

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 737 419**

51 Int. Cl.:

**C12N 1/20** (2006.01)

**A01N 63/02** (2006.01)

**C12R 1/39** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.02.2012 PCT/IB2012/050694**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.08.2013 WO13121248**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.02.2012 E 12706932 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.05.2019 EP 2836612**

54 Título: **Nueva cepa de Pseudomonas fluorescens y usos de la misma en el control biológico de enfermedades bacterianas o fúngicas**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**14.01.2020**

73 Titular/es:

**ALMA MATER STUDIORUM - UNIVERSITÀ DI BOLOGNA (100.0%)  
Via Zamboni, 33  
40126 Bologna, IT**

72 Inventor/es:

**BAZZI, CARLO y  
BIONDI, ENRICO**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 737 419 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

Nueva cepa de *Pseudomonas fluorescens* y usos de la misma en el control biológico de enfermedades bacterianas o fúngicas

La presente invención se refiere a una nueva cepa bacteriana como agente de control biológico de enfermedades causadas por patógenos tales como bacterias u hongos, tales como enfermedades de las plantas, a composiciones que comprenden la misma, a métodos para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades de las plantas, es decir, la gestión de enfermedades de las plantas, que comprende la gestión de las bacterias o de la composición desvelada en esta invención.

## ESTADO DE LA TÉCNICA

Los patógenos fúngicos y bacterianos en plantas se encuentran entre los factores más importantes que causan graves pérdidas a varios cultivos cada año.

Sus ataques se producen antes o después de la cosecha y causan pérdidas significativas no solo en el compartimiento de la agricultura sino también en toda la línea de producción de productos en todos los campos técnicos relacionados con el uso de materiales vegetales.

Habitualmente, las enfermedades de las plantas se controlan con la aplicación de productos químicos o mezclas que contengan principios activos que tienen actividad antibacteriana/antifúngica; no obstante, el uso rutinario de tales moléculas (por ejemplo, antibióticos) tiene varios efectos secundarios conocidos indeseables tales como desarrollo de la resistencia a los pesticidas, envenenamiento de los herbívoros (por ejemplo, abejas, mamíferos, etc.), daños a la biodiversidad, acumulación en el suelo y en las aguas de productos químicos indeseados.

Un control biológico de enfermedades de las plantas representa una estrategia alternativa deseable que limitaría el uso de pesticidas dañinos en los programas de control integrado. En la patología vegetal, el término control biológico indica el uso de antagonistas microbianos para prevenir o tratar la aparición y el desarrollo del proceso infeccioso. El modo diferente de acción de microorganismos activados por biocontrol en el control de las enfermedades de las plantas incluyen hiperparasitismo, antibiosis, protección cruzada, competencia por los sitios de penetración y nutrientes, y resistencia inducida. Existen diversos métodos conocidos en la técnica para la aplicación de agentes de biocontrol: una aplicación por pulverización directa sobre órganos de las plantas susceptibles a un nivel elevado de población de dichos agentes, o una aplicación localizada sobre la planta para una actividad sistémica contra las poblaciones de patógenos. El desarrollo de técnicas para el control biológico de las enfermedades de las plantas y del uso a gran escala de microorganismos beneficiosos ha sido lento, debido principalmente a los rendimientos variables de dichos microorganismos en diferentes condiciones de campo. Con el fin de superar este problema, es importante desarrollar nuevas formulaciones de biocontrol que tengan un nivel superior de estabilidad y supervivencia en el espacio y el tiempo. Se ha realizado una mejora significativa en diferentes aspectos del control biológico de enfermedades fúngicas en plantas, pero esta área todavía necesita más investigaciones para enfrentar y resolver los problemas existentes. A modo de ejemplo, el fuego bacteriano provocado por *Erwinia amylovora* es una enfermedad bacteriana destructiva de las especies pomáceas tales como manzana y pera. Las infecciones masivas por *E. amylovora* destruyen flores, brotes, ramas, e incluso todo el árbol. En general, las pérdidas económicas son grandes teniendo en cuenta que esta enfermedad no es controlada con facilidad y de manera eficaz por estrategias agronómicas (retirada y destrucción de órganos de las plantas infectados, uso de rizomas y cultivares resistentes, etc.) y químicos (cobre y otros aerosoles compuestos). En la floración (es decir, cuando la ley lo permita en varios países), los aerosoles de antibióticos pueden ser muy eficaces no solo contra la fase de tizón de la floración de la enfermedad sino también en la prevención del desarrollo y propagación de las otras fases del tizón. Sin embargo, las cepas del patógeno que son resistentes al antibiótico estreptomycinina están presentes en algunos huertos en el este de los Estados Unidos y están muy extendidos en la mayoría de regiones de cultivo de manzana y pera de los agentes de control biológico en el oeste de los Estados Unidos, aunque no se usan ampliamente, han proporcionado un control parcial de las infecciones por tizón de la floración, incluso si se requieren agentes biológicos más eficaces para un uso comercial a gran escala.

Con el fin de contar con estrategias de control biológico más eficaces en el futuro, es indispensable investigaciones posteriores para investigar más profundamente sobre algunos aspectos no revelados del biocontrol. Esta investigación incluye el desarrollo de nuevas formulaciones, la comprensión del impacto de los factores ambientales en agentes de biocontrol, la producción en masa de microorganismos de biocontrol y el uso de la biotecnología y nanotecnología en la mejora de los mecanismos y estrategias de biocontrol. Las perspectivas futuras de biocontrol de enfermedades de las plantas es brillante y prometedor y con la creciente demanda de productos de biocontrol entre los productores, será posible utilizar el control biológico como una estrategia eficaz para gestionar enfermedades de las plantas, cultivar cultivos sanos, aumentar los rendimientos con un impacto mínimo en el entorno circundante, y enfocar un sistema de agricultura sostenible.

Sin embargo, antes de que el biocontrol puede llegar a ser la forma elegida para combatir contra enfermedades de las plantas, los científicos tienen que identificar agentes de control biológico (ACB) que permitan combatir enfermedades específicas.

El documento WO 2010/037072 desvela una bacteria de *Pseudomonas fluorescens* con actividad contra *Ralstonia*, *Xanthomonas*, *Pseudomonas* y *Erwinia*.

5 M.A.A Seleim *et al*, plant pathology journal, 1 de enero de 2011, páginas 146-15, desvelan *Pseudomonas fluorescens* con actividad contra *Ralstonia solanacearum*.

N. Dandurishvili *et al*, Journal of Applied Microbiology, vol. 110, no. 1, 1 de enero de 2011, páginas 341-352 desvelan *Pseudomonas fluorescens* con actividad contra *Agrobacterium vitis*.

10 Jordi Cabrefiga *et al*, International Microbiology, 1 de enero de 2007, páginas 123-132 desvelan *Pseudomonas fluorescens* con actividad contra *Erwinia amylovora*.

15 A partir de los datos disponibles en la técnica, parece que las cepas seleccionadas de *Pseudomonas fluorescens* (Pf) pueden considerarse como posibles candidatos para su uso contra diversas enfermedades de las plantas de diferente etiología, no obstante, hasta la fecha, no hay datos experimentales que permitan un conocimiento completo de su capacidad de colonización de órganos de la planta y de supervivencia en ella durante tiempo con niveles elevados de población y adaptarse a la variabilidad ambiental que existe en los campos, ni existen protocolos claros sobre cómo seleccionar cepas apropiadas.

20 La única indicación clara es que, el candidato adecuado como ACB ha de ser no tóxico para las plantas y los seres humanos y también capaz de prevenir/tratar las infecciones de las plantas en el invernadero y en el campo, y ser preferentemente activo contra varios patógenos.

## 25 DESCRIPCIÓN

La presente invención desvela una bacteria de *Pseudomonas fluorescens* (también indicada como *P. fluorescens*) que tiene las actividades antipatógenas (como se desvela en la descripción detallada de la invención) de *P. fluorescens* con el número de depósito DSM 25556 (depositado en virtud del Tratado de Budapest ante DSMZ el 13 de enero de 2012), para la prevención y/o el tratamiento de enfermedades de las plantas de etiología bacteriana o fúngica.

35 La bacteria de la invención se caracteriza porque al menos es capaz de prevenir la aparición de la infección en las plantas por varias fitobacterias tales como *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*, *Ralstonia solanacearum*, *Erwinia amylovora*, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *Pseudomonas syringae* pv. *mors-prunorum*, *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, *Pseudomonas syringae* pv. *persicae*; *Pseudomonas viridiflava*, *Agrobacterium vitis*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*; y por patógenos fúngicos en plantas tales como *Fusarium oxysporum* f. spp.

40 La invención también desvela composiciones que comprenden dicha bacteria, un método de tratamiento de plantas que comprende la puesta en contacto de dicha planta o una parte de la misma con cantidades adecuadas de la bacteria viva o de la composición de la invención, un método de tratamiento de plantas que comprende la puesta en contacto de un vector vivo, tal como un insecto, con cantidades adecuadas de dicha bacteria viva, en la que dicho vector al poner en contacto la planta o una parte de la misma, permitirá la colonización de dicha planta o parte de la misma por dicha bacteria.

45 La bacteria de la invención ha sido aislada y cultivada por los inventores y su actividad en el biocontrol de varias enfermedades de las plantas ha sido verificada tanto por *in vitro* como *in planta* en el invernadero y en el campo.

50 La cepa bacteriana (es decir, la bacteria) de la invención ha demostrado ser particularmente activa en infecciones causadas por las bacterias u hongos etiológicos mencionados anteriormente, ya que es un fuerte antagonista de las mismas y, cuando está presente en la planta o parte de la planta de interés, compite con el crecimiento del patógeno.

55 En una de sus realizaciones, la invención enseña por ende el uso de un organismo natural como se describe en esta invención para tratar o prevenir una enfermedad(es) de las plantas peligrosa(s) sin necesidad de usar material de OMG o aplicaciones frecuentes de pesticidas no deseados. La bacteria de la invención se puede usar como una alternativa y/o integración a los pesticidas en la prevención y/o el tratamiento de infecciones causadas por bacterias y hongos fitopatógenos en el laboratorio, en el invernadero y en el campo.

60 La bacteria de la invención también se puede combinar con otros compuestos activos y/o inertes que permitan un mejor crecimiento y/o una mejor colonización y/o una viabilidad más extensa.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS FIGURAS

65 La figura 1 muestra la colonización por la bacteria BB20 que tiene el número de depósito DSM 25556 (también conocida como BB20 en la presente solicitud) en flores femeninas de *Actinidia chinensis* cv. HORT16 (kiwi amarillo). La gráfica muestra un alto valor de UFC mantenido durante un periodo de al menos 96 horas en la flor.

La figura 2 muestra la colonización por la bacteria BB20 que tiene el número de depósito DSM 25556 en flores femeninas de *Actinidia deliciosa* cv. Hayward (kiwi verde). La gráfica muestra un alto valor de UFC mantenido durante un periodo de al menos 96 horas en la flor.

5 La figura 3 muestra la actividad antagonista de la bacteria BB20 que tiene el número de depósito DSM 25556 en flores femeninas de *A. chinensis* cv. HORT16 (kiwi amarillo) frente a la cepa *P. syringae* pv. *actinidiae* (Psa) CRA-FRU 3.1. La UFC bacteriana inicial/flor es la misma para ambas cepas y cae drásticamente para CRA-FRU 3.1 cuando es antagonizada por BB20.

10 La figura 4 muestra la inhibición *in vitro* de CRA-FRU 3.1 de *P. syringae* pv. *actinidiae* por la bacteria BB20 que tiene el número de depósito DSM 25556. El halo de inhibición cubre casi toda la superficie de la placa.

15 La figura 5 muestra patrones BOX-, REP- y ERIC-PCR de la bacteria BB20 que tiene el número de depósito DSM 2555 (flecha) en comparación con los de las cepas diferentes de *P. fluorescens*.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

20 La presente invención desvela un bacteria de *P. fluorescens* que se define con detalle más adelante, (también representada de una manera no limitante por la bacteria definida en esta invención como "BB20" que tiene el número de depósito en virtud del Tratado de Budapest ante DSMZ 25556), para la prevención de enfermedades de las plantas de etiología bacteriana y fúngica.

25 En una realización, la bacteria de la invención en una bacteria biovar 1 de *P. fluorescens* que tiene todas las actividades antipatógenas de *P. fluorescens* que se depositó el 13 de enero de 2012 ante DSMZ en virtud del Tratado de Budapest, número de depósito DSM 25556, en la que dichas actividades antipatógenas comprenden al menos lo siguiente:

30 presencia de actividad inhibidora *in vitro* en medio sólido al menos contra: *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*, *Ralstonia solanacearum*, *Erwinia amylovora*, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum*, *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, *Pseudomonas syringae* pv. *persicae*; *Pseudomonas viridiflava*, *Agrobacterium vitis*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*; y

presencia de actividad inhibidora *in vitro* en medio sólido del desarrollo micelar del hongo *Fusarium oxysporum* f. spp.

35 Según la invención, dicha actividad inhibidora puede ensayarse mediante ensayos estándar tales como, por una menar no limitante del ejemplo, el ensayo de producción de antibiótico descrito por Vanneste J.L., Yu, J. y Beer, S.V. 1992 "Role of antibiotic production by *Erwinia herbicola* Eh252 in biological control of *Erwinia amylovora*" *Journal of Bacteriology* 174: 2785-2796 (siendo dicho ensayo de producción de antibióticos descrito con detalle en la página 2786 en el párrafo Materiales y Métodos del citado documento); y/o el ensayo antifúngico descrito por De Boer M, lentse van der Sluis, Leendert C. van Loon y A.H.M. Baker, 1999 "Combining fluorescent *Pseudomonas* spp. strains to enhance suppression of *Fusarium* wilt of radish" *European Journal of Plant Pathology* 105: 201-210, 1999 (siendo dicho ensayo antifúngico descrito con detalle en la página 203 en el párrafo Materiales y Métodos del citado documento).

45 La bacteria de la invención también desvelará al menos una de las actividades antipatógenas anteriores *in planta*, siendo dichas actividades antipatógenas analizables con cualquier método conocido como se describe por Alexandrova M., C. Bazzi and P. Lameri, 2002" *Bacillus subtilis* strain BS-F3: colonisation of pear organs and its action as a biocontrol agent" *Acta Horticulturae* 590: 291-297"; (siendo dichos ensayos *in planta* descritos con detalle en la página 292 en el párrafo Materiales y Métodos del citado documento) o por Bazzi C., M. Alexandrova, E. Stefani, F. Anaclerio y T.J. Burr, 1999 "Biological control of *Agrobacterium vitis* using non-tumorigenic agrobacteria" *Vitis* 38: 31-35 (siendo dichos ensayos descritos con detalle en la página 32 en el párrafo Materiales y Métodos del citado documento).

55 En una realización de la invención, la bacteria es la biovar 1 de *Pseudomonas fluorescens* que tiene el número de depósito en virtud del Tratado de Budapest DSM 25556 (también definido como BB20 en la presente descripción).

60 Esta bacteria se caracteriza por la presencia de una actividad inhibidora *in vitro* en medio sólido al menos contra: *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*, *Ralstonia solanacearum*, *Erwinia amylovora*, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum*, *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, *Pseudomonas syringae* pv. *persicae*, *Pseudomonas viridiflava*, *Agrobacterium vitis*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* y por la presencia de una actividad inhibidora *in vitro* en medio sólido al menos contra el desarrollo micelar del hongo *Fusarium oxysporum* f. spp.

65 En una realización adicional, la bacteria *P. fluorescens* de la invención en una *P. fluorescens* derivada de la bacteria que tiene el número de depósito en virtud del Tratado de Budapest DSM 25556 en el que dicha bacteria derivada (también referida como bacteria derivante) se caracteriza porque mantiene todas las actividades

- antipatógenas/inhibidoras de la cepa depositada DSM 25556. Por “bacteria derivante o derivada”, se entiende en esta invención, cualquier bacteria que se puede obtener por mutación natural o inducida, cruzamiento, variación de la información genética por la tecnología genética molecular de biovar 1 de *P. fluorescens* que tiene el número de depósito DSM 25556 que mantiene todas las actividades inhibitoras contra patógenos de DSM 25556, a modo de ejemplo, la bacteria derivada puede ser una bacteria que tiene el número de depósito DSM 25556 transformada con un vector que lleva uno o más genes de resistencia a antibióticos o mutada para resistencia a antibióticos con el fin de permitir la coadministración de los ACB y antibióticos para el tratamiento o la prevención de las enfermedades según la invención.
- Un experto en la materia entenderá que la bacteria derivada, también compartirá obviamente varios marcadores genéticos con la bacteria relacionada que tiene el número de depósito DSM 25556.
- Otras características específicas que caracterizan la cepa que tiene el número de depósito DSM 25556 se proporcionan en esta invención.
- La bacteria que tiene el número de depósito DSM 25556 ha sido aislada de brotes de manzana cv. Oregon spur, es una bacteria Gram-negativa perteneciente a biovar 1 de *P. fluorescens* y tiene las siguientes huellas fenotípicas/bioquímicas:
- están presentes pigmentos fluorescentes,
  - está presente la enzima levansacarasa,
  - está ausente las enzimas pectinolíticas,
  - está presente la enzima citocromo C oxidasa,
  - está presente la enzima arginina dihidrolasa,
  - no está presente ninguna actividad de reducción de nitrato,
  - se cultiva a 4 °C pero no a 41 °C
- “BB20” tiene patrones típicos BOX-, REP- y ERIC-PCR distinguibles de otras cepas bacterianas que pertenecen a *P. fluorescens* (fig. 5). (véase: Versalovic J., M. Schneider, F.J. de Bruijn y J.R. Lupski. 1994 - Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction Meth. Mol. Cell. Biol., 5: 25-40).
- Además, la bacteria según la invención no induce una reacción de hipersensibilidad en paneles de hoja de tabaco (negativo a HR), no provoca la lisis del parénquima en tubérculos de patata (negativo a la podredumbre de patata) y no provoca la lisis de los tejidos del parénquima en habichuelas.
- El ACB de la invención es por ende una cepa no fitopatógena y su aplicación en los órganos de las plantas (flores, frutos, raíces) de diferentes plantas tales como pera, manzana, ciruela, actinidia y tomate, mostro que la bacteria también es no tóxica para las plantas.
- Además, la bacteria de la invención no produce 2, 4-DAPG ni PCA.
- Es más, como ya se ha indicado, también tiene una actividad inhibitora *in vitro* (por ejemplo, en ensayos de medio sólido) al menos contra: *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*, *Ralstonia solanacearum*, *Erwinia amylovora*, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum*, *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, *Pseudomonas syringae* pv. *Persicae*, *Pseudomonas viridiflava*, *Agrobacterium vitis*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, e inhibe el desarrollo micelar del hongo *Fusarium oxysporum* f. spp.
- Como se indicó anteriormente, varios ensayos se pueden usar para probar las actividades inhibitoras enumeradas anteriormente, por ejemplo, como en Vanneste, J.L., Yu, J. y Beer, S.V. 1992 “Role of antibiotic production by *Erwinia herbicola* Eh252 in biological control of *Erwinia amylovora*” Journal of Bacteriology 174: 2785-2796, véase la página 2786 en el párrafo Materiales y Métodos; De Boer M, lentse van der Sluis, Leendert C. van Loon y A.H.M. Baker, 1999 “Combining fluorescent *Pseudomonas* spp. strains to enhance suppression of *Fusarium* wilt of radish” European Journal of Plant Pathology. 105: 201-210, 1999, véase la página 203, párrafo Materiales y Métodos.
- El mismo ensayo también puede usarse para verificar que al menos una de dichas actividades ha sido mantenida por la bacteria derivada según la presente descripción.
- La bacteria de la invención (incluyendo la bacteria derivada) muestra también una actividad inhibitora *in planta* verificada en partes de plantas, tales como flores, frutos y raíces, contra *Erwinia amylovora*, *Xanthomonas arboricola*

pv. *pruni*, *Ralstonia solanacearum*.

Teniendo en cuenta los datos anteriores, el experto en la materia será capaz de identificar las cepas de la bacteria de la invención también de los cultivos de *P. fluorescens* y no necesariamente necesitarán usar la cepa depositada que es solo un ejemplo de la bacteria de la invención y no es una limitación.

La expresión control biológico y su sinónimo abreviado "biocontrol" según la descripción se aplica a la utilización de antagonistas microbianos para suprimir enfermedades, así como el uso de patógenos específicos del huésped para controlar las poblaciones de malezas, el organismo que suprime la plaga o el patógeno se refieren aquí como el agente de control biológico (ACB). El ACB de la invención es por ende una bacteria biovar 1 de *P. fluorescens* como se definió anteriormente. En una realización de la invención, las enfermedades de las plantas de etiología bacteriana o fúngica se pueden seleccionar respectivamente entre una o más enfermedades causadas por *Xanthomonas spp.*, *Erwinia spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Ralstonia spp.*, *Agrobacterium spp.*, *Pectobacterium spp.*, *Fusarium spp.*

En una realización de la invención, la enfermedad es una enfermedad de las plantas causada por infecciones por *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*, *Ralstonia solanacearum*, *Erwinia amylovora*, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum*, *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, *Pseudomonas syringae* pv. *persicae*; *Pseudomonas viridiflava*, *Agrobacterium vitis*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*; *Fusarium oxysporum* f. spp.

En el sentido de la invención, una de las enfermedades de las plantas de etiología bacteriana o fúngica es causada por *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* (Smith) Vauterin *et al.* también conocida como *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* (Smith) Dye, *Xanthomonas pruni* (Smith) Dowson con la posición taxonómica: Bacterias: Gracilicutes y son un patógeno de cuarentena incluido en la lista A2 de la EPPO de 2011.

Los nombres comunes de la enfermedad causada por *Xanthomona arboricola* pv. *pruni* son: mancha foliar bacteriana/cancro bacteriano, corineo, manchas negras (español).

El experto sabrá qué plantas son atacadas y por *Xanthomona arboricola* pv. *pruni* y por ende pueden tratarse y/o protegerse contra las infecciones por *Xanthomona arboricola* pv. *pruni*

A modo de ejemplo, se sabe que *Xanthomona arboricola* pv. *pruni* ataca *Prunus* spp., y particularmente a los cultivos frutales, almendras, melocotones, cerezas, ciruelas y *P. salicina*. Los cultivares del grupo sino-japonés (*P. japonica* and *P. salicina*) son generalmente más susceptibles que las ciruelas europeas. Otras especies exóticas u ornamentales de *Prunus* atacadas incluyen *P. davidiana* y *P. laurocerasus*.

Debido a la amplia distribución de la bacteria patógena (al menos Europa, Asia, América del Norte, América del Sur y Oceanía) y el impacto económico causado por infecciones graves, el experto apreciará la utilidad del agente de control biológico (es decir, la bacteria (BB20) de *Pseudomonas fluorescens* con número de depósito en virtud del Tratado de Budapest DSM 25556 de la presente invención a tenor de la presente descripción.

En el sentido de la invención, una de las enfermedades de las plantas de etiología bacteriana o fúngica es causada por *Ralstonia solanacearum*. Los sinónimos comúnmente conocidos de esta bacteria son: *Bacterium solanacearum* (Smith) Chester, *Burkholderia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al.* (1992), *Pseudomonas solanacearum* (Smith) Smith.

La bacteria tiene la siguiente posición taxonómica: Bacterias: Gracilicutes y es un patógeno de cuarentena incluido en la lista A2 de la EPPO de 2011 que se comporta como un complejo de variantes, descrito de manera diversa como grupos, razas, biovares, biotipos, subrazas y cepas.

Los nombres comunes de la enfermedad causada por *R solanacearum* son pudrición parda (patata), marchitamiento bacteriano del sur (tomate), enfermedad de moko (plátano), marchitamiento Granville (tabaco) (español).

*R solanacearum* tiene un amplio intervalo de huéspedes y es el agente causal de diversas enfermedades de marchitamiento bacteriano devastadoras. Más de 200 especies, especialmente cultivos tropicales y subtropicales son susceptibles a una u otra de las variantes del patógeno. A nivel mundial, los cultivos más importantes son: tomates, *Musa* spp., tabaco y patatas. Algunos cultivos huéspedes de menor importancia son: *Anthurium* spp., cacahuetes, *Capsicum annuum*, algodón, caucho, mandioca, semillas de ricino, berenjenas y jengibre. Numerosas malas hierbas (por ejemplo: *Solanum dulcamara*) también son huéspedes del patógeno y por lo tanto aumentan el potencial de *R solanacearum* para construir inóculos. Normalmente, los patógenos infectan plantas pasando por raíces dañadas, lesiones en los tallos o por estomas moviéndose en los haces vasculares y colonizando el xilema con cuatro pasos principales: aparición de síntomas en la punta de la raíz, invasión celular cortical en la punta de la raíz, colonización de los vasos, y marchitamiento foliar.

Muy pocas bacterias fitopatógenas son capaces de colonizar raíces intactas de las plantas como *R. solanacearum*, incluso si el suelo local ofrece un entorno favorable para el crecimiento bacteriano. *R. solanacearum*, un patógeno

transmitido por el suelo gram-negativo responsable del marchitamiento bacteriano, invade de forma natural plantas a través de las axilas de las raíces secundarias. *R. solanacearum* ataca la raíz, encuentra nutrientes, se multiplica, migra a los tejidos de las plantas y penetra en el xilema provocando de este modo la enfermedad. La vía principal para la propagación internacional de Raza 3 de este patógeno es por patatas de siembra infectadas (latente) y otros materiales de propagación vegetativa; tubérculos con infección latente son los medios más probables de la introducción en una nueva zona.

La alta incidencia de mortalidad de las plantas y la falta de métodos eficaces de control hacen que *R. solanacearum* sea uno de los patógenos de plantas más destructivos del mundo. En una realización de la invención, por ejemplo, en el caso de infecciones por *R. solanacearum*, el ACB o la composición de la invención se pueden aplicar directamente sobre materiales de propagación (semillas, tubérculos, etc.), en suelos y sobre el aparato de la raíz de las plántulas antes del trasplante.

En el sentido de la invención, una de las enfermedades de las plantas de etiología bacteriana o fúngica es causada por *Agrobacterium vitis* Ophel y Kerr (1990); sinónimo: *Rhizobium vitis* Young *et al.* (2001) que tiene la siguiente posición taxonómica: Bacterias: Gracilicutes.

A pesar de que en la UE la bacteria no aparece como una plaga de cuarentena que está comúnmente considerada como perjudicial, patógeno generalizado ("organismo de calidad") que puede reducir el valor de materiales de propagación. Además, en otros países se considera una plaga de cuarentena (tolerancia cero). En el comercio internacional, *A. vitis* puede incluirse entre las llamadas "plagas no cuarentenarias reguladas" (Int. standard of Phytosanitary Measures, ISPM 16-FAO).

Los nombres comunes de la enfermedad causada por *A. vitis* son: agalla de corona de la vid (español); *tumore batterico/rognà della vite* (italiano).

El intervalo de huésped natural de *A. vitis* está restringido a la vid. Los cultivares de la vid europea (*Vitis vinifera*) son más susceptibles que otros *Vitis* spp., e híbridos interespecie. La enfermedad se presenta en todo el mundo en el que se cultivan uvas y pueden conducir al deterioro de la vid y la mortalidad en los viñedos, especialmente los sometidos a daños por congelamiento que proporcionan un sitio importante donde la enfermedad puede iniciarse. El patógeno de agalla de corona sobrevive sistemáticamente en la vid y provoca la enfermedad (tumores) en zonas dañadas en la vid. *A. vitis* también provoca zonas de necrosis en la raíz en vides infectadas.

La agalla de corona representa un sistema biológico único (transferencia entre reinos): la exportación de material genético de una bacteria a una planta con una integración estable de oncogenes bacterianos en el genoma celular de la planta (transformación tumoral).

El patógeno puede estar presente en materiales de propagación asintomática que plantean el problema de la comercialización de materiales de infección latente, como medio de diseminación de corta y larga distancia de agrobacterias tumorigénicas.

El tratamiento de la propagación con la bacteria o con la composición de la invención puede ayudar en la prevención de la transmisión de la enfermedad a través de los materiales de propagación; a modo de ejemplo, el ACB o la composición de la invención puede usarse para su inmersión en la raíz antes de la siembra de materiales de propagación (formación de biopelículas como rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal, RPCV), una inyección en la vid o pulverización anual.

En el sentido de la invención, una de las enfermedades de etiología bacteriana o fúngica es causada por *Erwinia* spp, que es una especie bacteriana anaerobia bien conocida que causa enfermedades en las plantas, todas las enfermedades conocidas causadas por todas las cepas patógenas conocidas de *Erwinia* tales como *E. amylovora*, *E. carotovora*, *E. chrysantemi* etc., forman parte de la invención.

En una realización de la invención, la enfermedad de las plantas causada por *E. amylovora* (Burrill) Winslow *et al.* también conocida como *Micrococcus amylovorus* Burrill, *Bacillus amylovorus* (Burrill) Trevisan, *Bacterium amylovorus* (Burrill) Chester, *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow *et al.* f.sp. *rubi* Starr *et al.* con la siguiente posición taxonómica: Bacterias: Gracilicutes y son una plaga de cuarentena incluida en la lista A2 de la EPPO, siendo su introducción prohibida por casi todos los países (véanse las medidas fitosanitarias).

El nombre común de la enfermedad causada por *Erwinia amylovora* es fuego bacteriano.

Los huéspedes principales y más susceptibles se encuentran en la subfamilia *Pomoideae* de la familia *Rosaceae*. Las siguientes plantas son consideradas como huéspedes importantes, tanto desde el punto de vista económico como epidemiológico: *Amelanchier alnifolia*, *A. canadensis*, *Malus* spp., *Chaenomeles* spp., *Cotoneaster* spp., *Crataegus* spp., *Cydonia* spp., nísperos del japon, nísperos, *Pyrus* spp., *Pyracantha* spp., *Sorbus* spp., *Stranvaesia davidiana*. De estas, las más susceptibles son: *Crataegus* (la mayoría de las especies), *Cydonia* (la mayoría de las especies), *Cotoneaster bullatus*, *C. dammeri* (excepto cv. Eichholz n.º 1), *C. lacteus*, *C. lucidus*, *C. microphyllus*, *C. moupinensis*,

*C. salicifolius*, *C. watereri*, cultivares de pera Alexandrine Douillard, Durondeau y Passe Crassane, cultivares de manzana Idared, Red Jade, Van Eseltine, *Pyracantha fortuneana* cv. Orange Glow, *Sorbus aria* y *Stranvaesia davidiana*. Las siguientes no son, sin embargo, consideradas como huéspedes: *Crataegus arnoldiana*, *C. phaenopyrum*, *C. viridis*, *Sorbus intermedia*.

*Crataegus* y *Pyrus amygdaliformis* desempeñan un papel importante como fuentes de inóculos en el norte de Europa y en el Mediterráneo, respectivamente, debido a su abundancia en estas áreas. *Crataegus* se usa ampliamente como una planta al borde del camino o diversificada, mientras que *P. amygdaliformis* es una planta silvestre común del paisaje mediterráneo.

El fuego bacteriano es una enfermedad destructiva y supone una importante amenaza para las manzanas y las peras cultivadas así como para el comercio de viveros. El riesgo fitosanitario es alto, debido a la capacidad del patógeno para vivir en órganos de la planta asintomáticos. El impacto económico de la enfermedad es impredecible y después de condiciones climáticas favorables, el rendimiento se reduce considerablemente y en algunos casos es anulado. A menudo es necesario cortar y quemar los árboles muy infectados.

Los huéspedes pueden ser infectados por el patógeno que penetra por las aberturas naturales y heridas: síntomas típicos son marchitamiento y muerte de racimos de flor, necrosis de ramas y brote que forma la llamada "cayado de pastor", infestación de hoja, fruto, rama y tronco. La progresión de la infección, asociada con el movimiento de las bacterias dentro de los tejidos vegetales, conduce a la formación de canchales de la corteza típicos, rodeados o no por grietas irregulares. Los canchales retardados, así como los otros órganos infectados, pueden actuar como importantes fuentes de inóculos (evasión de exudado) durante la estación de cultivo.

Las medidas de erradicación han demostrado ser ineficaces para evitar la difusión de la enfermedad. Son necesarias estrictas medidas fitosanitarias en el material de la planta huésped importado y vigilancia en huertos y viveros para evitar o retrasar la difusión de *E. amylovora* en áreas no infestadas.

El control de la enfermedad es bastante difícil, especialmente cuando el uso de antibióticos está prohibido. En los últimos años, se han desarrollado nuevas estrategias de control integrado, basándose en el uso de moléculas complejas de origen biótico (por ejemplo, proteínas bacterianas) o abiótico (prohexadiona-Ca, acibenzolar-S-metil, ácido salicílico, fosetil-AI) que desencadenan respuestas de defensa naturales (también definidas en esta invención como "elicitores de las respuestas de defensa de las plantas").

Según la invención, el ACB o la composición que comprende el mismo pueden ser usados para pulverizaciones anuales para evitar infecciones en la flor y en el brote. El uso de insectos polinizadores (*Apis mellifera* y *Osmia cornuta*) tiene un potencial como portador de bacterias antagonistas en el control biológico del fuego bacteriano. El ACB de la presente invención se puede usar en aplicaciones integradas en combinación con elicitores de respuestas de resistencia a enfermedades tales como las indicadas anteriormente.

En el sentido de la invención, otra enfermedad de la planta de etiología bacteriana o fúngica puede ser una enfermedad causada por *Pseudomonas spp.*, tal como *P. aeruginosa*, *P. oryzihabitans*, y *P. plecoglossicida*, *P. putida*, *P. syringae*, *P. solanacearum*, etc.

En una realización de la invención, la enfermedad será causada por *P. syringae actinidiae* Takikawa *et al.* con la siguiente posición taxonómica: Bacterias: Gracilicutes; el nombre común de la enfermedad causada por esta bacteria gram es el cancro bacteriano del kiwi (español).

La enfermedad ha sido reportada en Europa (Lista de alertas de la región de la EPPO), Asia, Sudamérica, Oceanía y afecta a las especies *Actinidia*: *A. deliciosa*, *A. chinensis*, *A. arguta*, y *A. kolomikta* (no existen datos sobre la susceptibilidad de otra especie *Actinidia*). El patógeno sobrevive en los tejidos infectados y en primavera se evade como exudado, penetrando por los estomas, lenticelas y heridas. El desarrollo de la infección es rápido y sistémico.

El patógeno puede estar presente en los materiales de propagación asintomática que plantean el problema de la comercialización de los materiales con infección latente. La eficacia de las pulverizaciones de cobre tras la poda, después de tormentas de granizo y durante caída de la hoja es limitada. El ACB o la composición de la invención puede usarse en el material de propagación como se ha descrito anteriormente.

En el sentido de la invención, una de las enfermedades de las plantas de etiología bacteriana o fúngica es causada por *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* van Hall con la siguiente posición taxonómica: Bacterias: Gracilicutes, el nombre común de la enfermedad causada por esta bacteria gram es *Disseccamento rameale dell'actinidia* (italiano), por ejemplo marchitamiento de las ramas de actinidia.

Los síntomas típicos de la enfermedad son lesiones corticales, marchitamiento del tallo, necrosis del brote y manchas en las hojas necróticas. El patógeno puede estar presente en los materiales de propagación asintomática que plantean el problema de la comercialización de los materiales con infección latente. Asimismo, en este caso, la eficacia de las pulverizaciones de cobre tempranas tras la poda, después de tormentas de granizo y durante caída de la hoja es



limitada.

Como anteriormente, el ACB o la composición de la invención es útil también para el tratamiento de material de propagación.

5 En el sentido de la invención, una de las enfermedades de las plantas de etiología bacteriana o fúngica es causada por *Pseudomonas viridiflava* (Burkholder) Dowson con la siguiente posición taxonómica: Bacterias: Gracilicutes, el nombre común de la enfermedad causada por esta bacteria gram es la mancha bacteriana (español).

10 Los síntomas típicos son manchas necróticas y pardeamiento de hoja y tejidos de flor. Una pudrición interna puede dañar yemas de la flor. No son visibles lesiones en los tallos y troncos. Las infecciones florales parciales pueden causar deformación y crecimiento deficiente de los frutos.

15 La aplicación del ACB o de la composición de la invención puede ser útil para proteger al mismo tiempo árboles de kiwi de las infecciones causadas por los tres pseudomonades descritos anteriormente.

20 En el sentido de la invención, otra enfermedad de las plantas de etiología bacteriana o fúngica es causada por *P. syringae* pv. *mors-prunorum* o *morsprunorum* (Wormald 1931) Young, Dye, y Wilkie (1978) con la siguiente posición taxonómica: Bacterias: Gracilicutes, el nombre común de la enfermedad causada por esta bacteria gram es el cancro bacteriano de la fruta de hueso (español).

Se ha notificado en la región de la EPPO, y ataca a *Prunus* spp.; en particular, cultivos frutales como albaricoques, cerezas, melocotones causando

25 cancro bacteriano de fruta de hueso.

Una importante enfermedad de la planta emergente denominada decadencia bacteriana de albaricoqueros (particularmente susceptibles son cultivares vigorosos como "Aurora", Gold Strike", etc.) ha sido demostrada por la evidencia experimental con una etiología compleja y puede ser asociada a cepas virulentas que pertenecen a las tres especies bacterianas anteriores (*P. syringae* pv. *morsprunorum*, pv. *syringae* y *P. viridiflava*).

30 Los síntomas típicos pueden aparecer en todas las partes aéreas de los árboles; particularmente graves son canchros en ramas asociados a la gran producción de goma. Las infecciones graves pueden conducir a la destrucción de la totalidad del árbol.

35 El patógeno puede estar presente en los materiales de propagación asintomática que plantean el problema de la comercialización de los materiales con infección latente. Las pulverizaciones de cobre tempranas y tardías pueden ayudar a proteger los árboles de las infecciones pero con una eficacia limitada.

40 Asimismo, en este caso, el ACB o la composición de la invención también puede ser útil para el tratamiento del material de propagación.

45 En el sentido de la invención, una de las enfermedades de las plantas de etiología bacteriana o fúngica es causada por *Pseudomonas syringae* pv. *persicae* (Prunier *et al.*) Young *et al.* Los sinónimos son: *Pseudomonas mors-prunorum* f.sp. *persicae* Prunier *et al* con la siguiente posición taxonómica: Bacterias: Gracilicutes, el nombre común de la enfermedad causada por esta bacteria gram es acronecrosis bacteriana de melocotón (español); *Deperissement bacterien du pecher* (francés).

50 La bacteria es una plaga de cuarentena incluida en la lista A2 de la EPPO.

Se ha notificado en Europa (Francia) y Oceanía y afecta a los melocotones, nectarinas (*Prunus persica*) y *P. salicina*.

55 Los síntomas típicos de la enfermedad son visibles en los brotes y ramas (decoloraciones marrones, lesiones de la corteza, necrosis de la yema, acronecrosis, marchitamiento, canchros), en las hojas (manchas necróticas, efecto "corineo") y frutos (manchas necróticas superficiales). En los casos más graves, ramas enteras e incluso todo el árbol pueden morir. Esta es una enfermedad grave especialmente en cultivares de melocotón altamente susceptibles (Hale, Redwing).

60 *P. syringae* pv. *persicae* tiene una importante fase epífita en las hojas en otoño que constituye el inóculo para infecciones y entra en los brotes por pseudoheridas (cicatrices de las hojas) y heridas (poda, congelación). La dispersión del patógeno se debe principalmente al material de propagación asintomática; las medidas fitosanitarias han de ser seguidas (inspecciones en viveros, producción de existencias de viveros libres de enfermedades, etc.) para limitar la dispersión a través de distancias cortas y largas.

65 El control se basa principalmente en las medidas profilácticas y las pulverizaciones de cobre durante caída de la hoja parecen limitar la enfermedad en huertos.

En el sentido de la invención, una de las enfermedades de las plantas de etiología bacteriana o fúngica es causada por *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (Jones) Hauben *et al.* Sinónimo: *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (Jones) Bergey, Harrison *et al* con la siguiente posición taxonómica: Bacterias: Gracilicutes, el nombre común de la enfermedad causada por esta bacteria gram es la podredumbre húmeda bacteriana (español).

La bacteria no es una plaga de cuarentena, tiene una distribución mundial, y afecta a numerosas especies hortícolas (hortalizas tales como calabaza, pimienta, hinojo, apio, zanahoria, patata, etc.) y ornamentales.

El síntoma más típico es el ablandamiento de los órganos carnosos de la planta que se vuelven de color marrón y huelen a podrido. Las infecciones graves, que se producen en el invernadero, en el campo y en el almacén, pueden conducir a pérdidas muy graves. Este patógeno oportunista sobrevive en el suelo, en aguas de riego que contienen materia orgánica, en desechos infectados y en la rizosfera de muchas especies cultivadas y de plantas silvestres. Las heridas, normalmente asociadas a varios eventos de estrés (fuertes lluvias, altas temperaturas y humedad, abono excesivo de nitrógeno) son los principales sitios de la penetración bacteriana. El viento, los aerosoles, los insectos y el hombre son factores importantes para la dispersión del patógeno y la enfermedad.

El control se basa principalmente en las medidas profilácticas, basándose en prácticas de cultivo adecuadas (por ejemplo: fertilización con un bajo contenido de nitrógeno y un alto contenido de potasio, rotación de cultivos y el saneamiento de campo, control de insectos, buen drenaje del suelo) y pulverizaciones de cobre (cada 7-10 días) cuando la enfermedad aparece pueden ayudar a limitar la capacidad del patógeno a colonizarse fácilmente en el huésped.

En un sentido adicional de la invención, una de las enfermedades de las plantas de etiología bacteriana o fúngica es causada por *Fusarium oxysporum* f. spp., una especie que pertenece al grupo de los hongos mitospóricos, que comprende un gran número de *formae speciales* tales como:

*Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*; *Fusarium oxysporum* f.sp. *asparagi*; *Fusarium oxysporum* f.sp. *batatas*; *Fusarium oxysporum* f.sp. *betae*; *Fusarium oxysporum* f.sp. *cannabis*; *Fusarium oxysporum* f.sp. *cepa*; *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris*; *Fusarium oxysporum* f.sp. *citri*; *Fusarium oxysporum* f.sp. *coffea*; *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*; *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi*; *Fusarium oxysporum* f.sp. *lentis*; *Fusarium oxysporum* f.sp. *lini*; *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*; *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis*; *Fusarium oxysporum* f.sp. *nicotianae*; *Fusarium oxysporum* f.sp. *niveum*; *Fusarium oxysporum* f.sp. *passiflorae*; *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli*; *Fusarium oxysporum* f.sp. *pisii*; *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*; *Fusarium oxysporum* f.sp. *ricini*; *Fusarium oxysporum* f.sp. *tulipae*; *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum*.

El hongo, tiene una distribución mundial y es perjudicial para la agricultura debido también a su amplio intervalo de objetivos. Ataca, causando graves pérdidas, la mayoría hortalizas y flores (espárragos, judías, cebollas, guisantes, tomates, etc.), varios cultivos de campo tales como el algodón y el tabaco, cultivos de plantación tales como banana, plátano, café y caña de azúcar, y unos pocos árboles de sombra. Las mayores pérdidas pueden ser causadas por la enfermedad (*marchitamiento por "Fusarium"*), especialmente en las variedades susceptibles y en condiciones meteorológicas favorables (temperaturas de suelo y aire bastante más altas durante gran parte de la temporada). Esta enfermedad vascular daña las plantas causando achaparramiento de las plantas, que pronto comienzan a marchitarse y finalmente mueren; cuando las plantas están infectadas en la etapa de plántula, normalmente se marchitan y mueren poco después de la aparición de los primeros síntomas. Las raíces también se infectan, y después de un periodo inicial de achaparramiento, se pudren las raíces más pequeñas. El hongo mitospórico produce tres tipos de esporas asexuales (micro-macroconidia, clamidosporas) y puede sobrevivir entre los cultivos en los restos de plantas infectadas en el suelo también por mucho tiempo. En ocasiones, el hongo puede llegar a los frutos de las plantas infectadas y penetrar o contaminar la semilla. *Fusarium* se propaga a través de distancias cortas por medio de agua y maquinaria agrícola contaminada, y a través de distancias largas principalmente en trasplantes infectados o en el suelo que los porta. El control se basa principalmente en el uso de variedades resistentes (cuando está disponible), esterilización del lecho de siembra y la rotación de cultivos, uso de semillas y trasplantes sanos, tratamiento de agua caliente de la semilla, solarización del suelo de campo, y control biológico usando hongos antagonistas (*Trichoderma* spp) o bacterias productoras de sideróforos beneficiosas (*Pseudomonas* spp.).

Cuando las enfermedades a tratar se encuentran entre las enfermedades enumeradas anteriormente, el experto en la materia, a modo de ejemplo, según la invención, hará que la bacteria pueda ser aplicada directamente sobre la planta o parte de la misma a tratar.

En todos los casos ejemplificados, el experto en la materia conocerá qué partes de la planta tienen que ser tratadas con el ACB o con la composición de la invención, y cuándo aplicar el antagonista con el fin de proteger los árboles de la infección (por ejemplo: al menos tres aplicaciones de pulverización por año en todo el árbol).

Según la invención, la bacteria puede ser almacenada en un forma liofilizada, o como un polvo tal como una "bioformulación basada con talco" (una mezcla de alginato combinada con talco esterilizado tal como se describe por Ozaktan H., T. Bora 2006: "Studies on biological fire blight with some antagonistic bacteria" Acta Horticulturae 704:

337-340), como granulado, y puede usarse como tal en la planta o parte de la misma o puede volverse a suspender en un líquido adecuado tal como salmuera, agua, medio de crecimiento u otros líquidos conocidos por los expertos en la materia.

5 La bacteria también puede ser suspendida en un gel biopolímero adecuado a modo de ejemplo no limitativo según las realizaciones descritas en el documento WO 0215702; y por Stockwell V.O., K.B. Johnson, Von W. Johnson 2006: "Colonization of flowers by *Pseudomonas fluorescens* A506 formulated in a biopolymer gel" Acta Horticulturae 704: 293-299).

10 El experto en la materia sabrá cómo volver a suspender la bacteria antes de usarla directamente en la planta o en la parte de la planta.

15 En una realización, la bacteria puede estar comprendida en una composición que también comprende un vehículo adecuado para la bacteria (por ejemplo, agua, salmuera, medio de crecimiento, gel polimérico, etc.), comprendiendo opcionalmente además la composición uno o más compuestos adicionales adecuados para ayudar a la colonización de la planta por la bacteria de la invención (por ejemplo, alginatos de sodio, aminoácidos, quelatos de hierro).

20 Según la invención, la composición también puede comprender una aplicación concomitante o posterior, uno o más compuestos adicionales adecuados para ayudar a la reactividad/recuperación de la planta (por ejemplo: fertilización adecuada) y/o uno o más compuestos adicionales usados comúnmente como pesticida (productos a base de cobre) y/o uno o más compuestos adicionales activos tales como (prohexadiona-Ca, acibenzolar-S-metil, fosetil-AI) conocidos como inductores o "elicitores" de respuestas de resistencia a enfermedades. Cuando se usan compuestos con un efecto bactericida, a aplicación de ACB debe realizarse a diferentes intervalos de tiempo. La composición se puede preparar para la aplicación concomitante o posterior de la bacteria y de los pesticidas conocidos. El protocolo de control  
25 puede ser tal que se realiza una primera aplicación de un pesticida y una aplicación(es) posterior(es) de la bacteria puede(n) llevarse a cabo al permitir un mejor antagonismo por la bacteria de la invención contra los patógenos.

30 En una realización, la bacteria o una alícuota bacteriana se suspende en un vehículo adecuado como se indicó anteriormente y el ACB o la composición obtenida como se ha indicado anteriormente puede aplicarse directamente en los órganos aéreos de la planta, en materiales de propagación (semillas, tubérculos, etc.), en suelos y en el aparato de la raíz de las plántulas antes del trasplante.

35 Convenientemente, la bacteria se puede almacenar en una forma secada por congelación o liofilizada, o como un polvo o granulado y la misma puede ser resuspendida en un líquido o gel polimérico adecuado conocido por el experto en la materia.

40 La invención, por ende, también proporciona un kit para la prevención y/o el tratamiento de enfermedades de las plantas de etiología bacteriana o fúngica, comprendiendo el kit una o más alícuotas de la bacteria como se definió anteriormente y una o más alícuotas de un vehículo y/o de una composición que comprende además uno o más compuestos adicionales mencionados anteriormente, en el que la alícuota del vehículo o la alícuota de la composición puede usarse para la resuspensión de la alícuota bacteriana antes de su uso. Cuando se lleva a cabo una aplicación posterior, el experto en la materia sabrá, sin el uso de habilidad inventiva y sin necesidad de una enseñanza más en la presente memoria descriptiva, qué pesticidas pueden usarse para preparar la composición de la invención o, cuando se prepara un kit, qué pesticidas pueden estar comprendidos en las alícuotas de dicha composición que comprende además uno o más compuestos adicionales descritos anteriormente.

45 A modo de ejemplo no limitativo, el pesticida puede seleccionarse entre los pesticidas usados comúnmente tales como los descritos anteriormente.

50 En una realización preferida, el pesticida estará en una concentración por debajo de la concentración a la que se usa el mismo normalmente para el mismo fin en el estado de la técnica.

55 En una realización de la invención, el ACB puede ser una bacteria derivada como se describió anteriormente, en el que dicha bacteria se ha transformado o mutado para ser resistente a un antibiótico específico con el fin de permitir la coaplicación del antibiótico y el ACB cuando es aconsejable un potente tratamiento.

60 Es obvio que la invención se refiere también a un método de preparación de la composición de la invención que comprende la etapa que consiste en mezclar la bacteria de la invención con uno o más de un vehículo adecuado y/o un nutriente bacteriano adecuado y/o un nutriente vegetal adecuado y/o un pesticida adecuado.

65 La invención también se refiere a un método de preparación del kit de la invención que comprende la etapa que consiste en alícuotar la bacteria de la invención y opcionalmente someter las alícuotas así obtenidas a una etapa de almacenamiento tal como liofilización, trituración, granulación o introducción de las bacterias en una gel biopolimérico por medio de técnicas estándar como se ha descrito anteriormente y preparación de una o más alícuotas de un vehículo adecuado para la resuspensión de la alícuota bacteriana como se ha definido anteriormente y/o preparación de alícuotas de una composición que comprende uno o más de los compuestos adicionales que se enumeran

anteriormente en la que la alícuota bacteriana puede volverse a suspender o para aplicación a la planta entre sí, antes o después de la aplicación de la alícuota como tal o se volvió a suspender en dicho vehículo adecuado.

5 El experto en la materia conocerá los componentes adecuados de la composición a partir del conocimiento común en el campo específico, no obstante, a modo de ejemplo no limitativo, los ingredientes de la composición se pueden seleccionar entre cualquiera de los ingredientes mencionados anteriormente.

10 La composición de la invención puede estar en cualquier forma adecuada conocida por el experto en la materia para el tratamiento de plantas o partes de las mismas, a modo de ejemplo no limitativo, la composición puede estar en forma liofilizada, granulado, polvo, líquido, nebulizada, comprimido, cápsula, gel polimérico.

La concentración de la bacteria de la invención en la composición puede ser de aproximadamente  $10^{11}$  UFC/g de peso de la composición.

15 La invención proporciona además un método de tratamiento de una planta o una parte de la misma para la prevención y/o el tratamiento de las enfermedades de las plantas de etiología bacteriana o fúngica que comprende la aplicación a una planta o a una parte de la misma de la bacteria o la composición o las alícuotas del kit como se ha descrito previamente.

20 Según el método de la invención, la aplicación se puede repetir de una a más veces en periodos subsiguientes de tiempo.

25 Cuando se usa una composición para la administración posterior de pesticida y bacteria de la invención, el protocolo de aplicación comprenderá una primera etapa de aplicación de pesticidas adecuados y una segunda etapa de aplicación de la bacteria de la invención.

30 En una realización de la invención dichas enfermedades de las plantas de etiología bacteriana o fúngica se seleccionan entre una o más enfermedades causadas *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*, *Ralstonia solanacearum*, *Erwinia amylovora*, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum*, *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, *Pseudomonas syringae* pv. *persicae*; *Pseudomonas viridiflava*, *Agrobacterium vitis*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* y *Fusarium oxysporum* f. spp.

35 El experto en la materia sabrá, cuando se usa un protocolo de aplicación posterior, qué pesticidas serán adecuados para llevar a cabo el método de la invención.

40 Un ejemplo de un posible protocolo de aplicación de la composición del ACB (aprox.  $10^{11}$  UFC/g) contra el fuego bacteriano causado por *E. amylovora*, según las fases más críticas de la enfermedad en diferentes huéspedes y según los aspectos biológicos del patógeno en diferentes condiciones ambientales, podría ser el siguiente: una primera aplicación en primavera durante la floración para prevenir las infecciones de la flor, seguido por una o más aplicaciones durante el periodo vegetativo para proteger los brotes, frutos y segundas floraciones. Las aplicaciones de ACB podrían integrarse con los productos químicos enumerados anteriormente, prestando atención para evitar el uso de antibióticos y/u otras moléculas con un efecto bactericida cuando la bacteria se aplica simultáneamente a los compuestos adicionales. En el caso de que se usen antibióticos o compuestos bactericidas, un protocolo de aplicación posterior puede ser seguido, cuando la aplicación de la bacteria o de la composición de la invención se lleva a cabo preferentemente después de usar el antibiótico o los compuestos bactericidas. El experto en la materia sabrá la duración del efecto del antibiótico o de la composición bactericida en general y aplicará la bacteria o la composición de la invención cuando el efecto de los compuestos mencionados anteriormente caduque o disminuya fuertemente. La composición para la posterior aplicación o el kit para la misma puede usarse para llevar a cabo el método descrito anteriormente. Para desarrollar un programa de control rentable que funciones constantemente, pueden usarse programas de predicción adicionales para predecir la enfermedad de fuego bacteriano en manzanas y peras.

55 Otro ejemplo de un posible protocolo de aplicación de la composición de ACB (aprox.  $10^{11}$  UFC/g) contra manchas bacterianas/cancro de los cultivos de fruto causados por *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*, podrían diseñarse para evitar infecciones durante el florecimiento, hojas, frutos, brotes/ramas pequeñas e infecciones tardías de brotes a través de cicatrices de hojas justo antes y durante la caída de hojas en otoño que constituyen la fuente de inóculo primario para la siguiente primavera. Las pulverizaciones a base de cobre se podrían hacer ventajosamente durante el periodo inactivo.

60 En una realización de la invención, un vector biótico puede ser usado para la administración de la bacteria de biocontrol a las plantas o partes de las mismas de interés.

65 Es bien conocido que varios insectos preferentemente viven, se alimentan, reproducen en plantas específicas, por ende el insecto puede usarse como un vector biótico vivo para administrar la bacteria en el campo de las plantas o partes de las mismas de interés.

A modo de ejemplo no limitativo, himenópteros pronubial tales como, por ejemplo, *Apidae* y *Megachilidae*, pueden

usarse como vectores bióticos adecuados en una realización de esta invención.

Los vectores se pueden poner en contacto con la bacteria de la invención (a modo de ejemplo en la forma de una preparación de colonias vivas de alta densidad tales como células liofilizadas a una concentración de aprox.  $10^{11}$  UFC/g) y luego permitir el vuelo a las plantas de interés para así administrar a dichas plantas la bacteria de la invención, permitiendo de este modo que la bacteria crezca en la planta o en una parte de la misma.

Los siguientes ejemplos son ejemplos experimentales de pruebas llevadas a cabo con la bacteria de la invención.

**EJEMPLOS**

Ensayo en flores de *Actinidia* spp.

Dinámica de la población de la bacteria antagonista: las flores femeninas (5 flores X estudio/tesis) de *A. chinensis* "Hort16A" Zespri Gold *A. deliciosa* "Hayward" aún cerradas se recogieron y se pusieron en tubos de Eppendorf de 1,5 ml que contenían 1 ml de agua desionizada estéril. Al día siguiente, una suspensión de un mutante resistente a la rifampicina (refracción) de BB20 de la cepa *P. fluorescens* con número de depósito en virtud del tratado de Budapest DSM 25556 (aprox.  $10^8$  unidades formadoras de colonias, UFC/ml) se nebulizó en flores abiertas. Las flores se lavaron individualmente en 3 ml de  $MgSO_4$  10 mM, se hicieron diluciones decimales de líquido de lavado, y todas las diluciones se sembraron en placas de Petri que contenían KB + rifampicina (100 ppm) por deposición sobre el sustrato con 10  $\mu$ l de gotas. Las placas se incubaron a continuación a 27 °C durante 24 horas y las colonias bacterianas se contaron y se hace referencia como mililitros de lavado. Las mediciones se realizaron en las flores 1, 24, 48, 72 y 96 horas tras la aplicación de bacterias antagonistas.

Dinámicas de población de *P. syringae* pv. *actinidiae* en comparación con la bacteria antagonista: las flores femeninas (5 flores X estudio/tesis) de *A. chinensis* "Hort16A" Zespri Gold aún cerradas se recogieron y se pusieron en tubos de Eppendorf de 1,5 ml que contenían 1 ml de agua desionizada estéril. Al día siguiente, una suspensión de la bacteria de BB20 de la invención con número de depósito en virtud del tratado de Budapest DSM 25556 (ca.  $10^8$  UFC/ml) se nebulizó en flores abiertas. Tras transcurrir 24 horas, las flores se nebulizaron con una suspensión (ca.  $10^6$  UFC/ml) de *P. syringae* pv. *actinidiae* cepa CRA-FRU 3.1Rif. Las flores se lavaron individualmente en 3 ml de  $diMgSO_4$  10 mM, se hicieron diluciones decimales de líquido de lavado, y todas las diluciones se sembraron en NSA + rifampicina (100 ppm) para controlar la población de la cepa patógena y en KB para detectar al mismo tiempo también la población de la BB20 cepa antagonista con número de depósito en virtud del Tratado de Budapest DSM 25556, al depositar 10  $\mu$ l de gotas en ambos sustratos. Las placas de NSA + rifampicina y las placas de KB se incubaron a 27 °C durante 24 horas, después de lo cual, las colonias bacterianas se contaron y se hace referencia como mililitros de lavado. Las mediciones se realizaron en las flores 1, 24, 48 horas después de su nebulización, mientras que las mediciones sobre la población antagonista se llevaron a cabo hasta 96 horas después de su nebulización.

Los ensayos *in vitro*, con respecto a la inhibición *in vitro*, se llevaron a cabo según el protocolo de Vanneste *et al.*, 1992.

Los resultados de las pruebas de actividad antagonista llevados a cabo con la bacteria de la invención se notifican a continuación en la Tabla 1.

La Tabla 1 muestra la actividad inhibidora *in vitro* de la bacteria BB20 con número de depósito en virtud del Tratado de Budapest DSM 25556 frente a las diversas cepas bacterianas patógenas.

	<b>Ea</b>	<b>Av</b>	<b>Rs</b>	<b>Xap</b>	<b>Pcc</b>	<b>Pss</b>	<b>Psa</b>
<b>G20</b>	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.
Ea: <i>Erwinia amylovora</i> Av: <i>Agrobacterium vitis</i> Rs: <i>Ralstonia solanacearum</i> Xap: <i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>pruni</i> Pcc: <i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> Pss: <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> Psa: <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>actinidiae</i>							

Los datos no publicados preliminares para la preparación del gel polimérico mostraron que una suspensión en agua de las células bacterianas liofilizadas (aprox.  $10^8$  UFC/ml) modificadas con alginato de sodio (0,5 %) y glicerol (0,4 %) mejoró la supervivencia del ACB en las hojas de pera (aprox. 2 órdenes de magnitud) con respecto al cultivo reciente y/o liofilizado.

## REIVINDICACIONES

1. Una bacteria de *P. fluorescens* que tiene el número de depósito en virtud del Tratado de Budapest DSM 25556 o una bacteria de *P. fluorescens* que se deriva de la bacteria que tiene el número de depósito DSM 25556 y que mantiene todas las actividades antipatógenas de la misma para la prevención y/o el tratamiento de enfermedades de las plantas de etiología bacteriana o fúngica.
2. La bacteria de *P. fluorescens* según la reivindicación 1, en la que dichas actividades antipatógenas son la presencia de actividad inhibidora *in vitro* en un sustrato sólido al menos contra: *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*, *Ralstonia solanacearum*, *Erwinia amylovora*, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum*, *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, *Pseudomonas syringae* pv. *persicae*; *Pseudomonas viridiflava*, *Agrobacterium vitis*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*; y presencia de una actividad inhibidora *in vitro* en un medio sólido del desarrollo micelar del hongo *Fusarium oxysporum* f. spp.
3. La bacteria de cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en la que dichas enfermedades de las plantas de etiología bacteriana o fúngica se seleccionan entre una o más enfermedades causadas por *Erwinia* spp., *Pseudomonas* spp., *Ralstonia* spp., *Agrobacterium* spp., *Pectobacterium* spp., *Xanthomonas* spp. y *Fusarium* spp.
4. La bacteria de la reivindicación 3, en la que dichas enfermedades de las plantas de etiología bacteriana o fúngica se seleccionan entre una o más enfermedades causadas por infecciones por *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*, *Ralstonia solanacearum*, *Erwinia amylovora*, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum*, *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, *Pseudomonas syringae* pv. *persicae*; *Pseudomonas viridiflava*, *Agrobacterium vitis*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*; *Fusarium oxysporum* f. spp.
5. La bacteria de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en forma liofilizada, en polvo, granulada, gel, suspensión líquida.
6. Una composición que comprende la bacteria de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 y un vehículo adecuado.
7. La composición de la reivindicación 6 que comprende además uno o más compuestos adicionales que ayudan a la colonización de la planta por la bacteria de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 y/o uno o más compuestos adicionales que ayudan a la reactividad/recuperación de la planta y/o uno o más compuestos adicionales que tienen propiedades pesticidas y/o uno o más compuestos adicionales seleccionados entre inductores o elicitores de respuestas de resistencia a las enfermedades en plantas.
8. La composición de la reivindicación 6 o 7 en una forma liofilizada, granulada, en polvo, suspensión líquida, nebulizada, comprimido, cápsula, gel, gel biopolimérico, crema, ungüento, pasta, emulsión, dispositivo medicinal.
9. Un kit de partes que comprende una o más alícuotas de la bacteria de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 y una o más alícuotas de un vehículo adecuado y/o de una composición que comprende además uno o más de los compuestos adicionales como se define en la reivindicación 7.
10. El kit de la reivindicación 9, en el que el kit comprende una o más alícuotas de la bacteria de las reivindicaciones 1 a 5, una o más alícuotas de un vehículo adecuado y una o más alícuotas de una composición que comprende uno o más compuestos que tienen propiedades pesticidas incluyendo propiedades bactericidas.
11. Un método de tratamiento de una planta o una parte de la misma para la prevención y/o el tratamiento de las enfermedades de las plantas de etiología bacteriana o fúngica que comprende la aplicación a una planta o a una parte de la misma de la bacteria o de la composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
12. Un método de tratamiento de una planta o una parte de la misma para la prevención y/o el tratamiento de las enfermedades de las plantas de etiología bacteriana o fúngica que comprende la aplicación posterior a una planta o a una parte de la misma de una composición que comprende uno o más compuestos que tienen propiedades pesticidas incluyendo propiedades bactericidas, y la bacteria o la composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
13. El método de cualquiera de las reivindicaciones 11 o 12, en el que dichas enfermedades de etiología bacteriana y/o fúngica son enfermedades de las plantas seleccionadas entre una o más enfermedades causadas por *Erwinia* spp., *Pseudomonas* spp., *Ralstonia* spp., *Agrobacterium* spp., *Pectobacterium* spp., *Xanthomonas* spp. y *Fusarium* spp.
14. El método de la reivindicación 13, en el que dichas enfermedades de las plantas de etiología bacteriana o fúngica se seleccionan entre una o más enfermedades causadas por infecciones por *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*, *Ralstonia solanacearum*, *Erwinia amylovora*, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum*, *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, *Pseudomonas syringae* pv. *persicae*; *Pseudomonas viridiflava*, *Agrobacterium vitis*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*; *Fusarium oxysporum* f. spp.

15. Un método de tratamiento de una planta o una parte de la misma para la prevención y/o el tratamiento de enfermedades de las plantas de etiología bacteriana y/o fúngica que comprende:

- 5
- poner en contacto un huésped vivo que vive normalmente o está presente normalmente en dicha planta o parte de la misma con la bacteria viva de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 y
  - permitir a dicho huésped ponerse en contacto con dicha planta o parte de la misma permitiendo así que dicha bacteria se desarrolle en dicha planta o parte de la misma.

10

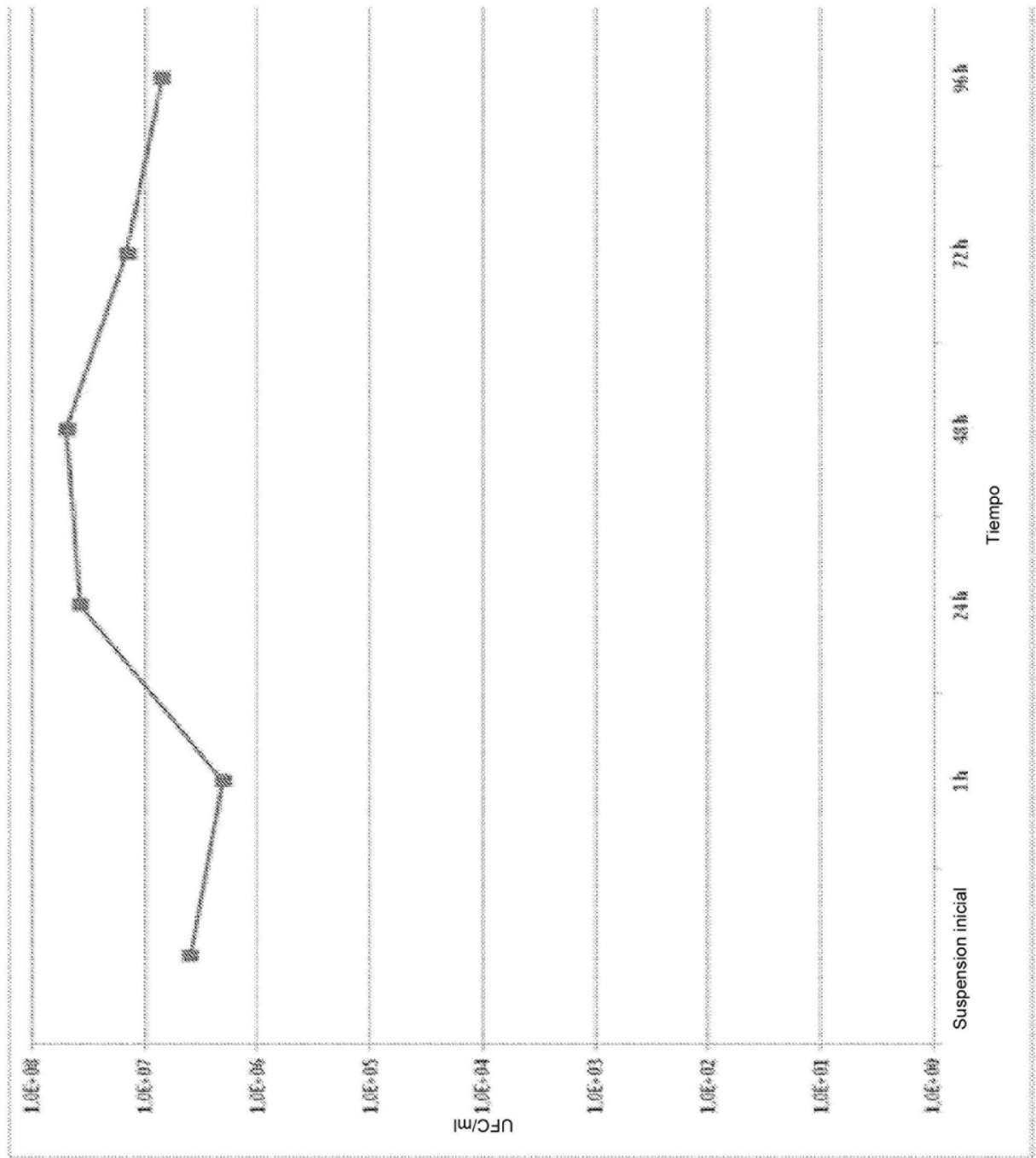


Fig. 1



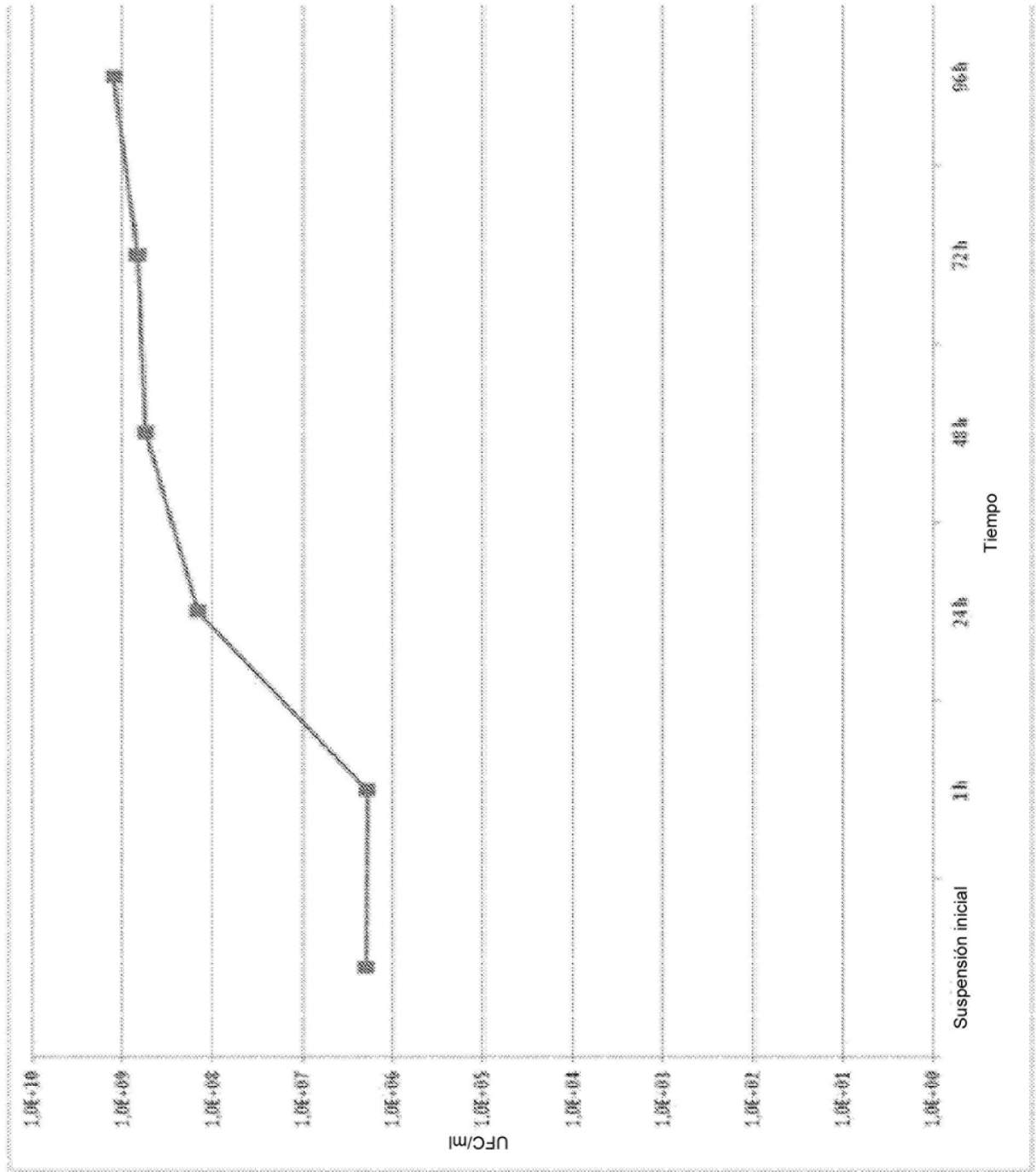


Fig. 2

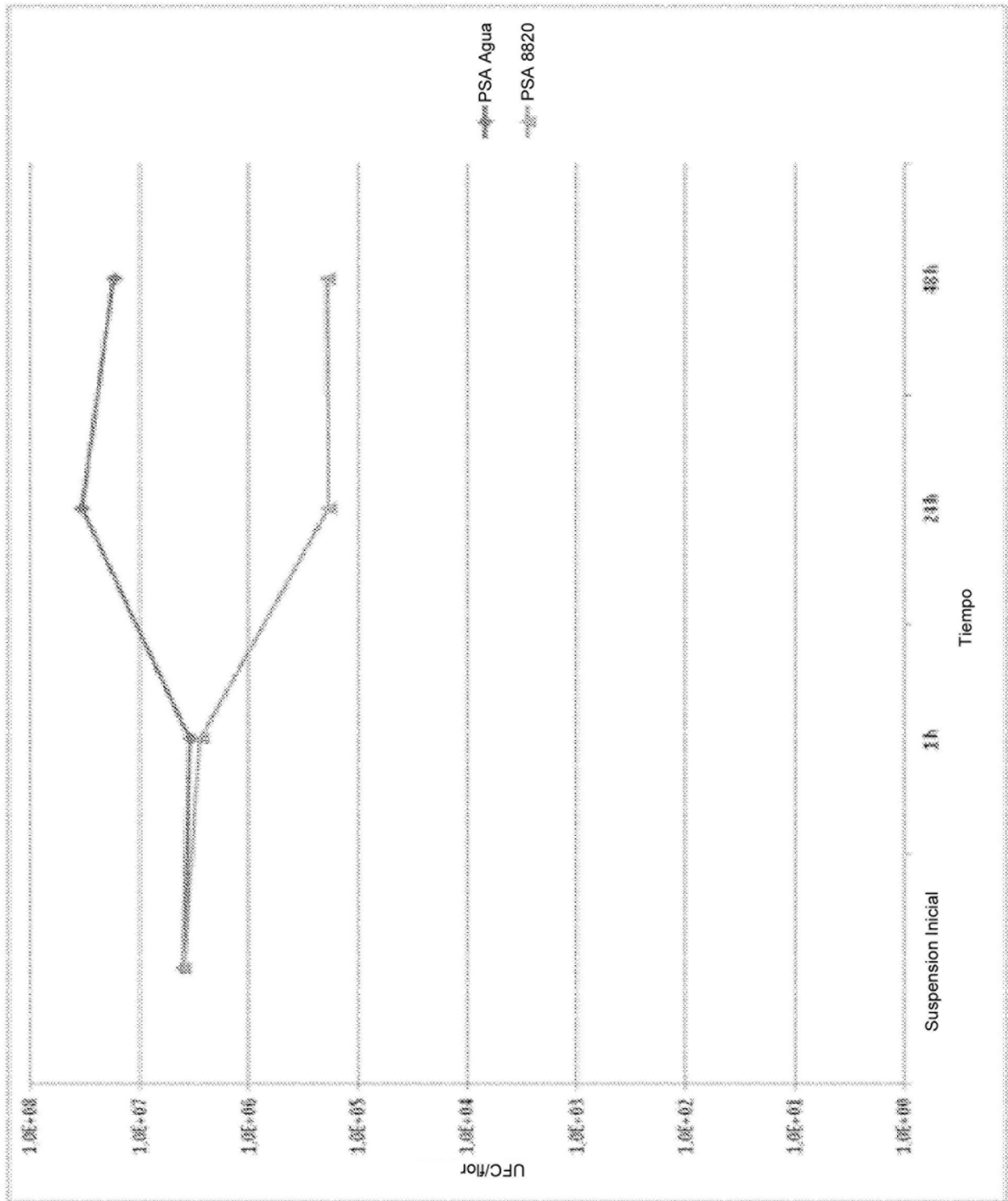


Fig. 3

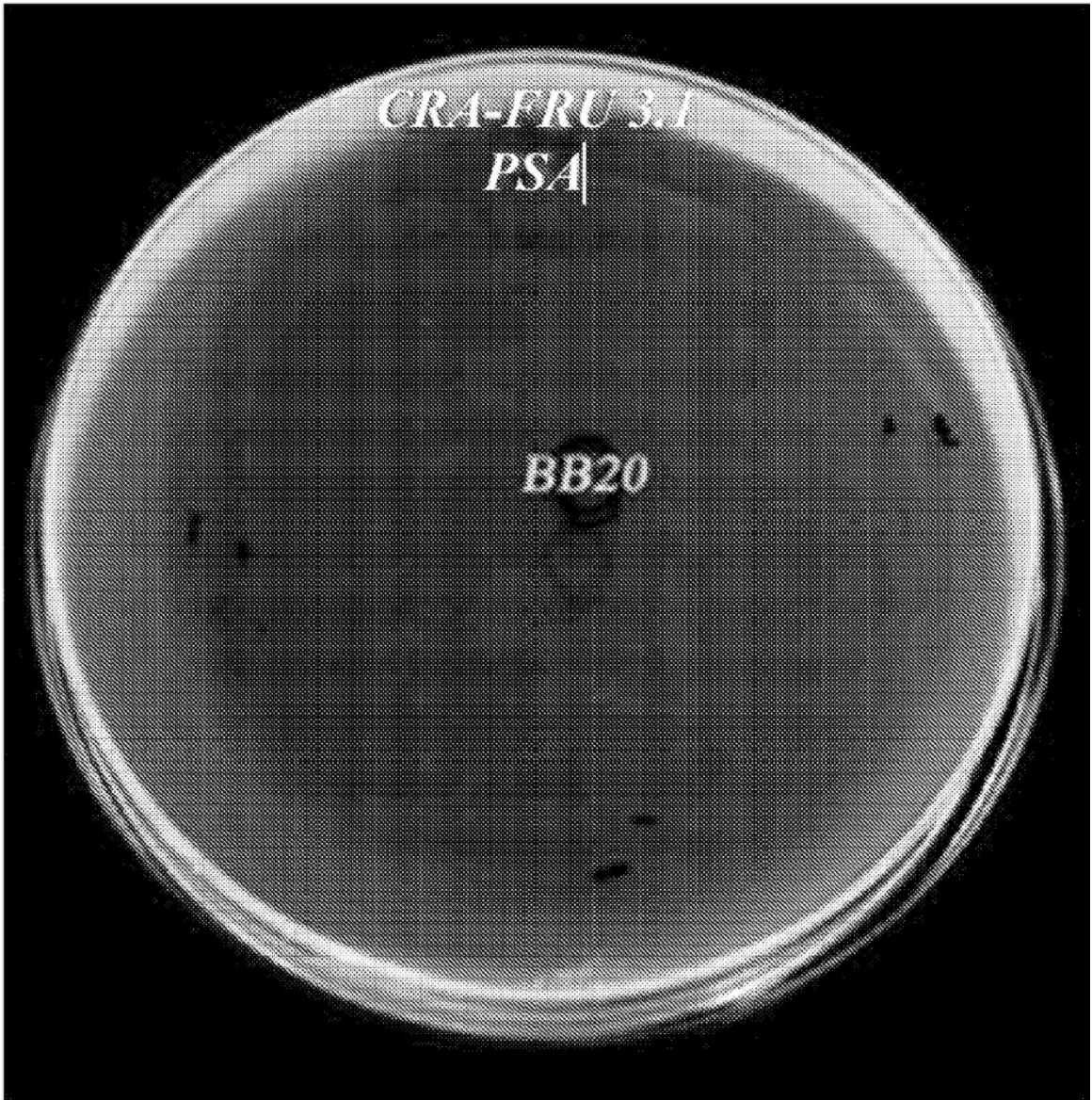


Fig. 4

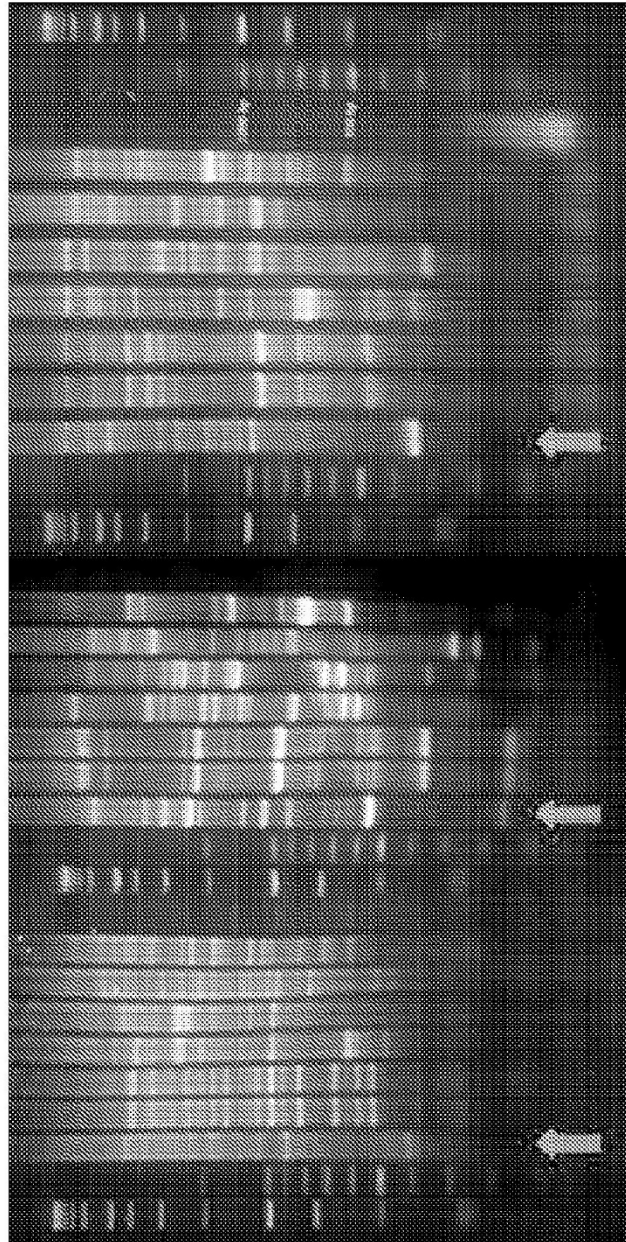


Fig. 5