos, en el contexto

de las formas de realización que se describieron con anterioridad, las formulaciones de nematocidas químicos o biológicos disponibles comercialmente se aplican en una tasa menor que la tasa recomendada para el uso del producto de manera individual, por ejemplo, en una tasa aproximadamente 1 %, aproximadamente 2 %, aproximadamente 5 %, aproximadamente 10 %, aproximadamente 15 %, aproximadamente 20 %, aproximadamente 25 %, aproximadamente 35 %, aproximadamente 45 %, aproximadamente 50 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 70 %, aproximadamente 75 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 90 % o aproximadamente 95 % menor.

En otras formas de realización, las composiciones basadas en *Bacillus* de acuerdo con la presente invención se aplican sobre las plantas, y/o sobre la localización donde se encuentran, por medio de una fumigación. Las fumigaciones se pueden aplicar mediante inyección por tubo, generalmente un mínimo de 20 cm debajo de la superficie del suelo. Las formulaciones líquidas de fumigantes también se pueden aplicar por quemigación por goteo en superficie para mover al fumigante hasta una profundidad de 20 cm o más por debajo de la superficie de la tierra. Los lechos de tierra tratada se cubren con una carpa de plástico para retener al fumigante en el suelo por varios días. Esto se efectúa antes de la siembra y a continuación se deja airear el suelo antes de la siembra. Las composiciones basadas en *Bacillus* que se describen en el presente documento se pueden aplicar después de dicho período de aireado ya sea antes, durante o después de la siembra. En algunos casos, los fumigantes se aplican a una dosis que es menor que la dosis recomendada en la etiqueta del producto.

Con anterioridad, se han descrito diversos nematocidas químicos y biológicos. Los ejemplos de formulaciones comerciales de cada uno de los fumigantes siguientes se indican entre paréntesis después de los nombres químicos. Los nematocidas que pueden aplicarse por medio de una fumigación incluyen los hidrocarburos halogenados, tales como la cloropicrina (CLOR-O-PIC®), el bromuro de metilo (METH-O-GAS®), las combinaciones que los comprenden (tales como BROM-O-GAS® y TERR-O-GAS®), el 1,3-dicloropropeno (TELONE® II, TELONE® EC, CURFEW®), las combinaciones que comprenden 1,3-dicloropropeno y cloropicrina (TELONE® C-17, TELONE® C-35, y INLINE®), el 1,2-dicloropropeno, el ioduro de metilo (MIDAS®), los liberadores de isocianato de metilo, tales como el metil ditiocarbamato de sodio (VAPAM®, SOILPREP®, METAM-SODIUM®), el dazomet, las combinaciones que comprenden 1,3 dicloropropeno e isotiocianato de metilo (VORLEX®), los liberadores de disulfuro de carbono, tales como el tetratiocarbonato de sodio (ENZONE®), y el disulfuro de dimetilo o DMDS (PALADINO®).

Las composiciones de acuerdo con la presente invención también se pueden aplicar como parte de un programa de manejo de plagas integrado ("MPI"). Dichos programas se describen en diversas publicaciones, en especial en las extensiones cooperativas universitarias. Dichos programas incluyen rotación de cultivos con cultivos que no albergan al nematodo blanco, prácticas de cultivo y labranza, y uso de trasplantes. Por ejemplo, las composiciones basadas en *Bacillus* se podrían aplicar después de una estación de crecimiento con mostaza u otro cultivo supresor de nematodos.

En algunas formas de realización, la aplicación de las composiciones de acuerdo con la presente invención a plantas, partes de plantas o loci de plantas está precedida por la identificación de un locus que necesita tratamiento. Dicha identificación se puede efectuar por identificación visual de las plantas que aparecen cloróticas, achaparradas, necróticas o marchitas (es decir, que parecen tener deficiencias de nutrientes) típicamente acoplado con antecedentes de problemas con nematodos; toma de muestras de plantas; y/o toma de muestras de tierra. La toma de muestras de plantas se puede efectuar durante la estación de crecimiento o inmediatamente después de la cosecha final. Las plantas se retiran de la tierra y se examinan sus raíces para determinar la naturaleza y extensión del problema con nematodos en un campo. Para los nematodos de los nudos de la raíz, la severidad de las agallas de las raíces se determina midiendo la proporción del sistema radicular afectado por agallas. Las agallas causadas por los nematodos de los nudos de la raíz se pueden distinguir de los nódulos de las bacterias de la tierra fijadoras de nitrógeno porque las agallas no se separan fácilmente de la raíz. Los niveles de la población en tierra de nematodos de los nudos de la raíz aumentan con la severidad de las agallas de la raíz. En algunos casos, la detección de cualquier nivel de formación de agallas en las raíces sugiere un problema de nematodos de los nudos de la raíz para plantar cualquier cultivo susceptible, en especial en o cerca del área de toma de muestras. Los nematodos quísticos también se pueden identificar con la toma de muestras de plantas y el escrutinio de las raíces por la presencia de quistes.

La toma de muestras de tierra ofrece un medio para determinar la cantidad de nematodos y/o de huevos de nematodos que infesta un determinado volumen de tierra o de raíces. La toma de muestras de tierra se puede efectuar cuando se sospecha de la existencia de un problema, al final de la cosecha o en cualquier momento antes de sembrar un nuevo cultivo, incluyendo antes de la destrucción del cultivo correspondiente al cultivo anterior. Los programas de extensión cooperativa universitaria ofrecen servicios de toma de muestras de tierra, incluyendo la Universidad de Florida, la Universidad del estado de Oregon y Universidad de Nebraska-Lincoln. Además, dichos programas proporcionan lineamientos acerca de la recolección de muestras. Por ejemplo, en un procedimiento de toma de muestras predictivo de post-cosecha, las muestras se recolectan a una profundidad en el suelo de entre 5 y 25 cm de 10 a 20 locaciones de campo en un área de 2 o 4 ha (dependiendo del valor del cultivo; muestras de menos hectáreas en el caso de cultivos de mayor valor) en un patrón regular en zigzag. En un procedimiento de evaluación de plantas establecidas, se eliminan muestras de raíces y de tierra a una profundidad en el suelo de entre 5 y 25 cm de plantas que se sospecha que son sintomáticas pero que no están muertas o moribundas; es decir, descomponiéndose.

En algunas formas de realización, la identificación comprende determinar si se ha alcanzado el umbral económico de una plaga de nematodo; es decir, el punto en el cual las pérdidas económicas esperadas sin tratamiento exceden los costos del tratamiento. El umbral económico varía dependiendo del cultivo, la geografía, el clima, el momento de la siembra, el tipo de suelo y/o la temperatura del suelo. Se han publicado numerosos artículos sobre este tema y se dispone de directrices de los programas de extensión universitaria cooperativa en diferentes áreas. Véase, por ejemplo, Robb, J.G., y col., "Factors Affecting the Economic Threshold for *Heterodera schachtii* Control in Sugar Beet", *Economics de Nematodo Control*, enero-junio, 1992; Hafez, Saad L. "Management de Sugar Beet Nematodo", Universidad de Idaho, serie de Información actual (CIS) 1071 (1998); y *UC IPM Plague Management Guidelines: Tomato*, Publicación UC ANR 3470, Nematodes A. Ploeg, Nematology, UC Riverside (Enero de 2008), cada uno de los cuales se incorpora específicamente en el presente documento a modo de referencia en su totalidad. La determinación del umbral económico para un cultivo particular en un momento particular del año es bien conocida por un especialista en la materia.

En algunas formas de realización, la toma de muestras de tierra revela que la infestación por nematodos causará un rendimiento que es de aproximadamente un 80 %, aproximadamente un 90 % o de aproximadamente un 95 % de lo normal para un suelo no infestado.

En algunas formas de realización, el umbral económico de nudos de raíces juveniles por kilogramo de muestra de tierra es de 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 formas de realización, el umbral económico de huevos y larvas de nematodo quístico por 1 cm³ de tierra es de al menos aproximadamente 0,5, al menos aproximadamente 1, al menos aproximadamente 2, al menos aproximadamente 3, al menos aproximadamente 4. De acuerdo con Hafez (1998), *supra*, un quiste puede estimarse como 500 huevos y larvas viables.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

Se llevaron a cabo estudios en semillas de pepino de la variedad Sultan para determinar la actividad de QST2808 sobre *Meloidogyne javanica*, que es un nematodo que provoca nudos en las raíces. En este estudio se usaron tubos de centrífuga de 50 ml que contenían 20 g de arena y una semilla sin germinar que había sido sometida a un tratamiento previo con un caldo completo de QST2808.

Se inocularon frascos de 250 ml que contenían 75 ml de un medio basado en 8 g del medio de Schaeffer TSB (8 g/l de TSB, 10 ml/l de KCl al 10 % (p/v), 10 ml/l de MgSO₄·7 H₂O al 1,2 % (p/v), 1,0 ml/l de Ca(NO₃)₂ 1 M, 1,0 ml/l de MnCl₂ 0,010 M, 1,0 ml/l de FeSO₄ 1 mM) con QST2808. Los frascos inoculados fueron incubados a 30°C durante 2 días, con agitación a aproximadamente 200 rpm. Se midió la densidad óptica, se recubrieron las semillas con la cantidad deseada de unidades formadoras de colonias (véase la tabla 2) y se las secó.

Se dejó que las semillas tratadas germinaran y crecieran en invernadero. Cuatro a cinco días después del tratamiento (DDT), se inoculó cada tubo con 100 nematodos de los nudos de la raíz en segunda etapa juvenil. A los 10 DDT se calificaron las plántulas por el porcentaje formación de agallas en raíces sobre una escala de 0-4, que se describe en la Tabla 1.

Las raíces se tiñeron luego con fucsina ácida para observar la penetración y el desarrollo de nematodos (véase la Tabla 2) y se observaron bajo un microscopio de disección Leica. Para la penetración de nematodos, se contaron los nematodos juveniles totales dentro de cada raíz. Para el desarrollo de nematodos, se contó un total de juveniles gordos incluyendo en la segunda etapa tardía juvenil (J2) y la tercera etapa juvenil (J3). La penetración de los nematodos en la raíz y el desarrollo de los nematodos después de la penetración se calificaron según se detalla en la Tabla 1. Por más detalles sobre las técnicas usadas, véase C.O. Omwega y col., "A Nondestructive Technique for Screening Bean Germ Plasm for Resistencia to *Meloidogyne incognita*", *Planta Disease* (1988) 72(11): 970-972, que se incorpora específicamente en el presente documento a modo de referencia en su totalidad.

Tabla 1. Esquema de calificación de la actividad de antagonista de nematodos de los caldos bacterianos completos. El índice de formación de agallas era en base al porcentaje de formación de agallas en raíces.

Índice de formación de agallas	
0	Ninguno
1	1-24 %
2	25-49 %

(continuación)

Indice de formación de agallas	
3	50-74 %
4	>75 %

Tabla 2. Resultados del tratamiento preliminar de las semillas con *Bacillus pumilus* QST2808

UFC de QST2808	Indice de formación de agallas	Penetración	Desarrollo
1×10^3	0,75	28,50	9,00
1×10^4	0,75	24,00	4,50
1×10^5	1,25	26,25	8,00
1×10^6	1,00	27,50	6,75
1×10^7	1,50	30,00	13,25
Control sin tratar	2,75	36,25	23,50

5 El grado de desarrollo (la cantidad total de nematodos dilatados) no fue significativamente diferente entre las tasas de 1×10^3 ufc y 1×10^6 ufc, pero hubo una diferencia significativa con relación al control sin tratar y con relación a la tasa de 1×10^7 ufc. En función de los datos relacionados con la penetración, puede establecerse que hubo una tendencia similar pero menos intensa. El aumento en el índice de formación de agallas que se obtuvo al incrementar la tasa puede deberse al incremento en la masa de las raíces.

10 Ejemplo 2

Se llevaron a cabo estudios en semillas de pepino de la variedad Sultan para determinar la actividad de QST2808 sobre *Meloidogyne javanica*, que es un nematodo que provoca nudos en las raíces. En este estudio, se emplearon semillas no germinadas que habían sido sometidas a un tratamiento preliminar con esporas de QST2808 a una tasa de 10^4 ufc, las cuales fueron sembradas en arena, en macetas de 950 ml (32 oz.).

15 Para obtener las esporas, se inocularon frascos de 250 ml que contenían 75 ml de un medio basado en 8 g del medio de Schaeffer TSB (8 g/l de TSB, 10 ml/l de KCl al 10 % (p/v), 10 ml/l de $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ al 1,2 % (p/v), 1,0 ml/l de $Ca(NO_3)_2$ 1 M, 1,0 ml/l de $MnCl_2$ 0,010 M, 1,0 ml/l de $FeSO_4$ 1 mM) con QST2808. Los frascos inoculados fueron incubados a 30°C durante 2 días, con agitación a aproximadamente 200 rpm. Se midió la densidad óptica, se recubrieron las semillas con la cantidad deseada de unidades formadoras de colonias y se las secó.

20 Las semillas tratadas fueron sembradas en macetas de 32 oz., donde se permitió que germinaran. Posteriormente, se las cultivó en un invernadero. Aproximadamente 30 días después de la siembra, se inoculó la tierra en la que se hallaba cada planta con aproximadamente 2000 nematodos *Meloidogyne javanica* juveniles de la segunda etapa. Las raíces se cosecharon aproximadamente 4 semanas de la inoculación, momento en el cual se las pesó, se determinó la severidad de la enfermedad y se calificó la formación de agallas. La severidad de la enfermedad se determinó en función de una escala que varió entre 0 y 3, donde 0 representa la ausencia de síntomas y 3 representa la presencia de síntomas severos, particularmente en el contexto de la putrefacción y la decoloración de las raíces. La formación de agallas se determinó con el procedimiento que se describe en Bridge, J., y Page, S. J. L., Tropical Pest Management 26(3) 1980 pp. 296-298. Las raíces de las semillas que fueron tratadas con QST2808 fueron aparentemente más grandes y más saludables que los controles sin tratar y que las raíces que fueron tratadas con otras bacterias candidatas. Los resultados cuantitativos se detallan en la tabla 3 a continuación.

30 Basándose en estos resultados, puede inferirse que *B. pumilus* podría promover la tolerancia a los nematodos.

Tabla 3

	Severidad de la enfermedad (en una escala entre 0 y 3)	Peso fresco de las raíces (g)	SD del peso fresco de las raíces	Calificación de las agallas (en una escala entre 0 y 10, de acuerdo con Bridge & Page, 1989)	Cantidad total estimada de huevos por raíz
CNT	3,0	4,793333	3,080817	No pudo calificarse	0,00
Candidato 1	2,7	8,82	3,053981	No pudo calificarse	0,00
Candidato 2	3,0	3,753333	1,581845	1	0,00
Candidato 3	0,0	18,70667	5,861777	1,333333	233,33

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un procedimiento para controlar los nematodos en una planta o sobre ella, en una parte de una planta y/o en la localización donde se desarrolla una planta, **que** comprende aplicar sobre la planta que se necesita proteger de los nematodos, sobre una parte de la planta o sobre la localización donde se desarrolla la planta una cantidad eficaz de *Bacillus pumilus* QST2808.
2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, **en el que** la aplicación es precedida por la identificación de una planta, una parte de una planta o una localización donde se desarrolla una planta que se necesita proteger de los nematodos.
- 10 3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2, **en el que** la identificación abarca el descubrimiento de una localización donde se cultivan plantas que presenta un umbral de infestación de nematodos que es superior al que resultaría aceptable desde el punto de vista económico.
4. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, **en el que** la localización es la tierra.
5. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4, **en el que** *Bacillus pumilus* QST2808 se aplica antes de la siembra.
- 15 6. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4, **en el que** *Bacillus pumilus* QST2808 se aplica en el momento de la siembra.
7. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4, **en el que** *Bacillus pumilus* QST2808 se aplica después de la siembra.
- 20 8. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **en el que** *Bacillus pumilus* QST2808 se aplica en una tasa de $1,6 \times 10^7$ a $3,2 \times 10^{14}$ ufc por ha.).
9. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, **en el que** *Bacillus pumilus* QST2808 se aplica sobre las semillas.
10. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **en el que** *Bacillus pumilus* QST2808 es un producto de la fermentación.
- 25 11. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **en el que** el producto de la fermentación comprende *Bacillus pumilus* QST2808, metabolitos y caldo residual de la fermentación.
12. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **en el que** también comprende aplicar un segundo nematicida.
- 30 13. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 12, **en el que** el segundo nematicida es un nematicida químico que se selecciona del grupo que consiste en un carbamato, un organofosfato y las combinaciones de éstos.
14. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 12, **en el que** el segundo nematicida se aplica en combinación con *Bacillus pumilus* QST2808.
15. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 12, **en el que** el segundo nematicida se aplica de manera alternada con *Bacillus pumilus* QST2808.
- 35 16. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 14, **en el que** el segundo nematicida es un producto formulado disponible comercialmente.
17. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 16, en el que el segundo nematicida se aplica a una tasa que es menor que la tasa recomendada en la etiqueta de un producto para el segundo nematicida cuando el segundo nematicida se aplica como un tratamiento individual.
- 40 18. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, **en el que** los nematodos son nematodos que provocan enfermedades asociadas a los nudos en las raíces.