

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 702 497**

51 Int. Cl.:

C12R 1/07 (2006.01)

A01N 63/00 (2006.01)

A01P 3/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.08.2012 PCT/HU2012/000084**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.03.2013 WO13034938**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.08.2012 E 12783651 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.09.2018 EP 2753181**

54 Título: **Uso de una cepa de Bacillus mojavensis productora de fengicina y resistente al cobre para controlar fitopatógenos**

30 Prioridad:

08.09.2011 HU P1100498

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

01.03.2019

73 Titular/es:

**SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM (100.0%)
Dugonics tér 13.
6720 Szeged, HU**

72 Inventor/es:

**MANCZINGER, LÁSZLÓ;
VÁGVÖLGYI, CSABA;
SAJBEN, ENIKŐ;
NAGY, ÁRPÁD;
SZÖKE-KIS, ZOLTÁN;
NAGY, ADRIENN;
TURÓCZI, GYÖRGY y
KOVÁCS, ANDRÁS**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 702 497 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

Uso de una cepa de *Bacillus mojavensis* productora de fengicina y resistente al cobre para controlar fitopatógenos

Breve descripción de la invención

5 La invención se refiere a un material biológico para ejercer antagonismo contra fitopatógenos, que contiene la cepa mutante R3B de *Bacillus mojavensis* depositada bajo el número NCAIM (P) B 001389 de acuerdo con el Tratado de Budapest. El material biológico de acuerdo con la invención es un antagonista eficaz contra los fitopatógenos, preferiblemente de tomate, pimiento, lechuga y/o col, en particular contra los patógenos seleccionados del grupo de bacterias fitopatógenas *Xanthomonas vesicatoria*, *Pseudomonas syringae* y *Clavibacter michiganensis*, y hongos fitopatógenos *Pythium debaryanum*, *Phytophthora infestans*, *Alternaria alternata* y *Fusarium oxysporum*. Además, la
10 invención se refiere a una composición que comprende el material biológico de acuerdo con la invención y, optativamente, un plaguicida que contiene cobre y un procedimiento para controlar los fitopatógenos, el uso adicional del material biológico o composición de acuerdo con la invención para la protección de verduras, preferiblemente tomate, pimiento, lechuga y/o col.

Antecedentes de la invención

15 El control eficaz de plagas es parte de las tecnologías de producción vegetal intensiva, aunque las expectativas de los mercados de consumo, además de los esfuerzos para mejorar la seguridad alimentaria, requerían que se usara la menor cantidad posible de plaguicidas y los remplazó por métodos biológicos. En la producción en un área confinada, se ha conseguido el control biológico total contra las plagas de insectos, aunque todavía no se ha elaborado el control biológico de las bacterias y de los hongos.

20 Hoy en día, existe una necesidad creciente, en los campos de la producción y venta de verduras, de productos biológicos que no contienen restos de plaguicidas químicos. Entre los plaguicidas químicos eficaces, solo se permite el uso de composiciones con cobre inorgánico durante la producción de productos biológicos. El número de mutantes resistentes al cobre entre los microorganismos fitopatógenos se ha incrementado mucho en los últimos dos años, por lo que estos agentes que contienen cobre no son suficientes por sí solos para conseguir un control eficaz y fiable de
25 las plagas. Una posible solución para superar este problema es efectuar un control integrado de plagas mediante el uso de agentes que contienen cobre y composiciones para control biológico. Los productos para control biológico también se pueden utilizar solos, pero, en tales casos, la mayor eficacia de las mejores composiciones está aún por debajo del 50%.

30 La mayoría de los productos antibacterianos o antifúngicos para control biológico actualmente disponibles en el mercado mundial contienen un componente como agente activo, que es una bacteria u hongo que posee rasgos antagonistas y/o parasitarios. Las cepas de *Bacillus* se han utilizado desde hace tiempo con el propósito de control de plagas de las plantas. Las composiciones que se venden son especialmente eficaces contra los hongos fitopatógenos. Las composiciones que ya se han comercializado y patentado comprenden principalmente cepas de las especies *Bacillus subtilis* y *Bacillus amyloliquefaciens*. Su eficacia se explica por los diferentes antibióticos peptídicos, secretados al exterior de la pared celular, que son eficaces principalmente contra los hongos: surfactina, iturina, fengicina, bacilomicina, micosubtilina. Recientemente, se ha sugerido que su eficacia se ve realzada por las enzimas extracelulares que descomponen las paredes celulares y/o la membrana del citoplasma del microorganismo patógeno: proteasas, quitinasas y lipasas. Además, diferentes investigaciones han demostrado de manera independiente que,
35 entre los antibióticos secretados, la fengicina es la principal responsable de ejercer la respuesta de resistencia inducida en las plantas tratadas.

El estado de la técnica

40 En la patente de los EE. UU. n.º 2010092442 se hace referencia a un procedimiento para inducir una resistencia sistémica adquirida de las plantas contra las infecciones. El método se basa en la utilización de una composición que comprende bacterias que pertenecen a cepas de *Bacillus*, a consecuencia de lo cual la planta produce proteínas protectoras. Las bacterias aplicadas son el aislado 203-7 de *Bacillus mojavensis* y el aislado BmJ de *Bacillus mycoides*. El inconveniente del aislado de *Bacillus mojavensis* es, por una parte, que no se propone la aplicación conjunta del aislado 203-7 de *Bacillus mojavensis* y del agente antibacteriano, y, por otra parte, que la cepa aislada no es resistente al cobre, por lo que la aplicación combinada de la misma con plaguicidas que contienen cobre no conseguiría el efecto
45 esperado de control de plagas. Además, el aislado 203-7 de *Bacillus mojavensis* descrito en la patente no tiene propiedades de hiperproducción de fengicina.

50 En la solicitud de patente internacional n.º WO 09724433 se describen métodos y microorganismos para el control biológico que son capaces de controlar las enfermedades de origen fúngico que sufren las plantas. Los microorganismos útiles para los propósitos de control biológico son nuevas cepas del simbionte endófito *Enterobacter cloacae*. Dichas cepas son idóneas para introducir productos genéticos útiles en las plantas. Las cepas de *Enterobacter cloacae* utilizadas son resistentes a la rifampicina. El análisis de la secuencia génica del ARNr 16S de las cepas de *Enterobacter cloacae* de acuerdo con la solicitud de patente (depositada bajo el n.º ATCC55732) ha demostrado que son cepas de *Bacillus mojavensis*. El defecto del aislado de acuerdo con la solicitud de patente es que no tiene resistencia al cobre, por lo que es muy probable que se desaconseje su coaplicación con plaguicidas que

contienen cobre.

En la solicitud de patente internacional n.º WO 9909834 se describen composiciones y métodos para el tratamiento del suelo cultivable que son capaces de mejorar el crecimiento de las plantas y los resultados de la cosecha. La composición contiene cepas de microorganismos resistentes a los plaguicidas. Una cepa o una mezcla de diferentes cepas entre los microorganismos de la composición se aplica en el suelo cultivable adherido a las semillas de las plantas. Los microorganismos de la composición se seleccionan de *Azospirillum lipoferum* ssp. lip7R 885, *Azospirillum amazonense* ssp. K21R 887, *Azospirillum irakense* ssp. 5041R 889, *Azospirillum brasilense* ssp. A41R 879, *Azotobacter vinelandii* ssp. ESZ 2132, *Pseudomonas* sp. Szeged 344 O. P. 14, *Pseudomonas fluorescens* var. MOB24, Res24, *Bacillus circulans* var. Res. 97, *Bacillus megaterium* var. Res. 54, *Rhizobium meliloti* var. PolRes. 7, *Alcaligenes faecalis* var. Res36 y PhyllO6-R+32. Las cepas de las bacterias se han aislado del entorno de diferentes plantas y suelos heterogéneos, y a continuación se han hecho resistentes al plaguicida. El objeto de la solución de acuerdo con la solicitud de patente es entonces otro que el antagonismo contra las plagas de las verduras.

En la solicitud de patente internacional n.º WO 9821964 se hace referencia a una cepa independiente de *Bacillus subtilis* que es capaz de inhibir los hongos y las bacterias fitopatógenos. La cepa de *Bacillus subtilis* de acuerdo con el documento de la técnica anterior capaz de proteger diferentes plantas (frutas, verduras) de las infecciones ocasionadas por los patógenos seleccionados de las bacterias y *Botrytis*, *Fusarium*, *Phytophthora*, *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Alternaria*, *Trichoderma*, *Monilinia*, *Puccinia*, *Rhizoctonia*, *Pythium* y *Plasmopara*. La cepa también se puede aplicar junto con plaguicidas, aunque tiene el inconveniente de carecer de resistencia al cobre, por lo que la aplicación de plaguicidas que contienen cobre queda descartada en este caso.

Vágvölgyi et al. [*Cereal Research Communications*, Szeged, HU, vol. 37, n.º supl. S, (1-1-2009), págs. 589-592] describe tres cepas de *Bacillus mojavensis* que muestran una alta tolerancia al cobre según se analizó en, p. ej., *Alternaria solani* y *Pythium ultimum*. Sin embargo, estas cepas de *Bacillus mojavensis* son diferentes entidades biológicas de las dadas a conocer por nuestra invención, a saber, la cepa mutante R3B de *Bacillus mojavensis*, en donde dicha cepa mutante muestra un efecto antagonista contra, p. ej., *Alternaria alternata*, y *Pythium debaryanum*, y en donde dicha cepa mutante aparece de manera espontánea después de transferir la cepa B5 de *Bacillus mojavensis* sobre un medio de cultivo que contiene sulfato de cobre a 400 µg/ml, tal y como se describe más adelante.

Se ha visto a partir de lo anterior que las soluciones de acuerdo con el estado de la técnica describen bacterias relevantes desde el punto de vista de control de plagas, que se pueden aplicar junto con plaguicidas, aunque fracasan a la hora de describir una cepa bacteriana resistente al cobre, que permitiría utilizar más plaguicidas que contienen cobre con el fin de conseguir una protección más eficaz de la planta. Además, existe la necesidad de composiciones con las que se pudiera conseguir un control eficaz de las bacterias fitopatógenas resistentes al cobre. Por lo tanto, existe la necesidad de nuevas composiciones contra bacterias y hongos fitopatógenos que solucionarían el inconveniente del estado de la técnica, sobre todo la aplicación de tecnologías de control de plagas complicadas, en múltiples etapas y medioambientalmente estresantes. Con el fin de satisfacer estas necesidades, se ha realizado una investigación y un desarrollo sistemáticos, como resultado de los cuales se ha completado la invención.

Descripción detallada de la invención

Definiciones

El término «plaga» o «patógeno», tal y como se usa en la presente descripción, significa un virus, una bacteria o un hongo, que vive de forma parasitaria en diferentes organismos vivos y que se hospeda y reproduce en el hospedador o en su cuerpo (p. ej., en un humano), y provoca una enfermedad. La medida de la capacidad para infectar, la patogenicidad, puede ser variable incluso dentro de una especie.

El término «efecto antagonista» o «antagonismo», tal y como se utiliza en la presente descripción, significa una relación entre los microorganismos en la cual se matan o se bloquean los miembros de una especie, o se inhibe su reproducción, mediante representantes de otra especie, p. ej., a través de sustancias químicas (p. ej., antibióticos, enzimas extracelulares) producidas por ellos.

El término «agente de control de plagas» o «plaguicida», tal y como se utiliza en la presente descripción, significa un agente (sustancias químicas, otros agentes y una combinación de los mismos) protector de la planta, cuya aplicación pretende matar, excluir, impedir, inhibir o cualquier clase de control de organismos patógenos, gracias a lo cual se protegen las plantas con eficacia. El plaguicida de acuerdo con la invención lo puede seleccionar el experto en la técnica al tener en cuenta cuestiones de salud y de seguridad, sin demasiada experimentación.

El término «formulación de la dosis», tal y como se utiliza en la presente descripción, caracteriza el tipo de formulación de acuerdo con la composición, que se determina de acuerdo con el *Catálogo de los tipos de formulaciones de plaguicidas y del sistema de códigos internacionales* (Crop-Life International Technical Monography, n.º 2, 5.ª edición, 2002). Puede ser, p. ej., suspensión acuosa, concentrado en suspensión, concentrado encapsulado, pulverizador líquido formador de emulsión, gránulo, gránulo disgregable en agua, microgránulo, polvo hidrosoluble, pero no se limita a estos. La formulación de la dosis que se puede utilizar de acuerdo con la invención la puede seleccionar el experto en la técnica sin demasiada experimentación.

El término «plaguicida que contiene cobre», tal y como se utiliza en la presente descripción, significa una composición para el control de plagas que contiene cobre. El significado del plaguicida que contiene cobre no está particularmente limitado y se puede seleccionar del grupo de sulfato de cobre, oxiquinolato de cobre, óxido de cobre, hidróxido de cobre y oxiclورو de cobre. El plaguicida que contiene cobre de acuerdo con la invención lo puede seleccionar el experto en la técnica sin demasiada experimentación.

El término «excipiente», tal y como se utiliza en la presente descripción, no está particularmente limitado y los excipientes se pueden seleccionar del grupo que se describe a continuación:

a) en caso de una formulación líquida, p. ej., agua o un solvente orgánico (p. ej., xileno, metanol, etilenglicol o aceite mineral), un estabilizante de dispersión, un tensioactivo (p. ej., dodecibencenosulfonato de calcio, éter poliglicólico, alquilfenol etoxilado o sulfonatos de alquilarilo), optativamente ceras,

b) en el caso de una formulación granular, montmorillonita, bentonita, harina de madera, almidón, celulosa y un aglutinante, tal como, p. ej., un aceite mineral, alcohol polivinílico o sacarosa,

c) y otro aditivo y/o excipiente habitual conocido por sí mismo.

El excipiente de acuerdo con la invención lo puede seleccionar el experto en la técnica sin demasiada experimentación.

Descubrimiento de acuerdo con la invención

Como resultado del trabajo experimental sistemático dirigido a la presente invención, se ha encontrado sorprendentemente que la cepa mutante R3B de *Bacillus mojavensis*

a) ejerce un efecto antagonista más fuerte contra los patógenos,

b) lleva resistencia al cobre, y

c) induce resistencia contra los fitopatógenos

a diferencia/en comparación con el estado de la técnica.

Descripción detallada de la invención

Sobre la base de lo anterior, la presente invención se refiere en su primer aspecto a un material biológico para ejercer antagonismo contra los fitopatógenos que contiene la cepa mutante R3B de *Bacillus mojavensis* depositada bajo el n.º NCAIM (P) B 001389 de acuerdo con el Tratado de Budapest. El material biológico de acuerdo con la invención es un antagonista eficaz contra los fitopatógenos, preferiblemente de tomate, pimiento, lechuga y/o col, en particular contra los patógenos seleccionados del grupo de bacterias fitopatógenas *Xanthomonas vesicatoria*, *Pseudomonas syringae* y *Clavibacter michiganensis*, y hongos fitopatógenos *Pythium debaryanum*, *Phytophthora infestans*, *Alternaria alternata* y *Fusarium oxysporum*.

Aunque no se desea restringir la explicación del efecto antagonista de acuerdo con la presente invención a una teoría, se puede observar que el único efecto del material biológico de acuerdo con la invención contra los patógenos es, por una parte, que inhibe la operación de los patógenos en la rizosfera de las plantas y, por otra parte, que al mismo tiempo induce resistencia en la planta protegida contra los patógenos inhibidos.

En el segundo aspecto, la presente invención se refiere a una composición que comprende un cultivo del material biológico de acuerdo con la invención y, optativamente, un plaguicida que contiene cobre, preferiblemente sulfato de cobre, oxiquinolato de cobre, óxido de cobre, hidróxido de cobre u oxiclورو de cobre y, optativamente, un excipiente.

Sobre la base de lo anterior, el plaguicida que contiene cobre de acuerdo con la presente invención no está particularmente limitado, siempre y cuando no mate el material biológico de acuerdo con la invención o no inhiba su operación en un grado indeseado, y tales plaguicidas útiles que contienen cobre incluyen sulfato de cobre, oxiquinolato de cobre, óxido de cobre, hidróxido de cobre u oxiclورو de cobre, pero no se limitan a estos. El plaguicida de acuerdo con la invención lo puede seleccionar el experto en la técnica sin demasiada experimentación.

Sobre la base de lo anterior, el excipiente de acuerdo con la presente invención no está particularmente limitado, siempre y cuando no disminuya la eficacia del material biológico de acuerdo con la presente invención como un agente activo, o una combinación de agente activo biológico y químico, y los excipientes aplicables incluyen, sin limitación, lo siguiente:

a) en caso de una formulación líquida, p. ej., agua o un solvente orgánico (p. ej., xileno, metanol, etilenglicol o aceite mineral), un estabilizante de la dispersión, un tensioactivo (p. ej., dodecibencenosulfonato de calcio, éter poliglicólico, alquilfenol etoxilado o sulfonatos de alquilarilo), optativamente ceras,

b) en el caso de una formulación granular, montmorillonita, bentonita, harina de madera, almidón, celulosa y un aglutinante, tal como, p. ej., un aceite mineral, alcohol polivinílico o sacarosa,

c) y otro aditivo y/o excipiente habitual conocido por sí mismo.

El excipiente de acuerdo con la invención lo puede seleccionar el experto en la técnica sin demasiada experimentación.

5 La presentación farmacéutica de acuerdo con la presente invención no está particularmente limitada, siempre y cuando sea idónea para la aplicación del material biológico de acuerdo con la invención como agente activo, o la composición que contiene dicho material biológico de acuerdo con la invención para la protección de la planta o cualquier parte de la misma. Tales presentaciones farmacéuticas aplicables incluyen sin limitación lo siguiente: suspensión acuosa, concentrado en suspensión, concentrado encapsulado, pulverizador líquido formador de emulsión, gránulo, gránulo disgregable en agua, microgránulo, polvo hidrosoluble. La formulación de la dosis que se puede utilizar de acuerdo con la invención la puede seleccionar el experto en la técnica sin demasiada experimentación.

10 En su tercer aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para controlar fitopatógenos de acuerdo con lo cual el material biológico o la composición de acuerdo con la invención se aplica a una planta, preferiblemente una verdura, más preferiblemente a tomate, pimiento, lechuga y/o col. El material biológico de acuerdo con la invención se aplica preferiblemente a las semillas de la planta protegida, a las raíces de la planta protegida, al tallo de la planta protegida, a las hojas de la planta protegida, a los brotes de la planta protegida, al ramaje de la planta protegida o a los frutos de la planta protegida, se mezcla con el agua de riego de la planta y/o se pulveriza sobre la planta protegida.

15 Finalmente, la invención se refiere al uso del material biológico o la composición de acuerdo con la invención para el control de plagas, preferiblemente para el control de las plagas de verduras, más preferiblemente para el control de las plagas de tomate, pimiento, lechuga y/o col, y además para inducir resistencia en dichas plantas contra los patógenos de acuerdo con la presente invención.

20 Ejemplos

A continuación, la invención se detalla aún más a través de los ejemplos de preparación y de trabajo, al hacer referencia a las figuras que se recogen más adelante, adjuntas a la descripción.

En la figura 1 se muestra la actividad antagonista de 20 cepas bacterianas en función de la concentración de cobre.

25 En la figura 2 se muestra el cambio del efecto antagonista contra los hongos en función de la concentración de cobre, una media de 20 cepas.

En la figura 3 se muestra la cromatografía en capa fina del espectro de antibióticos secretados por la cepa B5 de *Bacillus mojavensis*.

En la figura 4 se muestra la cinética de la producción de los antibióticos de la cepa B5 de *Bacillus mojavensis* en un fermentador.

30 En la figura 5 se muestra la capacidad para producir la proteasa extracelular que tienen *Bacillus mojavensis* B5 y los mutantes resistentes al cobre fabricados a partir de la misma.

En la figura 6 se muestra la inhibición de *Pseudomonas syringae* debida a *Bacillus mojavensis* B5 y a los mutantes resistentes al cobre fabricados a partir de la misma.

Aislamiento de la cepa B5 de *Bacillus mojavensis*

35 En el transcurso de los experimentos, se ha analizado la capacidad antagonista de 82 cepas de bacterias endófitas y 44 cepas bacterianas aisladas de la rizosfera, y a continuación se han seleccionado las 20 mejores cepas antagonistas y su capacidad antagonista se ha analizado en presencia de cobre. Entre las 10 cepas de *Bacillus* resistentes al cobre que son las mejores antagonistas, la cepa B5 de *Bacillus mojavensis* poseía los mejores rasgos antagonistas, sobre todo la cepa mutante R3B resistente al cobre, que es la materia objeto de la reivindicación para la protección.

40 Aislamiento de las cepas bacterianas dominantes a partir de la rizosfera y de las raíces de las plantas producidas, y el análisis de su antagonismo

45 Los aislamientos se hicieron de la superficie de la raíz y de los rizomas de diferentes especies de tomate y pimiento en medio de cultivo selectivo de bacterias. Se aislaron 10-10 cepas de los tipos de colonias dominantes en el caso de cada muestra analizada. Los mejores antagonistas se seleccionaron contra *Pseudomonas syringae*, *Xanthomonas vesicatoria*, *Erwinia carotovora* y *Phytophthora infestans*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Alternaria solani* y *Botrytis cinerea* con análisis de antagonismo preliminares sobre placas de cultivo. Estas se identificaron a nivel de especie mediante la secuenciación parcial del gen de su ARNr 16S para descartar los fitopatógenos en los exámenes posteriores. La eficacia de las cepas no patógenas se analizó contra otras bacterias y hongos fitopatógenos. Se seleccionaron 40 de los mejores antagonistas para los exámenes del tratamiento de las plantas *in vivo*.

50 Aislamiento y análisis de las bacterias endófitas

Se aislaron 82 cepas de bacterias endófitas a partir de las raíces y de las semillas de diferentes plantas (perejil,

zanahoria, tomate, pimiento, col blanca, lechuga, cebolla de primavera, pepino). Su capacidad para antagonizar las cepas fitopatógenas de *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*, *Xanthomonas campestris pv vesicatoria*, *Erwinia carotovora* y *Pseudomonas syringae* se analizó con pruebas de antagonismo *in vitro*. El potencial antagonista de las 10 mejores cepas se analizó también frente a los hongos fitopatógenos *Phytophthora infestans*, *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia sclerotiorum* y *Alternaria tenuis*. Además, se analizó el efecto del pH sobre el crecimiento: se determinó qué cepas consiguen crecer a pH = 5,5. Esto tiene importancia para su aplicabilidad en los suelos más ácidos. Se realizó la prueba preliminar de tolerancia al cobre con las cepas (esto es importante por motivos de su aplicabilidad en el control integrado de plagas) con los medios de cultivo que contienen 25 y 50 µg/ml de CuSO₄ y se halló que 71 y 49 cepas crecían en los valores analizados. Para determinar las cepas, se amplificó el gen del ARNr 16S por PCR (cebadores: Eub8F y Eub534R), se secuenció, y se comparó luego con las bases de datos para descartar las cepas de fitopatógenos o de patógenos humanos. Se utilizaron 10 bacterias antagonistas buenas para las pruebas con plantas entre las 82 bacterias endófitas originales.

Examen de las cepas bacterianas aisladas a partir de la rizosfera

Se tomaron muestras de un invernadero, de la lana mineral de plantas de tomate que he hicieron crecer en un sistema hidropónico, y se aislaron 39 cepas en un medio de cultivo tamponado a pH = 5,5. Su antagonismo se analizó frente a *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora infestans*, *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Alternaria tenuis*, *Clavibacter michiganensis*, *Xanthomonas campestris pv vesicatoria* y *Pseudomonas syringae*.

De las 10 muestras que se originan de 44 cepas de suelo cultivable, se aislaron en un medio de cultivo a pH = 5,5, 28 cepas con la capacidad para crecer en condiciones de frío y 27 cepas en un medio de cultivo selectivo de *Pseudomonas* mediante el uso de los métodos selectivos para la cepa de *Bacillus*. Estas cepas se analizaron frente a *Clavibacter michiganensis*, *Xanthomonas campestris pv vesicatoria* y *Pseudomonas syringae* mediante pruebas de antagonismo *in vitro*. Para determinar las cepas, se amplificó el gen del ARNr 16S por PCR (cebadores: Eub8F y Eub534R), se secuenció, y luego se comparó con las bases de datos para descartar las cepas fitopatógenas o patógenas de humano.

Preparación de mutantes resistentes al cobre a partir de las cepas bacterianas que muestran un antagonismo excelente

La sensibilidad a los iones de cobre que presentan las cepas que muestran un excelente antagonismo en el espectro más amplio se determinó mediante el método de dilución en medio de cultivo (figura 1). A continuación, se prepararon las cepas con una tolerancia a los iones de cobre que exceden los 200 µg/ml mediante la selección por la resistencia espontánea al cobre.

La prueba se realizó con 20 cepas preseleccionadas: B2, B5, B7, B12, B14, B19, B23, B40, B52, B60, B73, B83, B198, B208, B209, B212, B215, B218, B219, y B221. Las cepas se mantuvieron en medio de cultivo con peptona a la temperatura de +5 °C, para prolongar la vida útil en el medio de cultivo YDC, también a la temperatura de +5 °C. Las pruebas, como la mayoría de las pruebas que vendrán a continuación, se realizaron en el líquido o medio de cultivo con peptona. La tolerancia al cobre de las cepas se analizó en un medio de cultivo que contenía 10, 20, 40, 100 y 200 ppm de cobre. El cobre se mezcló en el medio de cultivo en forma de sulfato de cobre, comenzando con la solución concentrada a 10 000 ppm, y calculando la concentración para el agente activo del cobre. El cultivo recién preparado de la bacteria se utilizó para preparar una suspensión de 10⁹/ml y 100 µl de esto se transfirieron a placas de Petri de 9 cm. La evaluación se realizó de manera continua, unos 2 a 3 días después. En la prueba hecha en el líquido de cultivo, se añadieron 10 µl de la suspensión bacteriana con la misma concentración a los 10 ml del líquido de cultivo. La evaluación se realizó 2 días después, y se midió la densidad óptica (660 nm) y se confirmó con una cámara Bürker. La incubación se realizó en cada caso a una temperatura de 22 a 25 °C en la oscuridad.

Las 20 cepas se hicieron crecer en el medio de cultivo y en el líquido de cultivo incluso con una concentración de cobre de 200 ppm, y no se reveló ninguna diferencia significativa en comparación con el crecimiento a la concentración de cobre más baja.

En las pruebas que vienen a continuación, la concentración de cobre del medio de cultivo se incrementó a 400 y 800 ppm, respectivamente. A 400 ppm, las cepas B5, B198, B208, B219 y B221 ya no mostraban ningún crecimiento, y las otras aún crecieron un poquito más. La concentración de 800 ppm dio lugar a una inhibición completa. Al mismo tiempo, al transferir a un medio de cultivo de 400 ppm, luego a una concentración de cobre de 800 ppm, se aislaron colonias de cada cepa que eran capaces de crecer en tal concentración elevada, y se pudieron mantener en un medio de cultivo con dicha concentración de cobre. Ya que la concentración de cobre de 400 ppm y en particular de 800 ppm es mayor que el valor necesario para inhibir el crecimiento de los hongos y bacterias fitopatógenos que, además, puede aparecer en los suelos, no era razonable aislar cepas tolerantes con una concentración de cobre incluso más alta. Las cepas tolerantes al cobre se mantuvieron en un medio de cultivo que contenía cobre a 800 ppm a la temperatura de +5 °C.

Antagonismo frente a los fitopatógenos, el efecto del cobre sobre el antagonismo

Las pruebas se realizaron con las 20 cepas bacterianas anteriores, frente a los siguientes fitopatógenos:

Pseudomonas syringae (5 cepas)

Pythium ultimum

Phytophthora infestans (3 cepas)

Sclerotinia sclerotiorum

5 *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopesci*

Alternaria solani

Rhizoctonia solani

10 Los análisis del antagonismo se realizaron en un agar con peptona, en PDA, que es más idóneo para los hongos y, en el caso de las cepas de *Phytophthora*, en un agar de guisante, complementado el medio de cultivo con 0, 50, 100 y 200 ppm de cobre. Las cepas bacterianas antagonistas se inocularon a partir de un cultivo recién preparado, mediante el uso de un disco de papel de filtro con un diámetro de 5 mm, en una tercera parte del disco de medio de cultivo de 9 cm, al mismo tiempo, en frente de ellos en la segundo tercio del disco del medio de cultivo, las cepas fitopatógenas de *Pseudomonas* se inocularon mediante un método similar, y los hongos además se inocularon al hacer
15 uso de un recorte de un diámetro 5 mm del disco de micelio del cultivo recién preparado. La incubación tuvo lugar en cada caso a una temperatura de 22 a 25 °C, en la oscuridad.

La evaluación comenzó 2 días después y se hizo continuamente, al medir las zonas de inhibición que aparecían. La evaluación de los resultados se hizo mediante análisis de varianza de uno y dos factores.

20 A partir de los resultados, se puede observar que había diferencias significativas entre las cepas bacterianas antagonistas en cuanto al antagonismo mostrado contra los hongos patógenos (*Pythium* y hongos genuinos), aunque esta diferencia era insignificante ($p = 0,05$) en el medio de cultivo que contenía cobre. Al mismo tiempo, la diferencia creció más tras la adición de cobre a 50 ppm, y 100 y 200 ppm dieron lugar a una diferencia significativa entre las cepas (figura 1).

25 La adición del cobre incrementó ligeramente la actividad antagonista, aunque la diferencia promedio de cinco hongos probados (*P. ultimum*, *S. sclerotiorum*, *A. solani*, *F. oxysporum* y *R. solani*) era significativa solo a la concentración de cobre de 200 ppm (figura 2). Al mismo tiempo, merece la pena mencionar que esta concentración incrementó significativamente el crecimiento de los hongos problema y dificultó la evaluación de los resultados. En el caso de las cepas B2, B5, B7, B12, B19, B23, B40, B52, B60, B73, B83, B198, B208, B209, B219 y B221, se experimentó un efecto antagonista definitivamente más fuerte en tales circunstancias, aunque a concentraciones más bajas (50 y 100 ppm) este fenómeno sólo se observa con las cepas B208, B219 y B221 (figura 1).

30 Teniendo en cuenta la sensibilidad media contra los antagonistas que presentan los cinco hongos problema mencionados más arriba, hubo, por supuesto, diferencias significativas, y estas diferencias eran significativas a cada concentración de cobre, e incluso sin cobre. *F. oxysporum* y *R. solani* resultaron ser las menos sensibles, al no incrementarse en estos casos la sensibilidad ni tan siquiera mediante la elevación de la concentración de cobre. *A. solani* era moderadamente sensible también, pero la concentración de cobre de 200 ppm dio lugar a un incremento
35 significativo de la sensibilidad. Las cepas de *P. ultimum* y *S. sclerotinia* analizadas eran más sensibles, sobre todo con una concentración de cobre alta.

40 La reacción de la bacteria fitopatógena de *P. syringae* analizada era significativamente diferente del hongo patógeno. No había ninguna diferencia significativa en la eficacia de las 20 bacterias antagonistas teniendo en cuenta la media de las 5 cepas de *P. syringae*. De igual forma, no había ninguna diferencia significativa entre la sensibilidad de las diferentes cepas de *P. syringae*. A diferencia de los experimentos con los hongos fitopatógenos, el contenido de cobre del medio de cultivo disminuyó definitivamente la eficacia de los antagonistas. La diferencia encontrada era significativa solo a la concentración de cobre de 100 y 200 ppm (la sensibilidad al cobre de las cepas fitopatógenas de *P. syringae* era aproximadamente la misma que la de las 20 bacterias antagonistas: todas se incrementaron a la concentración de 200 ppm y ninguna de ellas a 400 ppm).

45 Las cepas de *Phytophthora infestans* de la prueba eran más sensibles a los iones de cobre que los otros organismos, ya no mostraban ningún crecimiento a la concentración de 100 ppm, por lo que las pruebas se hicieron solo a la concentración de 50 ppm. Había una diferencia significativa entre la eficacia de las bacterias antagonistas, aunque la presencia del cobre no dio lugar a ningún cambio significativo (era similar a la de los otros hongos analizados, en donde no había ningún cambio claro en el carácter de la actividad antagonista a la concentración de cobre de 50 ppm).

50 En cuanto a la influencia de los iones de cobre sobre la eficacia de los antagonistas, se demostró que la mejora de la eficacia que se puede utilizar en las otras pruebas se experimentaba sólo en los casos de los hongos fitopatógenos y sólo a una concentración de iones de cobre relativamente alta (200 ppm).

Pruebas de campo e invernadero con las cepas bacterianas prometedoras

Se hicieron pruebas de tratamiento de campo e invernadero con las cepas resistentes al cobre que resultaron ser las mejores antagonistas. Las pruebas perseguían aclarar la tolerancia de la rizosfera de las cepas antagonistas en el cultivo de tomate y pimiento (métodos de cultivo que utilizan suelo o que no utilizan suelo) y en otros cultivos vegetales (col, lechuga) y, sobre todo, la cuestión muy importante de cómo tolera la planta el tratamiento con la bacteria. Al hacer uso del cultivo cuantitativo de los rizomas de las plantas tratadas, se aclaró si la cepa bacteriana se incorpora en la planta, si hace colonias de manera endógena sin afectar de manera adversa al desarrollo de la planta. Los análisis se hicieron con las 20 cepas que poseen un espectro excelente de antagonismo *in vitro*.

Las pruebas se hicieron en dos periodos, al hacer uso de 2×10 cepas bacterianas. Las cepas a analizar (miembros del género *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Pantoea*) se diluyeron a la concentración necesaria y las cajas de producción y la plataforma de siembra en lana mineral se regaron con esta solución inmediatamente después de la siembra. Los otros análisis se hicieron con plantas jóvenes que ya tenían hojas. Las muestras de plantas se recogieron en dos fechas, en las que se contaron las hojas de las plantas seleccionadas y las plantas se recogieron sin sus raíces y se les pesó su masa verde fresca. Las pruebas se hicieron con las especies de pimiento y tomate, en un sistema de producción en suelo y en lana mineral, y se consideró el riego con tres concentraciones diferentes de bacterias. En los casos de la col y la lechuga, los análisis se ajustaron solo con el método de producción en suelo. Todos los análisis se hicieron en cuatro conjuntos, en distribución aleatoria por bloques.

10 cepas de *Bacillus* resultaron ser las mejores.

Pruebas II de campo e invernadero. Análisis de la capacidad para inducir resistencia

En cuanto al componente bacteriano antagonista de acuerdo con nuestras composiciones planificadas, es un requisito importante que deba proporcionar protección contra los patógenos bacterianos y fúngicos, no solo en la rizosfera, sino también en los órganos de las plantas por encima del suelo a través de la activación de los mecanismos de resistencia inducible de la planta. Los análisis se hicieron con tomate y pimiento. Las raíces de las plantas jóvenes se trataron con la suspensión de las cepas bacterianas antagonistas y, después de la plantación, cuando habían pasado diferentes intervalos de tiempo, se provocaron infecciones artificiales en las hojas con una suspensión de células y conidios de las bacterias y de los hongos fitopatógenos. Además, se evaluó cómo la concentración de las sustancias químicas desempeña una función importante en los cambios de resistencia inducida en las plantas tratadas en comparación con las plantas de control (referencia).

Nuestra excelente cepa antagonista B5 de *Bacillus* tenía la capacidad de inducir el mecanismo de autoprotección de la planta [Resistencia Sistémica Adquirida (RSA)]. El mutante R3B resistente al cobre que aparecía espontáneamente después de transferir la cepa B5 de *Bacillus mojavensis* sobre un medio de cultivo que contenía sulfato de cobre a $400 \mu\text{g/ml}$ resultó ser el mejor. Esta cepa posee un espectro amplio y unas capacidades antagonistas excelentes probablemente porque secreta en gran cantidad un antibiótico depsi-péptido antifúngico, la fengicina (figura 4), y la proteasa constitutiva del tipo quimotripsina, que realza el efecto a través de la sinergia (figura 5).

Evaluación del antibiótico y de la producción de la quimotripsina que tienen la cepa B5 de *Bacillus mojavensis* y los mutantes resistentes al cobre obtenidos de la misma

Las cepas se mantuvieron mediante inoculación cruzada semanal en placas de cultivo de YEG (glucosa al 0,2%, extracto de levadura al 0,2%, bactoagar al 2%). Para las pruebas de producción de antibióticos, se utilizó principalmente la solución de cultivo mínima que idóneamente cambia la fuente de carbono y nitrógeno utilizada, además de la concentración de los dos elementos traza (hierro y cobre). Esta solución de cultivo, a diferencia de, p. ej., una solución de cultivo con extracto de levadura, no contiene aminoácidos ni péptidos, con lo que el análisis y la purificación de las mezclas de antibióticos secretados en el líquido de fermentación se puede realizar con más facilidad.

Sobre la base de los experimentos preliminares de producción, se utilizó la siguiente solución de cultivo GGM:

| | |
|--------------------------------------------|---------|
| Glucosa | 1% |
| Sal sódica del ácido glutamínico | 0,5% |
| KH_2PO_4 | 0,1% |
| K_2HPO_4 | 0,1% |
| $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ | 0,05% |
| KCl | 0,1% |
| $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ | 10 mg/l |
| $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ | 1 mg/l |

Se midieron 20 ml de la solución de cultivo en matraces Erlenmeyer de 50 ml. Después de la inoculación, tuvo lugar el cultivo en un dispositivo de agitación orbital durante 6 días, a 180 rpm y una temperatura de 25 °C.

Se determinó la densidad celular de los cultivos mediante la medición de la absorbancia a 620 nm. En el caso de las cepas de *Bacillus*, un valor de DO de 0,1 es equivalente con una concentración de 10⁷ células/ml. A partir de entonces, las células bacterianas se depositaron por centrifugación a 8 000g durante 10 minutos, y el sobrenadante se transfirió a un vaso de precipitados, y luego se ajustó el pH de los líquidos fermentados a 2 con el uso de ácido clorhídrico al 10% (0,4 ml por cada 20 ml de líquido fermentado). Los líquidos fermentados precipitados se incubaron a la temperatura de 5 °C durante una noche para completar la precipitación. A continuación, el precipitado se depositó por centrifugación y se disolvió en 1 ml de etanol al 96%.

Determinación cuantitativa de los antibióticos a partir de las preparaciones en etanol

La molécula de fengicina contiene 2 moléculas de tirosina que, no obstante, muestran una fuerte absorbancia a 280 nm. Así pues, el contenido de los antibióticos diferentes de la surfactina de las preparaciones de antibióticos se puede estimar con la medición a 280 nm. Así pues, se midieron a 280 nm las DO de las preparaciones en etanol diluidas 10 veces desde su concentración original.

Cromatografía en capa fina (TLC, por su nombre en inglés) de los antibióticos secretados

En los estudios preliminares, así como en los análisis de las nuevas cepas en el análisis cromatográfico en capa fina de las cepas, se utilizó una solución de cultivo de ácido glutamínico/glucosa, ya que en el caso de la mayoría de las cepas, esto produjo el rendimiento suficiente de antibióticos. En la figura 3 se muestran los resultados del análisis por TLC del líquido fermentado de la cepa B5.

En el transcurso de la aplicación del control de plagas, es extremadamente importante utilizar el medio de cultivo idóneo cuando se preparan los cultivos. Los resultados demuestran que se debe utilizar la solución de cultivo de ácido glutamínico/glucosa mencionada más arriba, ya que el cultivo se puede diluir incluso hasta 10 a 20 veces su volumen original, e incluso en este caso la concentración de fengicina por mililitro es de 10 a 12 mg/l, lo que consigue una inhibición completa de la mayoría de los hongos fitopatógenos y es suficiente para activar el mecanismo de resistencia que se induce en la planta tratada.

Capacidad antagonista de la cepa B5 de *B. mojavensis* y de los mutantes resistentes al cobre que se produjeron espontáneamente a partir de esta

Las cepas se cultivaron en un medio de cultivo con extracto de levadura durante 48 horas. Se analizó la inhibición de *Pseudomonas syringae*, *Clavibacter michiganensis* y *Xanthomonas campestris* debida a la cepa B5 y sus mutantes resistentes al cobre. Se puede observar en la tabla que el mejor efecto de inhibición lo posee el mutante R3B resistente al cobre.

| Zona de inhibición (mm) | | | | | | | |
|-----------------------------------------|-----|-----|-----|-----|------------|-----|-----|
| | B-5 | R1B | R2 | R3A | R3B | R4 | R6 |
| <i>Pseudomonas syringae</i> | 3,0 | 2,0 | 4,0 | 3,0 | 5,0 | 2,0 | 3,0 |
| <i>Clavibacter michiganensis</i> | 6,0 | 2,0 | 3,0 | 6,0 | 7,0 | 5,0 | 4,0 |
| <i>Xanthomonas campestris</i> | 7,0 | 5,0 | 6,0 | 7,0 | 7,0 | 7,0 | 8,0 |

Los efectos de inhibición debidos a las cepas B5 resistentes al cobre sobre *Fusarium oxysporum* se compararon con la cepa madre. La tabla muestra que, en este caso, también el mutante R3B resistente al cobre posee la mejor eficacia. Por lo tanto, buscamos protección para esta cepa.

| Zona de inhibición (mm) | | | | | | | |
|----------------------------------|-----|-----|-----|-----|------------|-----|-----|
| | B-5 | R1B | R2 | R3A | R3B | R4 | R6 |
| <i>Fusarium oxysporum</i> | 3,5 | 3,5 | 3,0 | 4,0 | 4,0 | 3,5 | 4,5 |

Aplicabilidad industrial de la invención

Es un beneficio de la presente invención que la cepa mutante R3B de *Bacillus mojavensis* aislada induzca un fuerte efecto antagonista contra los patógenos y que también lleve resistencia al cobre y que tenga la capacidad de activar una resistencia inducida en las plantas contra los patógenos. Debido a su rasgo de resistencia al cobre, se puede utilizar junto con plaguicidas que contienen cobre, con lo que se puede llevar a cabo un control integral de la plaga.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de la cepa mutante R3B resistente al cobre de *Bacillus mojavensis* depositada bajo el n.º NCAIM (P) B 001389 de acuerdo con el Tratado de Budapest para ejercer antagonismo contra los patógenos seleccionados del grupo de bacterias fitopatógenas *Xanthomonas vesicatoria*, *Pseudomonas syringae* y *Clavibacter michiganensis*, y de hongos fitopatógenos *Pythium debaryanum* y *Alternaria alternata*.
2. El uso según la reivindicación 1, en donde los patógenos son patógenos de verduras.
3. El uso según la reivindicación 2, en donde las verduras se seleccionan del grupo de tomate, pimiento, lechuga y col.
- 10 4. Uso de una composición como plaguicida, en donde dicha composición contiene un cultivo de la cepa mutante R3B resistente al cobre de *Bacillus mojavensis* depositada bajo el n.º NCAIM (P) B 001389 de acuerdo con el Tratado de Budapest y, optativamente, un plaguicida que contiene cobre y, optativamente, un excipiente.
5. El uso según la reivindicación 4, en donde el plaguicida que contiene cobre se selecciona del grupo de sulfato de cobre, oxiquinolato de cobre, óxido de cobre, hidróxido de cobre y oxiclورو de cobre.
- 15 6. El uso según la reivindicación 4 o 5, en donde la composición es en una suspensión acuosa, concentrado en suspensión, concentrado encapsulado, pulverizador líquido formador de emulsión, gránulo, gránulo disgregable en agua, microgránulo o formulación farmacéutica de polvo hidrosoluble.
- 20 7. Un procedimiento para controlar patógenos seleccionados del grupo de bacterias fitopatógenas *Xanthomonas vesicatoria*, *Pseudomonas syringae* y *Clavibacter michiganensis*, y de hongos fitopatógenos *Pythium debaryanum* y *Alternaria alternata*, caracterizado por que la cepa mutante R3B resistente al cobre de *Bacillus mojavensis* depositada bajo el n.º NCAIM (P) B 001389 de acuerdo con el Tratado de Budapest o la composición de la misma se le aplica a una planta.
8. El procedimiento según la reivindicación 7, en donde la planta es una verdura.
9. El procedimiento según la reivindicación 8, en donde la verdura se selecciona del grupo de tomate, pimiento, lechuga y col.
- 25 10. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, caracterizado por que la cepa mutante R3B resistente al cobre de *Bacillus mojavensis* depositada bajo el n.º NCAIM (P) B 001389 de acuerdo con el Tratado de Budapest o la composición de la misma se aplica a
- a) las semillas de la planta,
- b) las raíces de la planta,
- 30 c) los tallos de la planta,
- d) las hojas, flores, ramaje o frutos de la planta,
- se mezcla con
- e) el agua de riego de la planta y/o
- se pulveriza
- 35 f) sobre la planta.

Figura 1

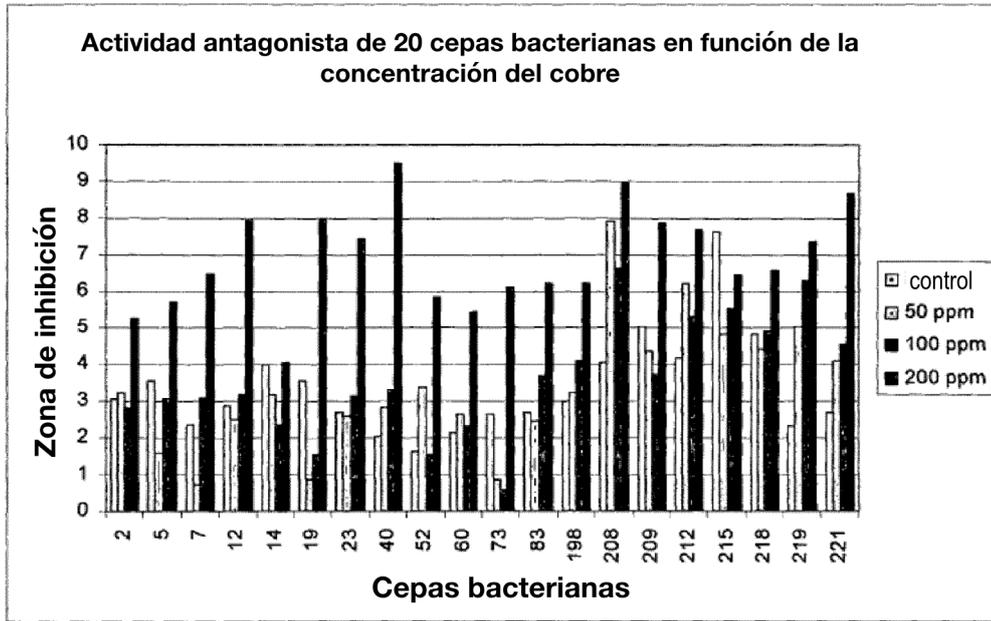


Figura 2

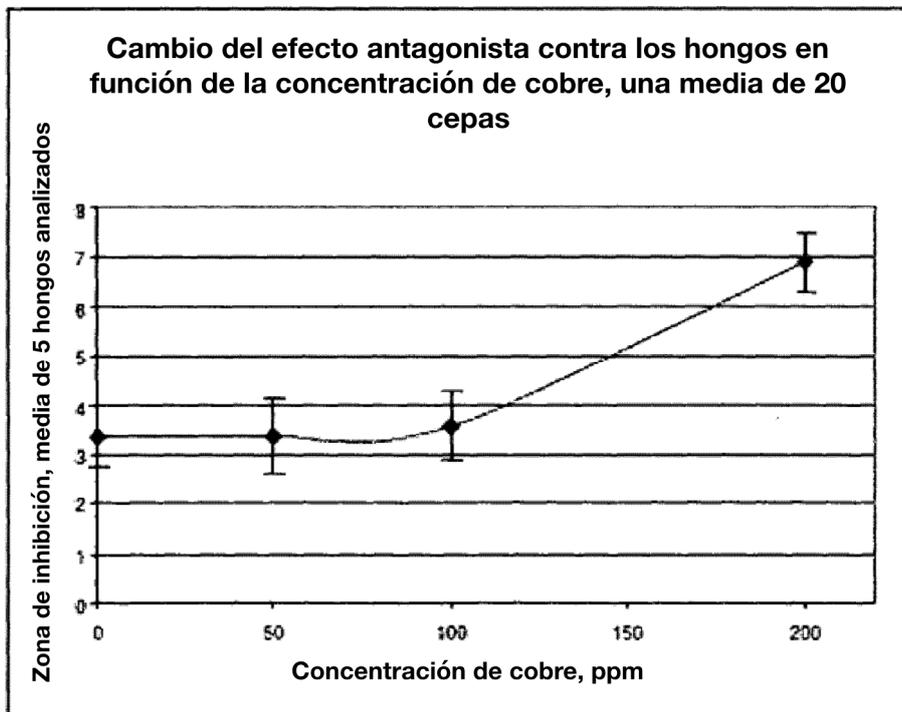


Figura 3

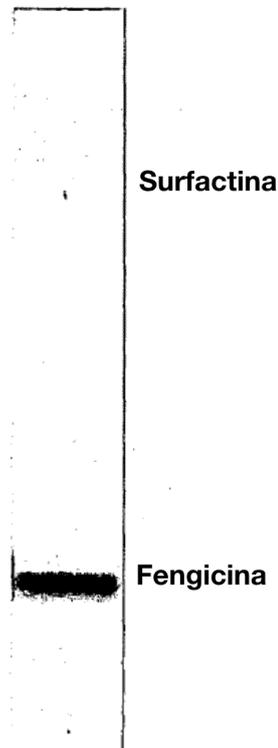


Figura 4

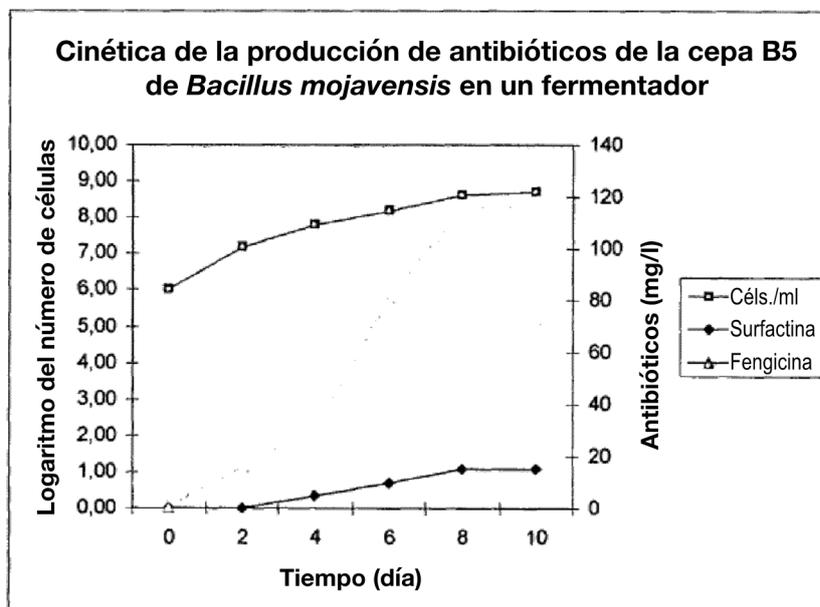
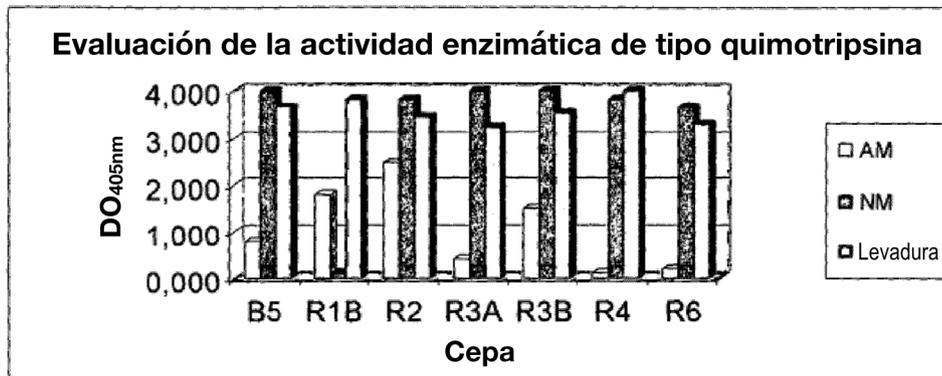


Figura 5



AM = la fuente de nitrógeno es cloruro de amonio, NM = la fuente de nitrógeno es nitrato de sodio; Levadura = la fuente de nitrógeno es extracto de levadura; la evaluación se realizó con el sustrato cromógeno Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA.

Figura 6

