

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 735 732**

51 Int. Cl.:

A01N 63/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.09.2015 PCT/EP2015/071642**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.03.2016 WO16046155**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.09.2015 E 15780774 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.05.2019 EP 3197280**

54 Título: **Nuevas cepas bacterianas de la especie Bacillus amyloliquefaciens y aplicaciones relacionadas**

30 Prioridad:

24.09.2014 IT MI20141661

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

20.12.2019

73 Titular/es:

**BIOTECNOLOGIE B.T. S.R.L. (100.0%)
Frazione Pantalla, Stradario 82969
06059 Todi (PG), IT**

72 Inventor/es:

**CORANELLI, SIMONA;
MORANDI, STEFANIA y
FRESCHI, GIORGIO**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 735 732 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

Nuevas cepas bacterianas de la especie *Bacillus amyloliquefaciens* y aplicaciones relacionadas

5 **Campo de la invención**

La presente invención está en el campo del sector agronómico y en particular en la fabricación de productos que tienen actividad antifúngica y antibacteriana tal como, por ejemplo, biopesticidas y biocidas. En particular, la invención se refiere a una cepa bacteriana de la especie *Bacillus amyloliquefaciens*, activa en el tratamiento preventivo y/o terapéutico de enfermedades vegetales debido a patógenos tales como hongos o bacterias. La invención también se refiere a formulaciones que comprenden la cepa bacteriana anteriormente mencionada, así como a su uso en la prevención y/o terapia de las enfermedades anteriormente mencionadas.

15 **Estado de la técnica**

La lucha contra microorganismos infestantes y el control de su difusión es un tema actual y en evolución continua en el campo de la agricultura. Hay varias especies relacionadas con enfermedades vegetales (fitopatógenos). Entre las especies bacterianas es posible mencionar: *Erwinia amylovora*, varias especies del género *Xanthomonas* así como del género *Pseudomonas*, la especie *Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum* y la especie *Ralstonia solanacearum*; entre las especies fúngicas es posible mencionar: *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea*, *Monilia laxa*, *Phytophthora infestans*, así como el género *Sclerotinia*.

En particular, *Sclerotinia minor* es un fitopatógeno fúngico ascomiceto que produce la típica “podredumbre del cuello” en lechuga; este microorganismo es capaz de atacar algunos otros cultivos también, tal como tomate, apio, zanahoria, coliflor, repollo, flores del género *Delphinium*, soja, girasol, cacahuete. La enfermedad se caracteriza por un hongo blanco y algodonoso que se desarrolla en la superficie del hospedador y la tierra cercana. De esta espesa red de micelios, los cuerpos de los hongos se desarrollan pronto, que después se vuelven negros y duros: estas estructuras, cuando maduran, se nombran esclerocios y son capaces de sobrevivir varios años en la tierra. *Sclerotinia minor* con poca frecuencia produce esporas; de hecho, con frecuencia empieza a colonizar a su hospedador atacando las raíces o el tallo a nivel del suelo. Una vez esta especie de hongo particular ataca al organismo hospedador, produce daños que gradualmente implican al tejido vascular, produciendo que la planta se marchite, colapse y muera.

Entre los fitopatógenos bacterianos *Ralstonia solanacearum* es especialmente digna de mención. Esta bacteria gram negativa ataca plantas de la familia de las solanáceas, típicamente tomate, patata, berenjena, tabaco, así como otras plantas como olivo, jengibre, etc. Los síntomas de infección en tomates incluyen hojas flácidas y raíces adventicias que aparecen en el tallo; el sistema vascular muestra un color marrón progresivamente más oscuro y pueden aparecer lesiones en el tallo; las patatas infectadas muestran hojas marchitas y amarillentas, así como atrofia global de la planta y tubérculos podridos. Debido a su letalidad devastadora, *R. solanacearum* es actualmente la bacteria fitopatógena más intensamente estudiada. En el curso del tiempo, ha crecido la necesidad para el desarrollo de productos antifúngicos y antibacterianos que garanticen el menor impacto medioambiental posible y que muestren una eficacia alta y constante. De hecho, el uso prolongado de pesticidas sintéticos se asocia crecientemente a una eficacia disminuida de los mismos y a fenómenos de contaminación incluso graves para seres humanos y ecosistemas. Por consiguiente, es de suma importancia usar productos basados en microorganismos para apoyar o sustituir los productos químicos tradicionales.

Una alternativa a los pesticidas sintéticos está representada por las denominadas técnicas “biológicas”, es decir, las que explotan la actividad antagonista de otra especie animal, fúngica o bacteriana contra la especie infestante que produce enfermedades vegetales.

Bacillus amyloliquefaciens es una bacteria conocida del género *Bacillus*; es ubicua y vive en la rizosfera y en la superficie de la planta. Es una bacteria gram positiva, aerobia; se extrajo y aisló de tierra en 1943 por Fukamoto, en Japón. No se han descrito nunca episodios de fitotoxicidad o toxicidad hacia seres humanos. Se usa para sintetizar enzimas y en la industria alimentaria y biotecnológica. Su actividad antifúngica y antibacteriana es conocida, en efecto, hay disponible en el mercado al menos un producto para la protección de cultivo activo para tratar enfermedades fúngicas y/o bacterianas, que incluye ese microorganismo. Varias cepas de esa especie bacteriana se usan para proteger plantas frente a hongos o bacterias patógenos o incluso para fomentar el crecimiento de la planta.

El mecanismo de acción de *Bacillus amyloliquefaciens* es complejo. La capacidad del bacilo de colonizar la planta es un proceso multifactorial que depende tanto del sistema de defensa de la planta como la capacidad del huésped en asentarse sobre la superficie de la planta misma, ocupando sus tejidos externos y creciendo junto con el organismo hospedador previniendo la inserción de otros patógenos por medio de fenómenos de competición. La bacteria es, por tanto, capaz de sintetizar enzimas útiles para protegerse contra especies patógenas y después hacerlas disponibles para la planta, a cambio de un medio seguro y rico en nutrientes. Por ejemplo, como se sabe, *Bacillus amyloliquefaciens* puede liberar lipopéptidos y proteasas que debilitan la membrana fúngica y la pared celular, respectivamente.

La solicitud europea de patente no. EP 2179652 describe la selección de algunas cepas particulares de *Bacillus amyloliquefaciens* que son inocuas para seres humanas y el medio ambiente, pero eficaces frente a enfermedades bacterianas vegetales, en particular la denominada “fuego bacteriano”, una enfermedad que afecta a las frutas como, que incluye varias plantas frutales tal como peral, manzano y plantas de la subfamilia *Maloideae*. Esa enfermedad está causada por la agresión de *Erwinia amylovora*, una bacteria gram negativa particular de la familia *Enterobacteriaceae*. La característica técnica peculiar del producto de protección de cultivos descrito es que incluye no solo *Bacillus amyloliquefaciens* sino también soluciones de cultivo del mismo que contienen metabolitos secundarios con un fuerte efecto antibacteriano. La formulación en cuestión también incluye esporas del *Bacillus* anteriormente mencionado que garantizan una actividad apropiada del producto incluso después de tiempos de almacenamiento extendidos. Una característica adicional de este microorganismo es su insensibilidad a antifúngicos químicos, mientras que no se subraya la posibilidad de usar ese *Bacillus* contra enfermedades vegetales causadas por hongos.

La solicitud de patente internacional WO 2008/111719, en su lugar, describe nuevas cepas de *Bacillus amyloliquefaciens* activas en inhibir microorganismos patógenos o enteropatógenos que son resistentes a antibióticos. Ese documento se dirige a proteger tanto el sobrenadante de cultivos de *Bacillus* como los metabolitos antibacterianos presentes en el mismo. Las composiciones inhibitoras que inhiben el crecimiento de microorganismos resistentes a antibióticos pueden ser o bien alimento o aditivos alimentarios.

Un producto de protección de cultivos de referencia importante, disponible en el mercado y muy usado en el sector, es Amylo-X (Biogard), una formulación microbiológica antifúngica y antibacteriana basada en *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* (cepa D747), que tiene un amplio espectro de actividad contra varios hongos y bacterias.

Sin embargo, la disponibilidad general de productos que tienen un “amplio espectro” no satisface las necesidades de los operadores en el sector: en efecto, hay un gran interés en productos que tienen fuerte actividad contra especies específicas, además de un amplio espectro general de actividad, de modo que proporcionen un tratamiento específico contra las infecciones correspondientes, mientras se mantiene una actividad media/fuerte contra microorganismos patógenos en general al mismo tiempo: por ejemplo, considerando el frecuente crecimiento de lechuga al lado de plantas de la familia Solanácea (tomates, patatas, berenjenas) en huertos, sería interesante tener disponible un producto con fuerte actividad sobre patógenos típicos de lechuga (*Sclerotinia minor*) y de Solanáceas (*Ralstonia solanacearum*), mientras que al mismo tiempo se mantiene un nivel adecuado de actividad sobre una amplia gama de otros patógenos vegetales. Además, con un ojo en el creciente cuidado para el medio ambiente y los ecosistemas implicados, hay una necesidad para productos muy activos, útiles para reducir la cantidad de agente que se administra.

Compendio

Al abordar las necesidades subrayadas anteriormente, el solicitante ahora aisló nuevas cepas bacterianas que pertenecen a la especie *Bacillus amyloliquefaciens*, eficaces contra un amplio espectro de enfermedades vegetales causadas por hongos y/o bacterias y provistas con unas características de selectividad específicas, útiles para integrar y mejorar la gama de productos actualmente disponibles en el sector.

Específicamente, la presente invención se refiere a una nueva cepa bacteriana de la especie *Bacillus amyloliquefaciens* que tiene el número de depósito DSMZ 29231 e identificada en el presente documento como BOT SPO. Esta cepa es eficaz para tratamientos en el campo agronómico, en particular en la prevención y/o tratamiento de enfermedades vegetales causadas por hongos y/o bacterias. Las especies fúngicas preferiblemente tratadas son: *Fusarium oxysporum lycopersici*, *Botrytis cinerea*, *Monilia laxa*, *Phytophthora infestans* y *Sclerotinia minor*; las especies bacterianas preferiblemente tratadas son: *Erwinia amylovora*, *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Ralstonia solanacearum*. Los patógenos más preferiblemente tratados son la especie de ascomiceto fúngico *Sclerotinia minor* y la especie bacteriana *Ralstonia solanacearum*. La invención se refiere a la dicha cepa bacteriana como tal; también se refiere a sus formulaciones antibacterianas y/o antifúngicas en presencia de posibles coformulantes y adyuvantes, y su uso en el tratamiento y/o prevención de enfermedades vegetales causadas por bacterias y/u hongos.

Descripción detallada de la invención

Un primer objeto de la presente solicitud de patente se refiere a la nueva cepa bacteriana mencionada anteriormente de la especie *Bacillus amyloliquefaciens* que tiene el número de depósito DSMZ 29231 e identificada en el presente documento como BOT SPO: la pertenencia de esta cepa a la especie *Bacillus amyloliquefaciens* ha sido demostrada por el solicitante por medio de análisis genéticos. Como se demuestra por experimentos de laboratorio mostrados a continuación, se encontró que esta cepa era eficaz para impedir y/o inhibir el crecimiento de cultivos bacterianos y fúngicos.

Un segundo objeto de la presente solicitud de patente se refiere a composiciones que incluyen la cepa bacteriana BOT SPO, como se ha descrito previamente. Por tanto, esta cepa bacteriana es el principio activo de composiciones que

además incluyen coformulantes, adyuvantes y cualquier otro excipiente útil. Las composiciones pueden ser líquidas, sólidas (por ejemplo, granular) o de cualquier otra naturaleza.

5 El coformulante puede ser, por ejemplo, un solvente o un relleno sólido. Cuando la composición es líquida, el solvente puede ser, por ejemplo, de un tipo acuoso, un derivado de aceite mineral, etc. Cuando la composición es sólida, el coformulante puede ser, por ejemplo, una arcilla, un silicato, un carbonato, un polvo orgánico de biomasa vegetal, etc. Entre las arcillas, por ejemplo, se pueden usar talco, tierra de diatomeas, caolín, atapulgita, etc.; entre los polvos orgánicos, están, por ejemplo, arroz molido o corteza de coco, etc.

10 Los adyuvantes pueden ser, por ejemplo, tensioactivos, aditivos reológicos, agentes humectantes, agentes de hidratación, adhesivos, aditivos antiespuma, soluciones tampón, activadores, agentes de dispersión, agentes de recubrimiento, agentes colorantes, estabilizantes de UV, antioxidantes, etc.

15 Las composiciones objeto de la presente solicitud de patente también pueden incluir sustancias químicas adicionales tal como almidones, azúcares o soluciones acuosas de los mismos.

20 Las composiciones sólidas que incluyen la cepa BOT SPO también pueden ser de tipo granular; los gránulos pueden ser dispersables y/o suspendibles en soluciones acuosas tal como agua del grifo o se pueden usar en esa forma extendiéndolos directamente sobre la tierra. El proceso de granulación puede ser por disco giratorio, extrusión, lecho fluido o secado por rociado.

25 Las composiciones que incluyen la cepa BOT SPO pueden incluir los microorganismos anteriormente mencionados como tal, o sus derivados, en particular esporas o metabolitos (por ejemplo, proteínas y enzimas derivadas de la fermentación del microorganismo en cuestión) obtenidos de dichas cepas o mezclas. Por tanto, para la presente solicitud, el término BOT SPO se refiere igualmente al microorganismo en cuestión como tal o a sus derivados, en particular esporas o metabolitos.

30 Las composiciones que incluyen la cepa BOT SPO pueden incluir también uno o más principios activos adicionales con actividad y fin que son los mismos o diferentes que el de las cepas bacterianas que son el objeto de la presente solicitud de patente; por ejemplo, pueden incluir otras especies de microorganismos y/o pesticidas contra microorganismos o especies animales que infestan especies vegetales. También a modo de ejemplo, la formulación que incluye dichas cepas bacterianas puede incluir una o más moléculas fertilizantes.

35 Un tercer objeto de la presente invención es el uso de dicha cepa bacteriana, así como las composiciones que incluyen la misma, para aplicaciones en el campo agronómico. Específicamente, la cepa BOT SPO es eficaz contra enfermedades vegetales asociadas a contaminaciones fúngicas o bacterianas.

40 Por tanto, la invención se puede usar en el tratamiento preventivo y/o terapéutico de contaminaciones bacterianas y/o fúngicas de plantas, plantas ornamentales, plantas frutales, frutas, hortalizas, cereales, raíces, rizomas, tubérculos, bulbos, semillas y todas las plantas pretendidas para la cadena de suministro de alimentos.

45 Preferiblemente, la cepa BOT SPO de dicho *Bacillus amyloliquefaciens* se usa en el tratamiento contra los géneros fúngicos *Fusarium spp*, *Botrytis spp*, *Monilia spp*, *Phytophthora spp*, *Sclerotinia spp* y contra los géneros bacterianos *Erwinia spp*, *Xanthomonas spp*, *Pseudomonas spp*, *Pectobacterium spp*, *Ralstonia spp*.

Más preferiblemente, se usa contra las especies fúngicas *Fusarium oxysporum lycopersici*, *Botrytis cinerea*, *Monilia laxa*, *Phytophthora infestans*, *Sclerotinia minor*.

50 Lo más preferiblemente, se usa contra la especie fúngica de ascomiceto *Sclerotinia minor*. Respecto a los patógenos bacterianos, la cepa BOT SPO de dicho *Bacillus amyloliquefaciens* se usa preferiblemente en el tratamiento contra los géneros *Erwinia spp*, *Xanthomonas spp*, *Pseudomonas spp*, *Pectobacterium spp*, *Ralstonia spp*.

55 Más preferiblemente, se usa contra las especies bacterianas: *Erwinia amylovora*, *Xanthomonas campestris pv. vesicatoria*, *Pseudomonas syringae pv. actinidiae*, *Pseudomonas syringae pv. syringae*, *Pseudomonas syringae pv. tomato*, *Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum*, *Ralstonia solanacearum*.

Lo más preferiblemente, se usa contra la bacteria gram negativa *Ralstonia solanacearum*.

60 Varias especies vegetales son vulnerables a enfermedades causadas por los patógenos anteriormente mencionados que es un objeto de tratamiento según la presente invención. Entre ellas, por ejemplo, se citan lechuga y similares, zanahoria, apio, berenjena, pimiento, tomate, fresa, kiwi, manzano, peral, vid, soja, girasol, cacahuete, etc.

65 Como se describe en los ensayos *in vitro* descritos en la parte experimental, la cepa BOT SPO es eficaz en luchar contra e inhibir el crecimiento de todas las especies patógenas enumeradas anteriormente tanto bacterianas como fúngicas.

En particular, se encontró fuertemente eficaz en prevenir el crecimiento de colonias del hongo ascomiceto *Sclerotinia minor*, una especie muy extendida y muy resistente que infecta lechuga y unas pocas otras hortalizas seleccionadas.

Además, la cepa BOT SPO se ha sido particularmente eficaz en prevenir el crecimiento del hongo *Phytophthora infestans*.

Con respecto a aplicaciones antibacterianas, la cepa que es objeto de la invención mostró una actividad en general alta contra todas las especies bacterianas ensayadas, la mayoría de las veces también superando la actividad del producto de referencia comercial.

En ensayos en invernaderos más avanzados, la cepa BOT SPO mostró un efecto fuerte en reducir la incidencia y gravedad de infección de *Sclerotinia minor*, en ensayos en invernaderos adicionales en tomates, también se demostraron fuertemente eficaces en reducir la incidencia y gravedad de la infección de *Ralstonia solanacearum*.

Los resultados anteriores, en particular los obtenidos en invernadero, apoyan el tratamiento, a través de un único producto, de infecciones específicas que afectan a lechuga y plantas solanáceas como tomates, patatas, berenjenas; esto es de interés particular considerando que tales hortalizas habitualmente crecen unas al lado de otras en huertos; por tanto, con la presente invención el área de tierra que contiene estas plantas ventajosamente recibe un producto dirigido a infecciones, esparcible a través de una única etapa de aspersión; el uso es particularmente eficaz en reducir la incidencia y gravedad de estas infecciones. Este tratamiento biopesticida se puede llevar a cabo por aplicación foliar o por riego por goteo, en particular la última es preferible debido al bajo impacto medioambiental, también en mezcla con otros pesticidas químicos.

Por tanto, en una forma de realización preferida, la presente invención incluye el uso de la presente cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* BOT SPO para tratar o prevenir (típicamente a través de aplicación foliar o por riego por goteo) infecciones vegetales de microorganismos seleccionados de *Sclerotinia minor* y/o *Ralstonia solanacearum*; preferiblemente dichas infecciones afectan a plantas seleccionadas como lechuga y tomates.

En resumen, la cepa BOT SPO de la especie *Bacillus amyloliquefaciens* que tiene el número de depósito DSMZ 29231, es muy eficaz en tratar enfermedades bacterianas y/o fúngicas causadas por una amplia gama de patógenos que se asocian con enfermedades que son responsables de la muerte o crecimiento anómalo de importantes especies vegetales. Además, también muestra características de selectividad, que la hacen particularmente útil contra algunas infecciones que no son fáciles de tratar.

La invención se describe a continuación por medio de los siguientes ejemplos experimentales no limitantes.

Parte experimental

1. Diseño de los experimentos

Se han llevado a cabo experimentos para evaluar el efecto de BOT SPO contra las especies fúngicas: *Fusarium oxysporum lycopersici* (Foi), *Botrytis cinerea* (Bc), *Monilia laxa* (Ml), *Phytophthora infestans* (Pi), *Sclerotinia minor* (Sm), y las especies bacterianas *Erwinia amylovora* (Ea), *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Xv), *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (Psa), *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (Pss), *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Pst), *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (Pcc), *Ralstonia solanacearum*.

Se llevaron a cabo ensayos en paralelo con un ensayo de referencia usando Amylo-X, es decir, un producto de protección de cultivos comercial estándar que contiene *Bacillus amyloliquefaciens* como agente activo, caracterizado por una amplia gama de actividad en el campo contra especies bacterianas y fúngicas, está entre los productos más usados en esta área. En todos los ensayos, se ha usado el microorganismo patógeno no tratado como un control. Todos los ensayos, incluyendo los de referencia, se han llevado a cabo en el mismo entorno de cultivo, temperatura, tiempo y condiciones de humedad. Los ensayos se han llevado a cabo dos veces (para la actividad antifúngica) o tres veces (para la actividad antibacteriana); los resultados que se muestran son la media de los valores experimentales que se encontraron.

Los ensayos se han llevado a cabo como sigue: en placas Petri dedicadas, por medio de un procedimiento estándar, las cepas antagonistas se han inoculado en un medio de cultivo apropiado y con una cantidad estándar del microorganismo fitopatógeno sujeto a investigación: el microorganismo se ha inoculado 48 horas después del antagonista. Después de un periodo de incubación predeterminado, la actividad antifúngica de las dos cepas antagonistas se ha evaluado midiendo los diámetros de las colonias asociadas con el crecimiento del patógeno. La actividad antifúngica se ha evaluado midiendo el diámetro de la areola de inhibición relacionada.

2. Resultados

2.1 Evaluación de la actividad antifúngica de la cepa BOT SPO de *Bacillus amyloliquefaciens* por medio de ensayos *in vitro*

La tabla 1 describe los resultados obtenidos de medidas de los diámetros de las colonias fúngicas después del tratamiento descrito anteriormente. Se ha evaluado el *porcentaje de inhibición de la actividad fúngica* (ICF) con respecto al ensayo control por medio de la fórmula: $ICF = 100 - [(diámetro\ de\ la\ colonia\ tratada / diámetro\ de\ la\ colonia\ sin\ tratar) \times 100]$; un valor de ICF igual a 100 significa que no se ha observado crecimiento fúngico, por tanto, la actividad antifúngica del biopesticida es igual al 100%; por el contrario, un valor ICF igual a 0 significa que la actividad antifúngica del producto es irrelevante.

	Foi	Bc	MI	Pi	Sm
Amylo-X	90	100	100	69,1	77,2
Bot SPO	87,8	100	100	100	78,3

Tabla 1: tratamiento de enfermedades causadas por especies fúngicas. Foi, *Fusarium oxysporum lycopersici*; BC, *Botrytis cinerea*; MI, *Monilia laxa*; Pi, *Phytophthora infestans*; Sm, *Sclerotinia minor*. Valores mostrados como ICF.

La tabla 1 muestra que la cepa bacteriana BOT SPO es eficaz en inhibir el crecimiento de los cultivos fúngicos de las especies anteriormente mencionadas. En particular, la cepa bacteriana es particularmente eficaz en prevenir el crecimiento de colonias de *Sclerotinia minor*, mostrando también una mayor eficacia que el producto de protección de cultivos de referencia, Amylo-X. Además, BOT SPO mostró una alta actividad contra *Phytophthora infestans*, superando ampliamente la actividad del producto de protección de cultivos de referencia.

2.2 Evaluación de la actividad antibacteriana de cepas BOT SPO de *Bacillus amyloliquefaciens* por medio de ensayos in vitro

La tabla 2 describe los resultados del tratamiento obtenidos por las medidas de los diámetros de areolas inhibitoras del crecimiento bacteriano de las especies fitopatógenas después del tratamiento mencionado anteriormente. La existencia de una areola inhibitora en el área del inóculo del antagonista muestra la capacidad de la misma para inhibir el crecimiento del patógeno. Los valores se expresan en centímetros: valores mayores del diámetro de la areola inhibitora muestran que no se ha observado crecimiento de bacterias patógenas, por tanto, el producto tiene una alta actividad antimicrobiana; por consiguiente, cuanto mayor sea ese valor, más eficaz es el producto sometido a investigación en impedir el crecimiento de la bacteria fitopatógena en cuestión.

	Psa	Pst	Pss	Xv	Ea	Pcc	Ralst
Amylo-X	4,6	3,1	3,8	6,1	7,2	5,6	5,3
Bot SPO	6	4,4	4,5	7,4	7,2	6,4	8,5

Tabla 2: Tratamiento de enfermedades bacterianas, Psa, *Pseudomonas aeruginosa*; Pst, *Pseudomonas syringae pv. tomato*; Pss, *Pseudomonas syringae pv. syringae*; Xv, *Xanthomonas vesicatoria*; Ea, *Erwinia amylovora*; Pcc, *Pectobacterium carotovorum subs. Carotovorum*; Ralst, *Ralstonia*.

La tabla 2 muestra que la cepa bacteriana BOT SPO es eficaz en tratar los cultivos bacterianos de las especies mencionadas anteriormente. En particular, la cepa bacteriana BOT SPO es mucho más eficaz que Amylo-X contra los cultivos bacterianos fitopatógenos que se ensayan.

3. Ensayos en invernadero en lechuga infectada con *Sclerotinia minor*

El objetivo del estudio era probar el efecto de las cepas de la presente invención sobre la infección de *Sclerotinia minor* en cultivos de lechuga en invernadero, en condiciones climáticas controladas.

El ensayo se llevó a cabo con la presente cepa BOT SPO; en paralelo, el producto del mercado de referencia Amylo-X que contiene como ingrediente activo *Bacillus amyloliquefaciens*, se ensayó en las mismas condiciones. El diseño experimental se describe en la tabla 3.

Producto de prueba	Concentración del producto de prueba	Replicados	Concentración del patógeno
BOT SPO	2*10 ¹⁴ UFC/ml	3 repl. de 3 plantas	10 ⁶ UFC/ml
BOT SPO	2*10 ¹⁰ UFC/ml	3 repl. de 3 plantas	10 ⁶ UFC/ml
AMYLO-X*	1*10 ¹⁴ UFC/ml	3 repl. de 3 plantas	10 ⁶ UFC/ml

Tabla 3: Tratamiento en invernadero de lechuga infectada con *Sclerotinia minor*: diseño experimental

* La concentración del producto comercial es la descrita en la ficha técnica.

Preparación de producto de prueba

Los productos de prueba se hicieron crecer en TSA agar a 30°C durante 78 horas. A continuación, las cremas se recogieron en tubos en la mitad de peso de una solución de glicerol al 15% p/p y se almacenaron a -20°C. El número de células se evaluó por determinación de la UFC. Las soluciones de los productos de prueba se prepararon en el campo con agua del grifo a las dos concentraciones indicadas en la tabla 3.

Aplicación preventiva de los productos de prueba y producto de referencia

5 24 horas antes de la aplicación del patógeno, los productos de prueba y el producto de referencia se aplicaron rociando la suspensión en las hojas. Los productos de prueba y el producto de referencia se aplicaron al atardecer; la humedad relativa en el invernadero se mantuvo al 95%.

Preparación del patógeno

10 *Sclerotinia minor* se hizo crecer en PDA agar a 25°C durante 1 semana y las células conidiales se recogieron en tubos. El número de células se evaluó por recuento directo al microscopio. La solución de patógeno se preparó en el campo con agua del grifo a las concentraciones indicadas en la tabla 3.

Aplicación del patógeno

15 El patógeno se aplicó 24 horas después de la aplicación de los productos de prueba y el producto de referencia, rociando la suspensión en las hojas. La aplicación se hizo al atardecer; la humedad relativa en el invernadero se mantuvo al 95% durante las siguientes 24 horas y después de ello se bajó al 65%.

20 Las plantas inoculadas se mantuvieron en el invernadero a 20 ± 3°C, con un fotoperiodo de 16 horas de luz / 8 horas de oscuridad.

25 Los efectos se evaluaron después de 4 semanas desde la aplicación del patógeno. Se calcularon como el porcentaje de incidencia de la infección en toda el área tratada (número de plantas enfermas/plantas tratadas totales) y la gravedad de la enfermedad (% de manifestación de la enfermedad).

Se realizó análisis estadístico mediante el programa ANOVA/MANOVA. Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla 4.

Producto de prueba	Concentración del producto de prueba	Incidencia %	Gravedad %
BOT SPO	2*10 ¹⁴ UFC/ml	28,57	15,92
BOT SPO	2*10 ¹⁰ UFC/ml	50,00	61,90
AMYLO-X	1*10 ¹⁴ UFC/ml	100,00	61,90
Control de enfermedad		92,31	100,00

30 **Tabla 4:** Tratamiento en invernadero de lechuga infectada con *Sclerotinia minor*: resultados

Estos resultados muestran que la cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* BOT SPO obtiene un biocontrol notable contra *Sclerotinia minor*, con efectos que superan mucho los producidos por la referencia del mercado Amylo-X.

35 4. Ensayos en invernadero en tomates infectados con *Ralstonia solanacearum*

El objetivo del estudio era probar el efecto de las cepas de la presente invención en la infección bacteriana de *Ralstonia solanacearum* en cultivos de plantas de tomate en invernadero, en condiciones climáticas controladas.

40 El ensayo se llevó a cabo con la presente cepa BOT SPO; en paralelo, el producto del mercado de referencia Amylo-X que contiene como ingrediente activo *Bacillus amyloliquefaciens*, se ensayó en las mismas condiciones. El diseño experimental se describe en la tabla 5.

Producto de prueba	Concentración del producto de prueba	Replicados	Concentración del patógeno
BOT SPO	2*10 ¹⁴ UFC/ml	3 repl. de 3 plantas	10 ⁶ UFC/ml
BOT SPO	2*10 ¹⁰ UFC/ml	3 repl. de 3 plantas	10 ⁶ UFC/ml
AMYLO-X	1*10 ¹⁴ UFC/ml	3 repl. de 3 plantas	10 ⁶ UFC/ml
Control de la enfermedad		3 repl. de 3 plantas	10 ⁶ UFC/ml

45 **Tabla 5:** Tratamiento en invernadero de tomate infectado con *Ralstonia solanacearum*: diseño experimental

Preparación de producto de prueba

50 Los productos de prueba se hicieron crecer en TSA agar a 30°C durante 78 horas. A continuación, las cremas se recogieron en tubos en la mitad de peso de una solución de glicerol al 15% p/p y se almacenaron a -20°C. El número de células se evaluó por determinación de la UFC. Las soluciones de los productos de prueba se prepararon en el campo con agua del grifo a las dos concentraciones indicadas en la tabla 5.

Aplicación preventiva de los productos de prueba y producto de referencia

5 24 horas antes de la aplicación del patógeno, los productos de prueba y el producto de referencia se aplicaron rociando la suspensión en las hojas. Los productos de prueba y el producto de referencia se aplicaron al atardecer; la humedad relativa en el invernadero se mantuvo al 95%.

Preparación del patógeno

10 *Ralstonia solanacearum* se hizo crecer en TSA agar a 25°C durante 24 horas y las células se recogieron en tubos. El número de células se evaluó por recuento directo al microscopio. La solución de patógeno se preparó en el campo con agua del grifo a las concentraciones indicadas en la tabla 5.

Aplicación del patógeno

15 El patógeno se aplicó 24 horas después de la aplicación de los productos de prueba y el producto de referencia, rociando la suspensión en las hojas. La aplicación se hizo al atardecer; la humedad relativa en el invernadero se mantuvo al 95% durante las siguientes 24 horas y después de ello se bajó al 65%.

20 Las plantas inoculadas se mantuvieron en el invernadero a 20 ± 3°C, con un fotoperiodo de 16 horas de luz / 8 horas de oscuridad.

25 Los efectos se evaluaron después de 2 semanas desde la aplicación del patógeno. Se calcularon como el porcentaje de incidencia de la infección en toda el área tratada (número de plantas enfermas/plantas tratadas totales) y la gravedad de la enfermedad (% de manifestación de la enfermedad).

Se realizó análisis estadístico mediante el programa ANOVA/MANOVA. Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla 6.

Producto de prueba	Concentración del producto de prueba	Incidencia %	Gravedad %
BOT SPO	2*10 ¹⁴ UFC/ml	44,83	30,98
BOT SPO	2*10 ¹⁰ UFC/ml	51,64	40,79
AMYLO-X	1*10 ¹⁴ UFC/ml	95,82	138,75
Control de enfermedad		100,00	100

30 **Tabla 6:** Tratamiento en invernadero de tomate infectado con *Ralstonia solanacearum*: resultados

Estos resultados muestran que la cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* BOT SPO obtiene un biocontrol notable contra *Ralstonia solanacearum*, con efectos que superan mucho los producidos por el producto de referencia del mercado.

Copia impresa (Original en forma electrónica)
(Esta hoja es no es parte y no cuenta como una hoja de la solicitud internacional)

0-1	Formulario PCT/RO/134 Indicaciones respecto a microorganismo(s) u otro material biológico depositado	
0-11	Preparado usando	PCT Online Filing Versión 3.5.000.244e MT/FOP 20141031/0.20.5.20
0-2	Solicitud Internacional No.	
0-3	Referencia del archivo del solicitante o agente	BTB003BWO
1	Las indicaciones hechas a continuación se refieren a microorganismo(s) u otro material biológico depositado a que se hace referencia en la descripción en:	
1-1	página	4
1-2	línea	30
1-3	Identificación del depósito	
1-3-1	Nombre de la institución depositaria	DSMZ Leibniz-Institut DSMZ – Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares GmbH (DSMZ)
1-3-2	Dirección de la institución depositaria	Inhoffenstr. 7B, 38124 Braunschweig, Alemania
1-3-3	Fecha de depósito	05 de agosto 2014 (05.08.2014)
1-3-4	Número de registro	DSMZ 29231
1-5	Estados designados para los se hacen las indicaciones	Todas las designaciones
2	Las indicaciones hechas a continuación se refieren a microorganismo(s) u otro material biológico depositado a que se hace referencia en la descripción en:	
2-1	página	
2-2	línea	
2-3	Identificación del depósito	
2-3-1	Nombre de la institución depositaria	
2-3-2	Dirección de la institución depositaria	
2-3-3	Fecha de depósito	
2-3-4	Número de registro	
2-5	Estados designados para los se hacen las indicaciones	
5		
	Para uso de la oficina receptora solo	
0-4	Este formulario se recibió con la solicitud internacional: (sí o no)	Sí
0-4-1	Funcionario autorizado	Carr, Juliette

REIVINDICACIONES

1. Cepa BOT SPO de *Bacillus amyloliquefaciens* que tiene el número de depósito DSMZ 29231.
- 5 2. Preparación bactericida y/o fungicida que comprende la cepa BOT SPO como se describe en la reivindicación 1, en presencia de posibles coformulantes y adyuvantes útiles en el campo agronómico.
3. Preparación según la reivindicación 2, en donde dicha BOT SPO está presente en forma de esporas de la misma.
- 10 4. Preparación según las reivindicaciones 2-3, que comprende un pesticida.
5. Uso de la cepa o las preparaciones descritas en las reivindicaciones 1-4 en el tratamiento o la prevención de infecciones fúngicas y/o bacterianas de plantas en el campo agronómico.
- 15 6. Uso según la reivindicación 5, en donde dichas infecciones están causadas por uno o más de los géneros de hongos *Fusarium*, *Botrytis*, *Monilia*, *Phytophthora*, *Sclerotinia* y/o uno o más de los géneros bacterianos *Erwinia*, *Xanthomonas*, *Pseudomonas*, *Pectobacterium*, *Ralstonia*.
- 20 7. Uso según la reivindicación 6, en donde dichas infecciones están causadas por uno o más microorganismos seleccionados de: *Fusarium oxysporum lycopersici*, *Botrytis cinerea*, *Monilia laxa*, *Phytophthora infestans*, *Sclerotinia minor*, *Erwinia amylovora*, *Xanthomonas campestris pv. vesicatoria*, *Pseudomonas syringae pv. actinidiae*, *Pseudomonas syringae pv. syringae*, *Pseudomonas syringae pv. tomato*, *Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum*, *Ralstonia solanacearum*.
- 25 8. Uso según la reivindicación 7, en donde dichas infecciones están causadas por microorganismos incluyendo *Sclerotinia minor* y/o *Ralstonia solanacearum*.
9. Uso según la reivindicación 8, en donde dichas infecciones afectan a plantas incluyendo lechuga y tomates.
- 30 10. Uso según las reivindicaciones 5-9, en donde dicho tratamiento o prevención reduce la incidencia y gravedad de dicha infección.