

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 775 191**

51 Int. Cl.:

**C12N 1/20** (2006.01)

**A01G 7/00** (2006.01)

**C12R 1/07** (2006.01)

**A01N 63/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.10.2014 PCT/JP2014/077306**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.04.2015 WO15056666**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.10.2014 E 14854641 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.12.2019 EP 3059304**

54 Título: **Novedoso microorganismo y uso del mismo**

30 Prioridad:

**17.10.2013 JP 2013216834**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**24.07.2020**

73 Titular/es:

**IDEMITSU KOSAN CO., LTD (50.0%)  
1-1 Marunouchi 3-chome Chiyoda-ku  
Tokyo 100-8321, JP y  
SDS BIOTECH K. K. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**INAI, KOJI;  
TANAKA, MOTOKI y  
AMAKI, YUSUKE**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

ES 2 775 191 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

Novedoso microorganismo y uso del mismo

5 La presente invención se refiere a un microorganismo que es una cepa de *Bacillus* sp. ITB105 (NITE BP-01727). Este microorganismo es útil para el control de enfermedades de las plantas, el control de nematodos y la estimulación del crecimiento de las plantas. La presente invención se refiere además al uso de este microorganismo como una formulación microbiológica para mejorar la resistencia a un patógeno vegetal, controlar los nematodos y estimular el crecimiento de las plantas.

10 Como método de control de una enfermedad de las plantas, ha llamado la atención la tecnología de control biológico que no utiliza un pesticida químico convencional sino un microorganismo aislado del mundo natural, y se han comercializado varios pesticidas microbianos. Sin embargo, los pesticidas microbianos existentes tienen los inconvenientes de que el efecto no es estable y la gama de enfermedades aplicables es bastante limitada en  
15 comparación con un pesticida químico. Debido a tal situación, existe una demanda de un nuevo pesticida microbiano aplicable a una nueva enfermedad y que exhiba un efecto de control estable.

Los ejemplos de agentes de control de enfermedades de las plantas que usan un microorganismo, que se han registrado y utilizado como pesticida microbiano, incluyen un agente de *Talaromyces flavus*, un agente de  
20 *Pseudomonas fluorescens*, un agente no patógeno de *Erwinia carotovora*, un agente de *Trichoderma atroviride*, un agente de *Bacillus simplex* y un agente de *Bacillus subtilis*.

Como agente de control de nematodos que utiliza un microorganismo, un agente de *Pasteuria penetrans* y un agente de *Monacrosporium phymatophagum* se han registrado y utilizado como pesticidas microbianos.

25 Un agente de control de enfermedades de las plantas que usa una bacteria que pertenece a *Bacillus amyloliquefaciens* se ha descrito en la Patente Japonesa N.º 2955655 (Literatura de patentes 1). El principio activo del agente de control de enfermedades de las plantas es un producto de un microorganismo y la bacteria en sí no se utiliza como pesticida. Adicionalmente, no hay ninguna descripción sobre la estimulación del crecimiento de las  
30 plantas, ni control de nematodos.

Entre tanto, un agente de control de enfermedades de las plantas que usa una bacteria que pertenece a *Bacillus amyloliquefaciens* se ha descrito en la Patente japonesa N.º 5198690 (Literatura de patentes 2), pero la bacteria es categóricamente diferente de una cepa de acuerdo con la presente invención.

35 Adicionalmente, un pesticida microbiano, que es capaz de controlar simultáneamente una enfermedad fúngica filamentosa y una enfermedad bacteriana, y en el que una célula bacteriana viva es efectiva, se ha desvelado en la publicación de solicitud de patente japonesa no examinada número 2009-247302 (literatura de patentes 3), pero no hay una descripción sobre la estimulación del crecimiento de las plantas, ni control de nematodos.

40 Un agente de control de enfermedades de las plantas que usa una bacteria que pertenece al género *Bacillus*, que se puede aplicar a una amplia gama de enfermedades de las plantas y es eficaz para un gusano de la raíz del maíz, se ha desvelado en la Patente japonesa N.º 3471815 (Literatura de patentes 4, WO98/050422), pero no hay una descripción sobre la estimulación del crecimiento de las plantas, ni control de nematodos.

45 Adicionalmente, la cepa de *Bacillus* sp. D747, que se puede aplicar al control de enfermedades de las plantas y al control de plagas de insectos, se ha desvelado en la Patente japonesa N.º 4071036 (Literatura de patentes 5, US2004/265292), pero no hay una descripción sobre la estimulación del crecimiento de las plantas, ni control de nematodos.

50 Un agente de control de nematodos que usa una bacteria que pertenece al género *Bacillus* se ha desvelado en la Patente japonesa N.º 3471811 (Literatura de patentes 6, WO96/032840). El principio activo del agente de control de nematodos es una bacteria de una cepa de *Bacillus firmus* o una espora del mismo que tiene actividad nematocida, pero no hay una descripción sobre la estimulación del crecimiento de las plantas, ni control de enfermedades de las  
55 plantas.

Un método de control de nematodos con una toxina nematocida producida por una nueva cepa de *Bacillus thuringiensis* se ha desvelado en la Patente japonesa N.º 4359653 (Literatura de patentes 7, WO1997/012980), pero no hay una descripción sobre la estimulación del crecimiento de las plantas, ni control de enfermedades de las  
60 plantas.

Aunque en la agricultura un fertilizante químico es un material agrícola importante que influye en el rendimiento de un cultivo, del 30 al 50 % de un componente químico fertilizante aplicado se difunde en el medio ambiente sin ser  
65 utilizado por un cultivo para causar la eutrofización de un río, contaminación de aguas subterráneas o similares. A este respecto, dado que se consume una gran cantidad de combustible fósil en la producción de un fertilizante químico, Los costes de un fertilizante químico han ido en aumento con el aumento de los precios de los combustibles

fósiles. Adicionalmente, el óxido de nitrógeno (NO<sub>x</sub>), que es un producto de la degradación de un fertilizante nitrogenado, se dice que tiene un efecto invernadero aproximadamente 300 veces más fuerte que el dióxido de carbono, y existe una creciente preocupación por el calentamiento global. Entre tanto, se anticipa una futura escasez de alimentos en vista del aumento de la población mundial, y, por lo tanto, el uso de un material para aumentar la productividad del cultivo es esencial y existe una creciente necesidad de un material más ecológico que sustituya a un fertilizante químico convencional.

A la luz de tales circunstancias, las investigaciones para aumentar el rendimiento del producto agrícola utilizando un microorganismo del suelo se han llevado a cabo principalmente con respecto a una amplia gama de bacterias *Rhizobium* (bacterias del nódulo de raíz), bacterias *Pseudomonas* y bacterias *Bacillus*, sin embargo, solo unos pocos se han puesto en uso práctico debido a su efectividad limitada.

Tal como se ha descrito anteriormente, ha habido una fuerte demanda de un microorganismo, que puede reducir una carga en el medio ambiente sin depender de un pesticida químico y un fertilizante químico, y controlar una enfermedad de las plantas y un nematodo, así como también estimular el crecimiento de las plantas.

**[Documentos de la técnica anterior]**

**[Literatura de patentes]**

- [Literatura de patentes 1] Patente japonesa n.º 2955655
- [Literatura de patentes 2] Patente japonesa n.º 5198690
- [Literatura de patentes 3] publicación de solicitud de patente japonesa no examinada N.º 2009-247302
- [Literatura de patentes 4] Patente japonesa n.º 3471815
- [Literatura de patentes 5] Patente japonesa n.º 4071036
- [Literatura de patentes 6] Patente japonesa n.º 3471811
- [Literatura de patentes 7] Patente japonesa n.º 4359653

Un objeto de la presente invención es proporcionar un nuevo microorganismo que tenga una acción de control de enfermedades de las plantas, una acción de control de nematodos y una acción promotora del crecimiento de las plantas.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar un agente de control de enfermedades de las plantas, un agente de control de nematodos y un agente de estimulación del crecimiento de plantas útiles como pesticida biológico (formulación microbiológica) que contiene el microorganismo como bacteria eficaz.

Los inventores llevaron a cabo investigaciones diligentes para lograr los objetos para tener éxito en el aislamiento de una cepa de *Bacillus* sp. ITB090 (NITE BP-01725), una cepa de *Bacillus* sp. ITB100 (NITE BP-01726), una cepa de *Bacillus* sp. ITB105 (NITE BP-01727) y una cepa de *Bacillus* sp. ITB117 (NITE P-01728). En lo sucesivo, una cepa de *Bacillus* sp. ITB105 (NITE BP-01727) se denomina "microorganismo de acuerdo con la presente invención". Las variantes de esta cepa, así como una cepa de *Bacillus* sp. Cepa ITB090 (NITE BP-01725), una cepa de *Bacillus* sp. ITB100 (NITE BP-01726), y una cepa de *Bacillus* sp ITB117 (NITE P-01728) que incluye variantes de la misma se denominan ocasionalmente de forma colectiva "microorganismo de acuerdo con la presente divulgación". Los inventores descubrieron que estas cepas tienen una acción controladora sobre varios tipos de enfermedades de las plantas, una acción de control de nematodos y una acción promotora del crecimiento de las plantas.

Concretamente, la presente invención incluye lo siguiente.

- [1] Un microorganismo que es una cepa de *Bacillus* sp. ITB105 (NITE BP-01727).
- [2] El microorganismo según [1], en el que la cepa de *Bacillus* sp. ITB105 (NITE BP-01727) tiene un ADNr 16S que se muestra mediante la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 3.
- [3] Un producto de cultivo del microorganismo según [1] o [2], en el que el producto de cultivo incluye medio de cultivo o solución de cultivo que contiene el microorganismo de [1] o [2].
- [4] Una formulación microbiológica que comprende el microorganismo según [1] o [2] o el producto de cultivo según [3].
- [5] Uso del microorganismo de [1] o [2], el producto de cultivo de [3] o la formulación microbiológica según [4], para estimular el crecimiento de las plantas.
- [6] Uso del microorganismo de [1] o [2], el producto de cultivo de [3] o la formulación microbiológica según [4], para controlar una enfermedad de las plantas.
- [7] Uso del microorganismo de [1] o [2], el producto de cultivo de [3] o la formulación microbiológica según [4], para

controlar un nematodo.

[8] Un método para estimular el crecimiento de una planta, que comprende una etapa para tratar una planta o un suelo con el producto de cultivo según [3] o la formulación microbiológica según [4].

[9] Un método para controlar una enfermedad de las plantas, que comprende una etapa para tratar una planta o un suelo con el producto de cultivo según [3] o la formulación microbiológica según [4].

[10] Un método para controlar un nematodo, que comprende una etapa para tratar una planta o un suelo con el producto de cultivo según [3] o la formulación microbiológica según [4].

[11] Un método de cultivo de una planta, que comprende una etapa para tratar una planta con el producto de cultivo según [3] o la formulación microbiológica según [4].

[12] Un método para la producción de una cepa variante derivada de la cepa de *Bacillus* sp. ITB105 (NITE BP-01727) o de una célula poliploidizada de la misma,

en el que el método comprende la mutación espontánea de la cepa de *Bacillus* sp. ITB105 o la inducción de la mutación en la cepa de *Bacillus* sp. ITB105 usando radiación de luz ultravioleta, radiación de rayos X o un agente mutagénico, y en el que la variante resultante tiene una acción de control de enfermedades de las plantas, una acción de control de nematodos y una acción estimuladora del crecimiento de las plantas que es un 80 % o más en comparación con una cepa original.

Dado que un microorganismo de acuerdo con la presente invención tiene una acción de control sobre varios tipos de enfermedades de las plantas, una acción de control de nematodos y una acción promotora del crecimiento de las plantas, no depende de un pesticida químico y un fertilizante químico, y puede usarse como una formulación microbiológica efectiva con poca carga ambiental.

Un microorganismo de acuerdo con la presente invención es la cepa ITB105 (NITE BP-01727). Un microorganismo de acuerdo con la presente divulgación es la cepa ITB090 (NITE BP-01725), la cepa ITB100 (NITE BP-01726), la cepa ITB117 (NITE P-01728) o una cepa variante de la misma.

La cepa ITB090 (NITE BP-01725) se identificó como *Bacillus* sp. según un análisis de secuencia de un gen de ARNr 16S (SEQ ID NO: 1). La cepa se depositó en el Centro de Recursos Biológicos (NBRC) del Instituto Nacional de Tecnología y Evaluación (NITE) en 2-5-8 Kazusakamatari, Kisarazu-shi, Chiba 292-0818, Japón, con el número de acceso NITE P-01725 a partir del 17 de octubre de 2013. Luego se convirtió en un depósito internacional bajo las disposiciones del Tratado de Budapest y recibió un número de acceso de NITE BP-01725.

La cepa tiene caracteres bacteriológicos de la siguiente manera:

(1) Carácter morfológico

Forma: bacilar  
 Tamaño: anchura 1,0 µm, longitud de 1,5 a 2,5 µm  
 Motilidad: +  
 Existencia de esporas: +

(2) Carácter del cultivo

Medio de cultivo: agar nutritivo (30 °C)  
 Forma: redonda  
 Tono de color: color crema

(3) Carácter fisiológico

Tinción de Gram: +

La cepa ITB100 (NITE BP-01726) se identificó como *Bacillus* sp. según un análisis de secuencia de un gen de ARNr 16S (SEQ ID NO: 2). La cepa se depositó en el Centro de Recursos Biológicos (NBRC) del Instituto Nacional de Tecnología y Evaluación (NITE) en 2-5-8 Kazusakamatari, Kisarazu-shi, Chiba 292-0818, Japón, con el número de acceso NITE P-01726 a partir del 17 de octubre de 2013. Luego se convirtió en un depósito internacional bajo las disposiciones del Tratado de Budapest y recibió un número de acceso de NITE BP-01726.

La cepa tiene caracteres bacteriológicos de la siguiente manera:

(1) Carácter morfológico

Forma: bacilar  
Tamaño: anchura de 0,8 a 0,9 µm, longitud de 1,5 a 2,0 µm  
Motilidad: +  
5 Existencia de esporas: +

(2) Carácter del cultivo

10 Medio de cultivo: agar nutritivo (30 °C)  
Forma: redonda  
Tono de color: color crema

(3) Carácter fisiológico

15 Tinción de Gram: +

20 La cepa ITB105 (NITE BP-01727) se identificó como *Bacillus* sp. según un análisis de secuencia de un gen de ARNr 16S (SEQ ID NO: 3). La cepa se depositó en el Centro de Recursos Biológicos (NBRC) del Instituto Nacional de Tecnología y Evaluación (NITE) en 2-5-8 Kazusakamatari, Kisarazu-shi, Chiba 292-0818, Japón, con el número de acceso NITE P-01727 a partir del 17 de octubre de 2013. Luego se convirtió en un depósito internacional bajo las disposiciones del Tratado de Budapest y recibió un número de acceso de NITE BP-01727.

La cepa tiene caracteres bacteriológicos de la siguiente manera:

25 (1) Carácter morfológico

30 Forma: bacilar  
Tamaño: anchura de 0,8 a 0,9 µm, longitud de 1,5 a 2,0 µm  
Motilidad: +  
Existencia de esporas: +

(2) Carácter del cultivo

35 Medio de cultivo: agar nutritivo (30 °C)  
Forma: redonda  
Tono de color: color crema

(3) Carácter fisiológico

40 Tinción de Gram: +

45 La cepa ITB117 (NITE P-01728) se identificó como *Bacillus* sp. según un análisis de secuencia de un gen de ARNr 16S (SEQ ID NO: 4). La cepa se depositó en el Centro de Recursos Biológicos (NBRC) del Instituto Nacional de Tecnología y Evaluación (NITE) en 2-5-8 Kazusakamatari, Kisarazu-shi, Chiba 292-0818, Japón, con el número de acceso NITE P-01728 a partir del 17 de octubre de 2013.

La cepa tiene caracteres bacteriológicos de la siguiente manera:

50 (1) Carácter morfológico

55 Forma: bacilar  
Tamaño: anchura de 0,8 a 0,9 µm, longitud de 1,5 a 2,5 µm  
Motilidad: +  
Existencia de esporas: +

(2) Carácter del cultivo

60 Medio de cultivo: agar nutritivo (30 °C)  
Forma: redonda  
Tono de color: color crema

(3) Carácter fisiológico

65 Tinción de Gram: +

En cuanto a una cepa variante derivada de ITB090 (NITE BP-01725), ITB100 (NITE BP-01726), ITB105 (NITE BP-

01727), o cepa ITB117 (NITE P-01728), se ilustran como ejemplos un mutante espontáneo, un mutante inducido que ha usado radiación con luz ultravioleta, radiación con rayos X o un agente mutagénico (por ejemplo, N-metil-N-nitro-N-nitrosoguanidina) y una célula poliploidizada a partir de ellos. En particular, se puede usar, preferiblemente, una cepa variante cuyo ADNr 16S tiene una identidad de nucleótidos del 99,5 % o más con el ADNr 16S de tipo salvaje respectivo. Las cepas variantes mencionadas anteriormente se incluyen en un microorganismo de acuerdo con la presente divulgación, en la medida en que mantengan la acción de control de enfermedades de las plantas, la acción de control de nematodos y la acción promotora del crecimiento de las plantas. A este respecto, para mantener la acción de control de enfermedades de las plantas, la acción de control de nematodos y la acción promotora del crecimiento de las plantas significa que cualquiera de las acciones es un 80 % o más en comparación con una cepa parental.

En cuanto a un método de cultivo de un microorganismo de acuerdo con la presente invención, se puede aplicar un medio conocido públicamente, tal como un cultivo estático que incluye un medio sólido y un cultivo líquido, y no existe una restricción particular sobre el tipo de medio de cultivo o las condiciones de cultivo, en la medida en que la bacteria puede vivir y proliferar. Los ejemplos de un medio de cultivo incluyen un medio de cultivo general, tal como un medio de extracto de carne, así como un medio de cultivo, que contiene glucosa, peptona, o un extracto de levadura. Adicionalmente, además de un medio de cultivo líquido, se puede usar un medio de cultivo sólido que contiene agar, tal como un medio de cultivo inclinado y un medio de cultivo en placa. Un cultivo puede llevarse a cabo en 2 etapas de un cultivo de siembra y un cultivo principal.

Aunque se puede aplicar cualquier fuente de carbono para un medio de cultivo en la medida en que puede ser utilizado por la cepa anterior, ejemplos específicos de los mismos incluyen glucosa, galactosa, lactosa, sacarosa, maltosa, un extracto de malta, melaza, un jarabe de almidón y productos de hidrólisis de almidón.

También se pueden aplicar como fuente de nitrógeno para un medio de cultivo, un material que contiene un nitrógeno orgánico, tales como peptona, un extracto de carne un extracto de levadura una harina de soja y un licor de maíz, así como diversos productos sintéticos o naturales, que la cepa puede utilizar.

Adicionalmente, como de la manera usual para cultivar un microorganismo, se puede añadir una sal inorgánica, tal como una sal común y un fosfato, una sal de un metal, tal como calcio, magnesio y hierro, y una fuente de micronutrientes, tal como una vitamina y un aminoácido, según la necesidad.

Un cultivo puede realizarse en condiciones aerobias mediante un cultivo en agitación, un cultivo de aireación o similar. La temperatura de cultivo es de 20 a 40 °C y, preferiblemente, de 25 a 35 °C, el pH es de 5 a 8, y, preferiblemente, de 6 a 7, y el período de cultivo es de 1 a 4 días, y, preferiblemente, de 2 a 3 días.

Un "producto de cultivo" de acuerdo con la presente invención incluye un medio de cultivo, o una solución de cultivo que contiene células bacterianas después de un cultivo de un microorganismo de acuerdo con la presente invención, o un concentrado del mismo.

Una formulación microbiológica que contiene un microorganismo de acuerdo con la presente invención o un producto de cultivo del mismo puede usarse como, por ejemplo, un agente de control de enfermedades de las plantas, un agente de control de nematodos, y/o un agente estimulador del crecimiento de las plantas.

Una formulación microbiológica de acuerdo con la presente invención se aplica, preferiblemente, a una planta, y ejemplos específicos de la misma incluyen cultivos de cereales, tal como arroz, trigo y maíz; vegetales, tal como zanahoria, pepino, rábano japonés, calabaza, lechuga, berenjena, tomate, repollo, patata, repollo chino, margarita corona, espinaca mostaza japonesa, pimiento morrón, cebolla verde, cebolla, jengibre, ajo y fresa; hongos, tal como hongo shiitake; árboles frutales, tal como kaki, pera, mandarina naranja, uva, manzana y melocotón; flores y plantas decorativas, tal como crisantemo, tulipán y rosa; y judías, tal como soja, sésamo y cacahuete.

"Control de enfermedades de las plantas" significa en el presente documento una función de prevenir o curar una enfermedad de las plantas.

"Prevenir una enfermedad de las plantas" significa en el presente documento que la tasa de incidencia de una planta, a la que se aplicó un agente de control, es menor que la tasa de incidencia de una planta, a la que no se aplicó un agente de control, cuando se cultiva una planta, en el caso de una enfermedad del suelo, con un suelo que contiene un patógeno que puede infectar la planta durante un cierto período de tiempo. Entre tanto, en el caso de una enfermedad del tallo y las hojas, el término significa que la tasa de incidencia de una planta, a la que se aplicó un agente de control, es menor que la tasa de incidencia de una planta, a la que no se aplicó un agente de control, cuando a la planta se inocula un patógeno que puede infectarla y cultivarla durante un cierto período de tiempo. Adicionalmente, "curar una enfermedad de las plantas" significa que el grado de enfermedad de una planta, a la que se aplicó un agente de control, se mitiga en comparación con el grado de enfermedad de una planta, a la que no se aplicó un agente de control, cuando las plantas infectadas con una enfermedad se cultivan durante un cierto período de tiempo.

Aunque no existe una restricción particular sobre una "enfermedad de las plantas" de acuerdo con la presente invención, en la medida en que es una enfermedad de las plantas, sobre la cual un microorganismo de acuerdo con la presente invención puede ejercer un efecto de control, es preferible una enfermedad de las plantas causada por la infección de una planta con un patógeno, y es más preferible una enfermedad del tallo y las hojas y una enfermedad del suelo.

Los ejemplos de una enfermedad del tallo y las hojas como objetivo de control de acuerdo con la presente invención incluyen, aunque no de forma limitativa, una enfermedad de podredumbre, una enfermedad de la mancha de *Alternaria*, antracnosis, una enfermedad del añublo, una enfermedad del moho gris y una enfermedad de mildiu pulverulento.

Una enfermedad del suelo como objetivo de control de acuerdo con la presente invención es, preferiblemente, una enfermedad transmitida por el suelo, y más particularmente una enfermedad del suelo causada por uno o más de, aunque no de forma limitativa, un hongo del género *Fusarium*, un hongo del género *Gaeumannomyces*, un hongo del género *Rhizoctonia*, un hongo del género *Pythium*, un hongo del género *Verticillium*, un hongo del género *Phytophthora*, un hongo del género *Sclerotium*, un hongo del género *Corticium*, un hongo del género *Plasmodiophora*, un hongo del género *Rhizopus*, un hongo del género *Trichoderma*, un hongo del género *Microdochium* y un hongo del género *Sclerotinia*. Los ejemplos específicos de dicha enfermedad del suelo incluyen, aunque no de forma limitativa, una enfermedad del césped *Pythium* y una enfermedad de pudrición de la raíz de lechuga.

Aunque es preferible que el microorganismo se aplique a una planta antes de sufrir dicha enfermedad de las plantas para prevenirla, también se puede aplicar a una planta que padece la enfermedad de las plantas para curarla.

"Estimulación del crecimiento de las plantas" de acuerdo con la presente invención significa un efecto que conduce al aumento del rendimiento o la mejora de la calidad en los campos de la agricultura y la horticultura como resultado de la estimulación del aumento en el área de la hoja de una planta cultivada, aumento en el poder de la fotosíntesis, aumento de clorofila, aumento en el peso y grosor de un tallo y hoja terrestres, aumento en el peso de una parte subterránea (raíz, etc.), y aumento en el crecimiento de una raíz, y/o aumento en el número y peso de los granos y frutos, mediante un tratamiento de una planta con un microorganismo o una formulación microbiológica de acuerdo con la presente invención mediante un método, tal como una aplicación de un líquido en el terreno, una aplicación de un sólido en el terreno, una aplicación aérea de un líquido, una aplicación aérea de un sólido, una aplicación de superficie de agua, una solicitud dentro de la institución, una aplicación de incorporación en el suelo, una aplicación de riego en el suelo, un método de caja de vivero, un tratamiento de flores individual, un tratamiento de pie de planta, etc., o mediante un tratamiento superficial de una semilla o una patata de semilla para una planta cultivada (recubrimiento en polvo de una semilla, un tratamiento de inmersión, un tratamiento de pintura, etc.).

Los ejemplos específicos de patógenos de enfermedades que puede controlar un microorganismo de acuerdo con la presente invención incluyen, aunque no de forma limitativa, con respecto al arroz *Pyricularia oryzae*, *Cochliobolus miyabeanus*, *Rhizoctonia solani* y *Gibberella fujikuroi*; con respecto al trigo y la cebada, *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*, *Erysiphe graminis* f. sp. *tritici*, *Puccinia striiformis*, *Puccinia graminis*, *Puccinia recondita* f. sp. *tritici*, *Puccinia hordei*, *Gibberella zeae*, *Pyrenophorateres*, *Typhula incarnata*, *Typhula ishikariensis*, *Sclerotiniaborealis*, *Micronectriella nivalis*, *Ustilago nuda*, *Tilletia caries*, *Tilletia toetida*, *Tapesia yallundea*, *Phynchosporium secalis* f. sp. *hordei*, *Septoria tritici* y *Lentosphaeria nodorum*; con respecto a los cítricos *Diaporthe citri*, *Elsinoe fawcettii*, *Phytophthora citrophthora*, *Penicillium digitatum* y *Penicillium italicum*; con respecto a la manzana *Monilinia mali*, *Valsa ceratosperma*, *Podosphaera leucotricha*, *Alternaria alternata* apple pathotype, *Venturia inaequalis*, *Gymnosporangium yamadae*, *Botriophthora berengeriana* f. sp. *piricola*, *Zygophiala jamaicensis*, *Gloeodes pomigena*, *Mycosphaerella pomi*, *Glomerella cingulate* y *Diplocarpon mali*; con respecto a la pera *Venturia nashicola*, *Alternaria alternata* japonese pear pathotype, *Physalospora piricola* y *Gymnosporangium asiaticum*; con respecto al melocotón *Monilinia fructicola*, *Cladosporium carpophilum* y *Phomopsis* sp.; con respecto a la uva *Pseudocercospora vitis*, *Marssonina viticola*, *Elsinoe ampelina*, *Glomerella cingulata*, *Uncinula necator*, *Phakopsora ampelopsidis* y *Phomopsis* sp.; con respecto al kaki *Phyllactinia kagicola*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Cercospora kaki* y *Mycosphaerella nawae*; con respecto a la ciruela *Cladosporium carpophilum*; con respecto a la cereza *Monilinia fructicola*; con respecto a la calabaza *Sphaerotheca fuliginea*, *Didymella bryoniae* y *Colletotrichum legnarium*; con respecto al tomate *Alternaria solani* y *Cladosporium fulvum*; con respecto a la berenjena *Phomopsis vexans* y *Erysiphe cichoracearum*; con respecto a la verdura de la familia de brassicas *Alternaria japonica*, *Alternaria brassicae*, *Alternaria brassicicola*, y *Cercospora brassicae*; con respecto a la cebolla verde *Puccinia allii*; con respecto al jengibre *Pythium ultimum* y *Pythium ziziberis*; con respecto a la fresa *Sphaerotheca humuli* y *Glomerella cingulate*; con respecto a la soja *Cercospora kikuchii*, *Elsinoe glycines* y *Diaporthe phaseolorum* var. *sojae*; con respecto a la habichuela adzuki *Cercospora canescens* y *Uromyces phaseoli* var. *azukicola*; con respecto a la habichuela *Colletotrichum lindemuthianum*; con respecto al cacahuete *Cercosporidium personatum*, *Cercospora arachidicola* y *Shaceloma arachidis*; con respecto al guisante *Erysiphe pisi*; con respecto a la patata *Alternaria solani*; con respecto a la planta de té *Exobasidium reticulatum*, *Elsinoe leucospila*, *Pestalotiopsis theae* y *Pestalotiopsis longiseta*; con respecto al tabaco *Alternaria longipes*, *Erysiphe cichoracearum* y *Colletotrichum gloeosporioides*; con respecto a la remolacha *Cercospora beticola*; con respecto al césped *Curvularia geniculata* y *Ceratobasidium* spp.; con respecto a la rosa *Diplocarpon rosae* y *Sphaerotheca pannosa*; con respecto al crisantemo *Septoria obesa* y *Puccinia horiana*; y

con respecto a varias plantas de cultivo *Botrytis cinerea* y *Sclerotinia sclerotiorum*.

Los ejemplos de nematodos que puede controlar un microorganismo de acuerdo con la presente invención incluyen, aunque no de forma limitativa, especialmente los nematodos parásitos de plantas como los nematodos de los nudos de la raíz, tal como *Meloidogyne hapla*, *Meloidogyne incognita*, *Meloidogyne javanica*, y otras especies de *Meloidogyne*; nematodos formadores de quistes, tales como *Globodera roslochiensis* y otras especies de *Globodera*; *Heterodera avenae*, *Heterodera glicinas*, *Heterodera schachtii*, *Heterodera trifolii*, y otras especies de *Heterodera*; nematodos de agallas de semillas, tales como especies de *Anguina*; nematodos del tallo y las hojas, tales como especies de *Aphelenchoides*; nematodos punzantes, tales como *Belonolaimus longicaudatus* y otras especies de *Belonolaimus*; nematodos del pino, tales como *Bursaphelenchus xylophilus* y otras especies de *Bursaphelenchus*; nematodos de anillo, tal como especies de *Criconema*, especies de *Criconemella*, especies de *Criconemoides* y especies de *Mesocriconema*; nematodos del tallo y el bulbo, tal como *Ditylenchus destructor*, *Ditylenchus dipsaci* y otras especies de *Ditylenchus*; nematodos punzantes, tales como especies de *Dolichodorus*; nematodos espirales, tales como *Helicotylenchus multicinctus* y otras especies de *Helicotylenchus*; nematodos de la vaina y sheathoid, tales como especies de *Hemicyclophora* y especies de *Hemicriconemoides*; especies de *Hirshmanniella*; nematodos de lanza, tales como especies de *Hoploaimus*; falsos nematodos del nudo de la raíz, tales como especies de *Nacobbus*; nematodos de aguja, tales como *Longidorus alargados* y otras especies de *Longidorus*; nematodos del prado, tales como *Pratylenchus neglectus*, *Pratylenchus penetrans*, *Pratylenchus curvatus*, *Pratylenchus goodeyi* y otras especies de *Pratylenchus*; nematodos barrenadores, tales como *Radopholus similis* y otras especies de *Radopholus*; nematodos reniformes, tales como *Rotylenchus robustus* y otras especies de *Rotylenchus*; especies de *Scutellonema*; nematodos de raíces rechonchas (tricodóridos), tales como *Trichodorus primitivus*, otras especies de *Trichodorus* y *Paratrichodorus*; nematodos de atrofia, tales como *Tylenchorhynchus claytoni*, *Tylenchorhynchus dubius* y otras especies de *Tylenchorhynchus*; nematodos de los cítricos, tales como especies de *Tylenchulus*; y nematodos daga, tal como la especie *Xiphinema*.

Aunque es preferible que el microorganismo se aplique a una planta antes de que los nematodos se fijen a la planta para prevenir una enfermedad, también se puede aplicar a una planta que ha sido infectada con los nematodos para eliminar los nematodos.

Para una formulación microbiológica de acuerdo con la presente invención (agente de control de enfermedades de las plantas, agente de control de nematodos y agente estimulador del crecimiento de plantas), las células bacterianas y/o un producto de cultivo pueden usarse solos o se puede usar una preparación, en la que las mismas se diluyen con un líquido inerte o un soporte sólido, y al cual, si es necesario, se añaden un tensioactivo, un agente dispersante y otros agentes auxiliares. Los ejemplos específicos de la preparación incluyen formas de dosificación tales como una forma granular, una forma de polvo, una forma de polvo dispersable en agua, una forma de suspensión y una forma de emulsión.

Los ejemplos de un soporte incluyen soportes sólidos porosos, tales como talco, bentonita, caolín, arcilla, tierra de diatomeas, carbono blanco, vermiculita, cal apagada, sulfato de amonio, arena de sílice y urea, y vehículos líquidos, tales como agua, alcohol isopropílico, metil naftaleno, xileno, ciclohexanona y un alquilenglicol. Los ejemplos de un tensioactivo y un agente dispersante incluyen una sal de ácido dinaftil metanosulfónico, una sal de éster de ácido sulfúrico de alcohol, una sal de ácido lignina sulfónico, una sal de ácido alquilarilsulfónico, polioxietilenglicol éter, un monoalquilato de polioxietilensorbitán y un polioxietileno alquilariléter. Los ejemplos de un agente auxiliar incluyen carboximetilcelulosa, polietilenglicol, propilenglicol, goma arábica y goma xantana, y los ejemplos de un agente protector incluyen leche desnatada y un agente tampón de pH. En este caso, el contenido de células vivas de una cepa y/o el contenido del producto de cultivo, y también el tiempo de aplicación y la dosificación pueden determinarse apropiadamente después del caso de un solo uso de células vivas.

Los ejemplos de un vehículo líquido incluyen una solución tampón de fosfato, una solución tampón de carbonato y una solución salina fisiológica. Los ejemplos de un soporte sólido incluyen polvos minerales naturales, tales como caolín, arcilla, talco, creta, cuarzo, atapulgita, montmorillonita y tierra de diatomeas, polvos minerales sintéticos, tales como sílice, alúmina y silicato, y productos naturales macromoleculares, tales como celulosa cristalina, almidón de maíz, gelatina y ácido algínico. Los ejemplos de un tensioactivo incluyen un éster de ácido graso de polioxietileno, un éter de alcohol graso de polioxietileno, un alquilarilpoliglicoléter, un alquilsulfonato, un sulfato de alquilo y un sulfonato de arilo. Los ejemplos de un agente auxiliar incluyen carboximetilcelulosa, polioxietilenglicol, goma arábica, almidón y azúcar de leche.

Cuando se prepara una formulación líquida con un disolvente acuoso como vehículo, se puede añadir un polímero soluble en agua para mejorar la humectabilidad de una célula bacteriana en el disolvente. Los ejemplos de un polímero soluble en agua incluyen poli(alcohol vinílico), poli(etilenglicol), poli(vinilmetiléter), polivinilamina, polivinilpirrolidona, polietiliminina y poli(amida acrílica). Adicionalmente, un polisacárido, tal como xiloglucano y goma guar, se puede añadir para mejorar la adhesividad de *Pseudomonas rhodesiae* a la raíz de una planta y la estabilidad de *Pseudomonas rhodesiae* en una formulación.

Aunque no existe una restricción particular sobre la concentración de un microorganismo de acuerdo con la presente invención contenida en una formulación microbiológica de acuerdo con la presente invención en cuanto al efecto

como agente de control de enfermedades de las plantas, un agente de control de nematodos y/o un agente estimulador del crecimiento de las plantas no se ve afectado, la concentración en una formulación es de  $10^5$  a  $10^{13}$  ufc/g (unidad formadora de colonias), y, preferentemente, de  $10^7$  a  $10^{12}$  ufc/g. Lo mismo puede cambiarse apropiadamente dependiendo del efecto de control de un microorganismo usado de acuerdo con la presente invención, o la gravedad de una enfermedad.

Una formulación microbiológica de acuerdo con la presente invención puede contener una sustancia opcional, tal como un medio de cultivo utilizado para el cultivo de un microorganismo de acuerdo con la presente invención además de las sustancias anteriores, en la medida en que el efecto de la presente invención no se vea afectado.

Aunque no existe una restricción particular sobre un método de aplicación de una formulación microbiológica de acuerdo con la presente invención, se selecciona adecuadamente según el tipo de aplicación, tal como una forma de dosificación, un cultivo y una enfermedad. Los ejemplos de un método de aplicación incluyen la aplicación al suelo de un líquido, aplicación al suelo de un sólido, aplicación aérea de un líquido, aplicación aérea de un sólido, aplicación superficial de agua, aplicación dentro de la institución, aplicación de incorporación en el suelo, aplicación de riego en el suelo, tratamiento superficial (recubrimiento de semillas en polvo, tratamiento de pintura, etc.), un método de caja de vivero, un tratamiento de flores individual y un tratamiento de pie de planta, y los ejemplos de un método preferible incluyen un método en el que la formulación microbiológica de cualquiera de las diversas formas de dosificación se recubre sobre una semilla o una patata de semilla de una planta para cultivar, un método en el que una flor individual de una planta cultivada se trata con la formulación, un método en el que el tallo y la hoja de una planta cultivada se tratan con la formulación, un método en el que un sitio de la herida o una parte recortada de una planta cultivada se recubre con la formulación, un método de riego del suelo y un método de mezcla del suelo. En este sentido, cuando se aplica una formulación al suelo, se puede plantar una planta cultivada después de aplicar una formulación microbiológica de acuerdo con la presente invención al suelo, o se puede aplicar una formulación microbiológica de acuerdo con la presente invención al suelo, después de plantar una planta cultivada.

Una formulación microbiológica de acuerdo con la presente invención se rocía preferiblemente sobre un tallo y una hoja para controlar una enfermedad del tallo y la hoja. Una formulación microbiológica de acuerdo con la presente invención se rocía o irriega preferiblemente para controlar una enfermedad del suelo.

Una formulación microbiológica de acuerdo con la presente invención (agente de control de enfermedades de las plantas, agente de control de nematodos y agente estimulador del crecimiento de plantas) puede contener, si es necesario, un principio activo distinto de un principio activo de acuerdo con la presente invención, por ejemplo, un agente insecticida, otro agente bactericida, un agente herbicida, un agente regulador del crecimiento de las plantas y un fertilizante.

Los ejemplos de un componente bactericida incluyen, aunque no de forma limitativa, bitertanol, bromuconazol, ciproconazol, difenoconazol, diniconazol, enilconazol, epoxiconazol, fluquinconazol, fenbuconazol, flusilazol, flutriafol, hexaconazol, imibenconazol, ipconazol, metconazol, miclobutanilo, penconazol, propiconazol, protioconazol, simeconazol, triadimefón, triadimenol, tebuconazol, tetraconazol, triticonazol, procloraz, pefurazoato, imazalilo, triflumizol, cyazofamid, benomilo, carbendazima, tiabendazol, fuberidazol, etaboxam, etridiazol, ácido fumárico de oxipoconazol, himexazol, azoxistrobina, dimoxistrobina, enestrobirina, fluoxastrobina, kresoxim-metilo, metominostrobin, orzastrobina, picoxistrobina, piraclostrobin, trifloxistrobina, carboxina, benalaxilo, boscalid, bixafen, fenhexamid, flutolanilo, furametpir, mepronilo, metalaxilo, mephenoxam, ofurace, oxadixilo, oxicarboxina, pentiopirad, tifulzamida, tianidilo, dimetomorf, flumorf, flumetover, fluopicolida, carpropamid, diclocimet, mandipropamida, fluazinam, pirifenox, bupirimato, ciprodinilo, fenarimol, ferimzona, mepanipirim, nuarimol, pirimetanilo, triforina, fenciclonilo, fludioxonilo, aldimofo, dodemofo, fenpropimorfo, tridemorfo, fenpropidina, iprodiona, procimidona, vinclozólín, famoxadona, fenamidona, octiliona, probenazol, anilazina, diclomezina, piroquilón, proquinazid, triciclazol, captafol, captano, dazomet, folpet, fenoxanilo, quinoxifen, amisulbrom, manzeb, maneb, metam, metiram, ferbam, propineb, tiuram, zineb, ziram, dietofencarb, iprovalicarb, bentiavalicarb-isopropilo, clorhidrato de propamocarb, tiofanato-metilo, piribencarb, mezcla de Burdeos, cloruro de cobre básico, sulfuro de cobre básico, hidróxido cúprico, cobre 8-hidroxiquinolina, dodina, iminoctadina albesilato, acetato de iminoctadina, guazatina, kasugamicina, estreptomycin, polioxina, oxitetraciclina, validamicina A, binapacril, dinocap, dinobuton, ditianona, isoprotiolo, edifenfos, iprobenfos, fosetilo, fosetil aluminio, pirazofos, tolclofos-metilo, clorotalonilo, diclofluanida, flusulfamida, hexaclorobenceno, ftalida, pencicurón, quintoceno, ciflufenamid, cimoxanilo, dimetirimol, etirimol, furalaxilo, metrafenona, espiroxamina, amobam, azufre, azufre de cal, eclomezol, bicarbonato potásico, bicarbonato de calcio, tiadiazina, tecloftalam, triazina, nonilfenol sulfonato de cobre, hidroxisoxazol, fluoroimida, policarbamato, metasulfocarb, EDDP, IBP, tolfenpirad, fluopiram, isotianil e isopirazam.

Los ejemplos de un componente insecticida incluyen, aunque no de forma limitativa, acetamiprid, pimetozina, fenitrotion, acefato, carbarilo, metomilo, cartap, cihalotrina, etofenprox, teflubenzurón, flubendiamida, flufenoxuron, tebufenozida, fenpiroximato, piridaben, imidacloprid, buprofezina, BPMC, MIPC, malatión, metidatión, fentión, daiazinon, oxideprofos, vamidotión, etiofencarb, pirimicarb, permetrina, cipermetrina, bifentrina, halfenprox, silafluofeno, nitenpiram, clorfluazurón, metoxifenozida, tebufenpirad, pirimidifen, keltano, propargita, hexitiazox, clofentezina, espinosad, milbemectina, BT (*Bacillus thuringiensis*), indoxacarb, metaflumizona, clorfenapir, fipronilo, etoxazol, acequinocilo, pirimifos-metilo, acrinatrina, quinometionato, clorpirifos, abamectina, emamectina benzoato,

óxido de fenbutatina, terbufos, etoprofos, cadusafos, fenamifos, fensulfotión, DSP, diclofentión, fostiazato, oxamilo, isoamidofos, fostietan, isazofos, tionazina, benfuracarb, espiroclorfenol, etiofencarb, azinfos-metilo, disulfotón, metiocarb, oxidemetón-metilo, paratión, ciflutrina, beta-ciflutrina, tebupirimfos, espiromesifen, endosulfano, amitraz, tralometrino, acetoprol, etiprol, etión, triclorfón, metamidofos, diclorvos, mevinfos, monocrotofos, dimetoato, 5 formetanato, formotión, mecarbam, tiometón, disulfotón, naled, metil paratión, cianofos, diamidafos, albendazol, oxibendazol, fenbendazol, oxfendazol, propafos, sulprofos, protiofos, profenofos, isofenfos, temefos, fentoato, dimetilvinfos, clorfenvinfos, tetraclorvinfos, foxim, isoxatión, piraclafos, clorpirifos, piridafentión, fosadona, fosmet, dioxabenzofos, quinalfos, piretrina, aletrina, praletrina, resmetrina, permectrina, teflutrina, fenpropatrino, alfa-cipermetrina, lambda-cihalotrina, delta-metrino, fenvalerato, esfenvalerato, flucirinato, fluvalinato, cicloprotrino, 10 tiodicarb, aldicarb, alanycarb, metolcarb, xililcarb, propoxur, fenoxicarb, fenotiocarbo, bifenazato, carbofurano, carbosulfán, azufre, pirifluquinazon, furatiocarbo, diafentiuorón, diflubenzurón, hexaflumurón, novalurón, lufenurón, clorfluazurón, hidróxido de triciclohexil-estaño, oleato sódico, oleato de potasio, metopreno, hidropreno, binapacril, amitraz, clorobencilato, fenisobromolato, tetradifon, bensultap, benzomato, cromafenozida, halofenozida, endosulfano, diofenolan, tolfenpirad, triazamato, sulfato de nicotina, tiacloprid, tiametoxam, clotianidina, dinotefurano, 15 fluzinam, piriproxifeno, fluacipirim, hidrametilnon, cimazina, TPIC, tiociclam, fenazaquina, un complejo de polinactina, azadiractina, rotenona, hidroxipropil almidón, mesulfenfos, fosfocarb, isoamidofos, aldoxicarb, metam sodio, tartrato de morantel, dazomet, clorhidrato de levamisol, triclamida, tolfenpirad, piridalilo, clorantraniliprol, cienopirafen y ciflumetofen.

## 20 [Ejemplos]

Se aislaron microorganismos de un suelo, incluidas las raíces de las plantas recolectadas en Japón. De manera específica, se suspendió 1 g de suelo seco obtenido mediante un tratamiento térmico (80 °C, 10 min) del suelo 25 recogido en agua esterilizada. La suspensión se diluyó  $10^2$  a  $10^4$  veces y se sometió a un cultivo de aislamiento (28 °C, 3 días) con un agar nutriente (Eiken Chemical Co., Ltd.), y luego se aislaron las colonias formadas. De las colonias aisladas, se identificaron cepas que tienen efectividad sobre varios patógenos de plantas diferentes en un agar patata-dextrosa. Como los resultados, se obtuvieron 4 tipos de microorganismos y se designaron ITB090 (NITE BP-01725), ITB100 (NITE BP-01726), ITB105 (NITE BP-01727) e ITB117 (NITE P01728) respectivamente. La 30 secuencia de un gen de ARNr 16S con respecto a cada uno de los microorganismos se examinó para el análisis filogenético, y todos ellos se identificaron como *Bacillus* sp.

Los microorganismos se evaluaron con respecto a la actividad de control de enfermedades de las plantas, actividad nematocida y efecto de estimulación del crecimiento de las plantas de acuerdo con los siguientes procedimientos.

### 35 Ejemplo 1

Prueba *in vitro* para el efecto de control de enfermedades de las plantas

#### 40 (1) Método de cultivo para diversas bacterias

Con respecto a cada una de las cepas ITB090 (NITE BP-01725), ITB100 (NITE BP-01726), ITB105 (NITE BP-01727) y ITB117 (NITE P-01728), se inoculó un bucle de células bacterianas conservadas en un matraz Erlenmeyer de 500 ml con un deflector que contenía 60 ml de un caldo nutritivo (Eiken Chemical Co., Ltd.), y el contenido se cultivó con 45 agitación mediante un agitador rotatorio a una velocidad de rotación de 180 rpm, a 28 °C durante 2 días. La solución de cultivo obtenida se diluyó con agua esterilizada a  $5 \times 10^7$  ufc/ml y se sometió a una prueba de cultivo dual.

#### (2) Método de cultivo dual

En el borde de una placa que contiene un agar de patata-dextrosa, se inocularon 20 µl de cada una de las 50 soluciones de cultivo diluidas. Las hifas de varios patógenos de plantas (enfermedad de la podredumbre: *Rhizoctonia solani*, enfermedad de la mancha de Alternaria: *Alternaria mali*, antracnosis: *Glomerella cingulate*, enfermedad del añublo: *Pyricularia oryzae* y enfermedad de moho gris: *Botrytis cinerea*) cultivadas de antemano se sacaron junto con un medio de cultivo perforando con un taladro de corcho de 5 mm de diámetro y se inocularon en el centro de la placa. La placa se incubó a 25 °C durante de 2 a 5 días, y se observó una acción antagonista o la 55 formación de una zona de inhibición con respecto a cada uno de los diversos patógenos.

#### (3) Método de investigación

60 Cuando se observó una acción antagonista o la formación de una zona de inhibición con respecto a cada uno de los diversos patógenos, se indicó como "+", y cuando no se observó lo mismo, se indicó como "-".

#### (4) Resultados

65 Los resultados de la investigación se muestran en la Tabla 1. Ha quedado claro que la nueva cepa de acuerdo con la presente invención (ITB105, NITE BP-01727) así como las cepas de la presente divulgación, a saber, ITB090 (NITE BP-01725), ITB100 (NITE BP-01726) e ITB117 (NITE P-01728) tienen actividad de control sobre los patógenos

probados.

[Tabla 1]

	Podredumbre	Mancha de Alternaria	Antracnosis	Añublo	Moho gris
ITB090	+	+	+	+	+
ITB100	+	+	+	+	+
ITB105	+	+	+	+	+
ITB117	-	+	+	-	-

Ejemplo 2

5

Prueba del efecto de control sobre la enfermedad del moho gris del pepino (*Botrytis cinerea*)

(1) Método de cultivo de diversas bacterias

- 10 Con respecto a cada una de las cepas ITB090 (NITE BP-01725), ITB100 (NITE BP-01726), ITB105 (NITE BP-01727) y ITB117 (NITE P-01728), se inoculó un bucle de células bacterianas conservadas en un matraz Erlenmeyer de 500 ml con un deflector que contenía 60 ml de un caldo nutritivo (Eiken Chemical Co., Ltd.), y el contenido se cultivó con agitación mediante un agitador rotatorio a una velocidad de rotación de 180 rpm, a 28 °C durante 2 días. La solución de cultivo obtenida se diluyó con agua esterilizada a  $5 \times 10^7$  ufc/ml y se sometió a una prueba siguiente. Como
- 15 referencia, *Bacillus subtilis* MBI600 (comprado y aislado de Botokiller Wettable Powder (Idemitsu Kosan Co., Ltd.)) se cultivó de forma idéntica.

(2) Método de tratamiento

- 20 Una hoja de semilla de pepino completamente expandida (Tokiwa-Hikari No. 3, Tipo P) se cortó en un hipocótilo, y la superficie de corte se puso en contacto con una toalla de papel húmeda. Se preparó un inóculo suspendiendo esporas de un hongo de la enfermedad del moho gris cultivado en un medio PSA en 5 ml de un medio PS. Al centro de la hoja de semilla, se dejaron caer 50 µl de la suspensión de esporas de bacterias de la enfermedad del moho
- 25 gris. En una gota de agua formada al caer, se colocó un trozo de discos de papel (discos de papel para análisis de antibióticos, tipo grueso, 8 mmΦ, Toyo Roshi Kaisha, Ltd.) al que se dejaron caer 50 µl de un agente de prueba (una suspensión celular con una concentración de  $5 \times 10^7$  ufc/ml) y la muestra se almacenó cuidadosamente en una cámara húmeda a 25 °C.

(3) Método de investigación

30

Apareció un área de lesión en la hoja de pepino el día 3 después de examinar la inoculación, y se determinó un valor preventivo de acuerdo con la siguiente fórmula (1):

$$\text{Valor preventivo} = \{1 - (\text{área de la lesión en la región tratada} / \text{área de la lesión en la región no tratada})\} \times 100$$

Fórmula (1)

35

[Tabla 2]

	Valor preventivo
ITB090	100
ITB100	100
ITB105	96
ITB117	98
MBI600	80

- 40 Como es obvio a partir de los resultados mostrados en la Tabla 2, la tasa de incidencia de una enfermedad de moho gris de pepino debido a *Botrytis cinerea* se redujo notablemente mediante un tratamiento con un microorganismo de acuerdo con la presente invención (ITB105, NITE BP-01727), así como los microorganismos de la presente divulgación, a saber, ITB090 (NITE BP-01725), ITB100 (NITE BP-01726) e ITB117 (NITE P-01728), en comparación con un control no tratado, y se obtuvo un efecto de control extremadamente alto en comparación con la cepa *Bacillus subtilis* MBI600.

45 Ejemplo 3

Efecto de control de nematodos

(1) Método de cultivo de diversas bacterias

50

Con respecto a cada una de las cepas ITB090 (NITE BP-01725), ITB100 (NITE BP-01726), ITB105 (NITE BP-01727)

y ITB117 (NITE P-01728), se inoculó un bucle de células bacterianas conservadas en un matraz Erlenmeyer de 500 ml con un deflector que contenía 60 ml de un caldo nutritivo (Eiken Chemical Co., Ltd.), y el contenido se cultivó con agitación mediante un agitador rotatorio a una velocidad de rotación de 180 rpm, a 28 °C durante 2 días. La solución de cultivo obtenida se diluyó con agua esterilizada a  $5 \times 10^7$  ufc/ml y se sometió a una prueba.

5 Como caso de referencia, Una cepa de *Bacillus subtilis* MBI600 (comprada y aislada de Botokiller Wettable Powder (Idemitsu Kosan Co., Ltd.)) se cultivó de forma idéntica y se usó para la prueba.

10 (2) Método de prueba para la actividad nematocida

Se probó la actividad nematocida en una larva de segunda etapa de un nematodo del nudo de la raíz de batata (*Meloidogyne incognita*) eclosionado dentro de las 24 horas a partir de una cápsula de huevo recolectada de una raíz de tomate. Se añadieron a una microplaca soluciones de cultivo diluidas de varias bacterias y equivalentes de una suspensión de larvas de segunda etapa de nematodos del nudo de la raíz (aproximadamente 50 gusanos).  
 15 Como agente comparativo, se analizó una suspensión de *Bacillus subtilis* MBI600 (comprada y aislada de Botokiller Wettable Powder (Idemitsu Kosan Co., Ltd.)) diluida de forma idéntica. La placa se cerró herméticamente y se colocó en una incubadora a 28 °C y una humedad relativa de aproximadamente 50 %

20 (3) Método de investigación

Tras 72 horas, la tasa de mortalidad del nematodo se investigó mediante observación bajo un microscopio estereoscópico. Al hacerlo, los nematodos inmóviles se consideraron muertos. La tasa nematocida se calculó de acuerdo con la siguiente fórmula (2):

25 Tasa nematocida (%) = (Número de nematodos muertos/Número de nematodos probados) × 100      Fórmula (2)

(4) Resultados

30 Como es obvio a partir de los resultados mostrados en la Tabla 3, se obtuvieron actividades nematocidas muy altas en las larvas de la segunda etapa del nematodo del nudo de la raíz de la batata mediante un tratamiento con un microorganismo de acuerdo con la presente invención (ITB105, NITE BP-01727) así como mediante un tratamiento con un microorganismo de acuerdo con la presente divulgación, a saber, ITB090 (NITE BP-01725), ITB100 (NITE BP-01726) e ITB117 (NITE P-01728), en comparación con la cepa *Bacillus subtilis* MBI600.

[Tabla 3]

	% Tasa nematocida
ITB090	100
ITB100	100
ITB105	60
ITB117	50
MBI600	10

Ejemplo 4

40 Prueba de efecto controlador sobre el nematodo del nudo de la raíz de la batata

(1) Método de cultivo de diversas bacterias

45 Con respecto a cada una de las cepas ITB090 (NITE BP-01725), ITB100 (NITE BP-01726), ITB105 (NITE BP-01727) y ITB117 (NITE P-01728), se inoculó un bucle de células bacterianas conservadas en un matraz Erlenmeyer de 500 ml con un deflector que contenía 60 ml de un caldo nutritivo (Eiken Chemical Co., Ltd.), y el contenido se cultivó con agitación mediante un agitador rotatorio a una velocidad de rotación de 180 rpm, a 28 °C durante 2 días. La solución de cultivo obtenida se diluyó con agua esterilizada a  $5 \times 10^7$  ufc/ml y se sometió a una prueba siguiente. Como referencia, la cepa de *Bacillus subtilis* MBI600 (comprada y aislada de Botokiller Wettable Powder (Idemitsu Kosan Co., Ltd.)) se cultivó de forma idéntica.

50 (2) Método de tratamiento

55 La solución de cultivo obtenida se diluyó con agua esterilizada a  $1 \times 10^7$  ufc/ml y semillas de pepino (Tokiwa-Hikari No. 3, Tipo P) se sumergieron en el mismo durante 30 minutos y luego se sembraron en una maceta Wagner de 1/10000a llena de tierra contaminada con nematodos del nudo de la raíz a una densidad de aproximadamente 3,3 nematodos del nudo de la raíz por 20 g de suelo seco.

(3) Método de investigación

El grado de infestación de los nudos de raíz se evaluó de acuerdo con los siguientes valores de clase clasificados por el grado de daño de una raíz (grado de nudo de raíz) después de 1 mes de la siembra de acuerdo con un método de Zeck (Zeck, W. M. (1971): Pflanzenschutz-Nachrichten, Bayer AG, 24, 141-144).

- 0: El nudo de la raíz no se reconoce en absoluto.
- 1: Los nudos de la raíz se reconocen por observación cuidadosa.
- 2: Varios pequeños nudos de la raíz, como 1 anterior, son fácilmente reconocibles.
- 3: Hay una gran cantidad de pequeños nudos de la raíz, y algunos de los cuales se han fusionado. La función de las raíces casi no se ha deteriorado.
- 4: Hay una gran cantidad de nudos de la raíz pequeños, y hay algunos nudos de la raíz grandes. La mayoría de las raíces están funcionando.
- 5: Los nudos de la raíz se han desarrollado notablemente en el 25 % de las raíces, y las raíces no funcionan.
- 6: Los nudos de la raíz se han desarrollado notablemente en el 50 % de las raíces, y las raíces no funcionan.
- 7: Los nudos de la raíz se han desarrollado notablemente en el 75 % de las raíces, y la capacidad regenerativa de las raíces se ha perdido.
- 8: No hay una raíz sólida y la absorción de nutrientes de la planta ha sido inhibida. La parte del tallo y la hoja todavía son verdes.
- 9: El sistema radicular completamente cubierto con nudos de la raíz está decayendo. La planta se está muriendo.
- 10: La planta y las raíces han muerto.

Se determinó un índice de nudo la raíz de acuerdo con la siguiente Fórmula (3):

$$\text{Índice raíz-nudo} = \frac{\sum (\text{Grado de daño} \times \text{Número de individuos})}{(\text{Número total de individuos investigados} \times 10)} \times 100$$

Fórmula (3)

Basado en el grado evaluado de desarrollo de los nudos de la raíz, se calculó un valor preventivo de acuerdo con la siguiente fórmula (4):

$$\text{Valor preventivo} = 100 - \left( \frac{\text{Índice del nudo de la raíz en caso tratado}}{\text{Índice del nudo de la raíz en caso no tratado}} \right) \times 100$$

Fórmula (4)

[Tabla 4]

	Índice del nudo de la raíz	Valor preventivo
Sin tratamiento	44,2	-
ITB090	18,0	59,4
ITB100	14,8	66,4
ITB105	18,6	57,9
ITB117	19,4	56,1
MBI600	21,9	50,4

Como es obvio a partir de los resultados mostrados en la Tabla 4, el índice de nudo de raíz debido a un nematodo de nudo de raíz de batata se redujo notablemente mediante un tratamiento con un microorganismo de acuerdo con la presente invención (ITB105, NITE BP-01727) así como mediante un tratamiento con un microorganismo según la presente divulgación, a saber, ITB090 (NITE BP-01725), ITB100 (NITE BP-01726) e ITB117 (NITE P-01728), en comparación con un caso no tratado, y se obtuvo un efecto de control extremadamente alto en comparación con la cepa *Bacillus subtilis* MBI600.

Ejemplo 5

Efecto de estimulación del crecimiento de la planta

(1) Método de cultivo de diversas bacterias

Con respecto a cada una de las cepas ITB090 (NITE BP-01725), ITB100 (NITE BP-01726), ITB105 (NITE BP-01727) y ITB117 (NITE P-01728), se inoculó un bucle de células bacterianas conservadas en un matraz Erlenmeyer de 500 ml con un deflector que contenía 60 ml de un caldo nutritivo (Eiken Chemical Co., Ltd.), y el contenido se cultivó con agitación mediante un agitador rotatorio a una velocidad de rotación de 180 rpm, a 28 °C durante 2 días. Como referencia, *Bacillus subtilis* MBI600 (comprado y aislado de Botokiller Wettable Powder (Idemitsu Kosan Co., Ltd.)) se cultivó de forma idéntica.

(2) Métodos de tratamiento del método de tratamiento de bacterias respectivas para el trigo

La solución de cultivo obtenida se diluyó con agua esterilizada a  $1 \times 10^7$  ufc/ml, y las semillas de trigo se sumergieron en ella durante 30 minutos, y luego se sembraron en una maceta llena con un suelo de vivero.

5 Método de tratamiento para *Arabidopsis thaliana*

*Arabidopsis thaliana* se sembró en una maceta llena con tierra de vivero, y luego la solución de cultivo obtenida se diluyó con agua esterilizada a  $1 \times 10^7$  ufc/ml, y se regaron 5 ml de la misma.

10 Método de tratamiento para maíz

La solución de cultivo obtenida y las semillas de maíz se mezclaron a  $1 \times 10^8$  ufc por 1 g de semillas, para aplicar cada una de las soluciones de cultivo a las semillas. Las semillas tratadas se sembraron en una maceta llena de tierra de vivero.

15 Método de tratamiento para soja

La solución de cultivo obtenida y las semillas de soja se mezclaron a  $1 \times 10^7$  ufc por 1 g de semillas, para aplicar cada una de las soluciones de cultivo a las semillas. Las semillas tratadas se sembraron en una maceta llena de tierra de vivero.

20 (3) Método de investigación

25 Trigo: El peso terrestre por planta se midió 3 semanas después de la siembra.

*Arabidopsis thaliana*: El área foliar por planta se midió 3 semanas después de la siembra.

30 Maíz: El peso terrestre por planta se midió 4 semanas después de la siembra.

Soja: El peso terrestre por planta se midió 4 semanas después de la siembra.

Se calcularon cantidades aumentadas con respecto al control no tratado.

35 (4) Resultados

Los resultados se muestran en la Tabla 5 siguiente. Con respecto a todas las plantas, el crecimiento de la planta se estimuló notablemente mediante un tratamiento de cada cepa en comparación con el control no tratado, y se exhibieron efectos de estimulación del crecimiento extremadamente superiores a los de la cepa *Bacillus subtilis* MBI600.

[Tabla 5-1]

Trigo: Peso húmedo (%) en relación con el control no tratado

Cepa	Trigo
ITB090	122 %
ITB100	134 %
ITB105	131 %
ITB117	117 %
MBI600	108 %

[Tabla 5-2]

*Arabidopsis thaliana*: Área foliar (%) en relación con el control no tratado

Cepa	<i>Arabidopsis thaliana</i>
ITB090	117 %
ITB100	122 %
ITB105	120 %
ITB117	114 %
MBI600	112 %

[Tabla 5-3]

Maíz: Peso húmedo (%) en relación con el control no tratado

Cepa	Maíz
ITB090	106 %
ITB100	131 %
ITB105	144 %
ITB117	108 %
MBI600	104 %

[Tabla 5-4]

5

Soja: Peso húmedo (%) en relación con el control no tratado

Cepa	Soja
ITB090	105 %
ITB100	125 %
ITB105	130 %
ITB117	125 %
MBI600	102 %

10 **LISTADO DE SECUENCIAS**

<110> Idemitsu Kosan Co., Ltd. SDS Biotech K.K.

15

<120> NUEVO MICROORGANISMO Y USO DEL MISMO

<130> Z1603 EP S3

<140> EP14854641.9

<141> 14/10/2014

20

<150> JP2013-216834

<151> 17/10/2013

<160> 4

25

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 1511

30

<212> ADN

<213> Bacillus sp. ITB090

<400> 1

35

```

gagtttgatc ctggctcagg atgaacgctg gcggcgtgcc taatacatgc aagtcgagcg      60
aaccgattaa gagcttgctc ttaagaagtt agcggcggac gggtgagtaa cacgtaggta      120
acctgcctat aagactggga taactccggg aaaccggggc taataccgga taacattttg      180
caccgcatgg tgcgaaattg aaaggcggct tcggctgtca cttatagatg gacctgcggc      240
gcattagcta gttggtgagg taacggctca ccaaggcgac gatgcgtagc cgacctgaga      300
gggtgatcgg ccacactggg actgagacac ggcccagact cctacgggag gcagcagtag      360
ggaatcttcc gcaatggacg aaagtctgac ggagcaacgc cgcgtgagcg atgaaggcct      420
tcgggtcgta aagctctggt gttagggaag aacaagtgct agttgaataa gctggcacct      480
tgacggtacc taaccagaaa gccacggcta actacgtgcc agcagccgcy gtaatacgta      540
ggtggcaagc gttatccgga attattgggc gtaaagcgcg cgcaggtggt ttcttaagtc      600
tgatgtgaaa gccacggct caaccgtgga gggtcattgg aaactgggag acttgagtgc      660
agaagaggaa agtgggaattc catgtgtagc ggtgaaatgc gtagagatat ggaggaacac      720
    
```

ES 2 775 191 T3

cagtggcgaa	ggcgactttc	tggtctgcaa	ctgacactga	ggcgcgaaa	cgtggggagc	780
aaacaggatt	agataccctg	gtagtccacg	ccgtaaaccga	tgagtgctaa	gtgtagagg	840
gtttccgccc	tttagtgctg	aagttaacgc	attaagcact	ccgcctgggg	agtacggccg	900
caaggctgaa	actcaaagga	attgacgggg	gcccgcacaa	gcggtggagc	atgtgggtta	960
attcgaagca	acgcgaagaa	ccttaccagg	tcttgacatc	ctctgacaac	cctagagata	1020
gggcttcccc	ttcgggggca	gagtgcacag	tggtgcatgg	ttgtcgtcag	ctcgtgtcgt	1080
gagatgttgg	gttaagtccc	gcaacgagcg	caacccttga	tcttagttgc	catcattaag	1140
ttgggcactc	taaggtgact	gccggtgaca	aaccggagga	aggtggggat	gacgtcaaat	1200
catcatgccc	cttatgacct	gggctacaca	cgtgctacaa	tggacggtac	aaagagtcgc	1260
aagaccgcga	ggtggagcta	atctcataaa	accgttctca	gttcggattg	taggtgcaa	1320
ctcgcctaca	tgaagctgga	atcgctagta	atcgcggatc	agcatgccgc	ggtgaatcgc	1380
ttcccgggcc	ttgtacacac	cgcccgtcac	accacgagag	tttgtaacac	ccgaagtccg	1440
tggggtaacc	ttttggagcc	agccgcctaa	ggtgggacag	atgattgggg	tgaagtcgta	1500
acaaggtagc	c					1511

<210> 2  
 <211> 1510  
 <212> ADN  
 <213> Bacillus sp. ITB100

5

<400> 2

gagtttgatc	ctggctcagg	acgaacgctg	gcccgcgtcc	taatacatgc	aagtcgagcg	60
gacagatggg	agcttgctcc	ctgatgtag	cggcggacgg	gtgagtaaca	cgtgggtaac	120
ctgcctgtaa	gactgggata	actccgggaa	accggggcta	ataccggatg	gttgtytgaa	180
ccgcatgggt	cagacataaa	aggtggcttc	ggctaccact	tacagatgga	cccgcggcgc	240

10

attagctagt	tggtgaggta	acggctcacc	aaggcgacga	tgcgtagccg	acctgagagg	300
gtgatcggcc	acactgggac	tgagacacgg	cccagactcc	tacggggaggc	agcagtaggg	360
aatcttccgc	aatggacgaa	agtctgacgg	agcaacgccg	cgtgagtgat	gaaggttttc	420
ggatcgtaaa	gctctgttgt	tagggaagaa	caagtgccgt	tcaaataagg	cggcaccttg	480
acggtacct	accagaaagc	cacggctaac	tacgtgccag	cagccgcggt	aatacgtagg	540
tggcaagcgt	tgtccggaat	tattgggctg	aaagggtcgc	cagggcggtt	cttaagtctg	600
atgtgaaagc	ccccggctca	accggggagg	gtcattggaa	actggggaac	ttgagtgcag	660
aagaggagag	tggaattcca	cgtgtagcgg	tgaaatgcgt	agagatgtgg	aggaacacca	720
gtggcggaagg	cgactctctg	gtctgtaact	gacgctgagg	agcgaagcgc	tggggagcga	780
acaggattag	ataccctggg	agtccacgcc	gtaaacgatg	agtgctaagt	gttagggggg	840
ttccgcccct	tagtgctgca	gctaacgcat	taagcactcc	gcctggggag	tacggtcgca	900
agactgaaac	tcaaaggaat	tgacgggggc	ccgcacaagc	ggtggagcat	gtggtttaat	960
tcaagcaaac	gcgaagaacc	ttaccaggtc	ttgacatcct	ctgacaatcc	tagagatagg	1020
acgtcccctt	cgggggcaga	gtgacaggtg	gtgcatgggt	gtcgtcagct	cgtgtcgtga	1080
gatgttgggt	taagtcccgc	aacgagcgca	acccttgatc	ttagttgcca	gcattcagtt	1140
gggcaactca	aggtgactgc	cggtgacaaa	ccggaggaag	gtggggatga	cgtcaaatca	1200
tcatgcccct	tatgacctgg	gctacacacg	tgctacaatg	gacagaacaa	agggcagcga	1260
aaccgcgagg	ttaagccaat	cccacaaatc	tgttctcagt	tcggatcgca	gtctgcaact	1320
cgactgcgtg	aagctggaat	cgctagtaat	cgcggatcag	catgccgcgg	tgaatacgtt	1380
cccgggcctt	gtacacaccg	cccgtcacac	cacgagagtt	tgtaacaccc	gaagtccgtg	1440
aggtaacctt	tatggagcca	gccgccgaag	gtgggacaga	tgattggggg	gaagtcgtaa	1500
caaggtagcc						1510

<210> 3  
 <211> 1510  
 <212> ADN  
 <213> Bacillus sp. ITB105

15

<400> 3

ES 2 775 191 T3

gagtttgatc	ctggctcagg	acgaacgctg	gcggcgtgcc	taatacatgc	aagtcgagcg	60
gacagatggg	agcttgctcc	ctgatgtag	cggcggacgg	gtgagtaaca	cgtgggtaac	120
ctgcctgtaa	gactgggata	actccgggaa	accggggcta	ataccggatg	gttgtttgaa	180
ccgcatggtt	caaacataaa	aggtggcttc	ggctaccact	tacagatgga	cccgcggcgc	240
attagctagt	tggtgaggta	acggctcacc	aaggcaacga	tgcgtagccg	acctgagagg	300
gtgatcggcc	acactgggac	tgagacacgg	cccagactcc	tacgggaggc	agcagtaggg	360
aatcttccgc	aatggacgaa	agtctgacgg	agcaacgccg	cgtgagtgat	gaaggttttc	420
ggatcgtaaa	gctctgttgt	tagggaagaa	caagtaccgt	tcgaataggg	cggtagcttg	480
acggtacct	accagaaagc	cacggctaac	tacgtgccag	cagccgcggt	aatacgtagg	540
tggcaagcgt	tgtccggaat	tattgggcgt	aaaggctcg	caggcggttt	cttaagtctg	600
atgtgaaagc	ccccggctca	accggggagg	gtcattggaa	actggggaac	ttgagtgcag	660
aagagagag	tggaattcca	cgtgtagcgg	tgaaatgcgt	agagatgtgg	aggaacacca	720
gtggcgaagg	cgactctctg	gtctgtaact	gacgctgagg	agcgaagcgg	tggggagcga	780
acaggattag	ataccctggg	agtccacgcc	gtaaaccgatg	agtgctaagt	gtaggggggt	840
ttccgcccct	tagtgctgca	gctaaccgat	taagcactcc	gcctggggag	tacggtagca	900
agactgaaac	tcaaaggaat	tgacgggggc	ccgcacaagc	ggtggagcat	gtggtttaat	960
tcgaagcaac	gcgaagaacc	ttaccaggtc	ttgacatcct	ctgacaatcc	tagagatagg	1020
acgtcccctt	cgggggcaga	gtgacagggt	gtgcatgggt	gtcgtcagct	cgtgtcgtga	1080
gatgttgggt	taagtcccgc	aacgagcgca	acccttgatc	ttagttgcca	gcattcagtt	1140
gggcaactcta	agtgactgac	cggtgacaaa	ccggaggaag	gtggggatga	cgtcaaatca	1200
tcatgcccct	tatgacctgg	gtacacacag	tgctacaatg	gacagaacaa	agggcagcga	1260
aaccgcgagg	ttaagccaat	cccacaaatc	tgttctcagt	tcggatcgca	gtctgcaact	1320
cgactgcgtg	aagctggaat	cgctagtaat	cgcggatcag	catgccgcgg	tgaatcagtt	1380
cccgggcctt	gtacacaccg	cccgtcacac	cacgagagtt	tgtaacaccc	gaagtcggtg	1440
aggtaacctt	ttaggagcca	gccgccgaag	gtgggacaga	tgattggggg	gaagtcgtaa	1500
caaggtagcc						1510

<210> 4  
 <211> 1496  
 <212> ADN  
 <213> Bacillus sp. ITB117

5

<400> 4

gagtttgatc	ctggctcagg	acgaacgctg	gcggcgtgcc	taatacatgc	aagtcgagcg	60
agkstcttcg	gassctagcg	gcggacgggt	gagtaaacacg	taggcaacct	gcctctcaga	120
ctgggataaac	atagggaaac	ttatgctaata	accggatagg	ttttyggaty	gcatgatccg	180
aaaagaaaag	atggcttcgg	ctatcactgg	gagatggggc	tgcggcgcac	tagctagttg	240
gtgggtaaac	ggcctaccaa	ggcgacgatg	cgtagccgac	ctgagagggg	gaccggccac	300
actgggactg	agacacggcc	cagactccta	cgggaggcag	cagtagggaa	ttttccacaa	360
tggacgaaag	tctgatggag	caacgcccg	tgaacgatga	aggtcttcgg	attgtaaagt	420
tctgttgtaa	gggacgaata	agtaccgttc	gaatagggcg	gtaccttgac	ggtacctgac	480
gagaaagcca	cggctaacta	cgtgccagca	gccgcggtaa	tacgtagggt	gcaagcgttg	540
tccggattta	ttgggcgtaa	agcgcgcgca	ggcggctatg	taagtctggg	gttaaagccc	600
ggrgctcaac	yccggttcgc	atcggaaact	gtgtagcttg	agtgcagaag	aggaaagcgg	660
tattccacgt	gtagcgggta	aatgcgtaga	gatgtggagg	aacaccagtg	gcgaaggcgg	720
ctttctggtc	tgtaactgac	gctgaggcgc	gaaagcgtgg	ggagcaaac	ggattagata	780
ccctggtagt	ccacgccgta	aacgatgagt	gctaggtggt	gggggtttca	ataccctcag	840
tcccgcagct	aacgcaataa	gcactccgct	tggggagtac	gctcgcaaga	gtgaaactca	900
aaggaattga	cgggggcccg	cacaagcggg	ggagcatgtg	gtttaattcg	aagcaacgcg	960
aagaacctta	ccaggtcttg	acatcccgt	gaccgctctg	gagacagagc	ttcccttcgg	1020
ggcagcggtg	acaggtgggt	catggttgtc	gtcagctcgt	gtcgtgagat	gtaggggtta	1080
gtcccgcaac	gagcgcaacc	cttatcttta	gtagccagca	ttcagttggg	cactctagag	1140
agactgccgt	cgacaagacg	gaggaaggcg	gggatgacgt	caaatcatca	tgcccttat	1200
gacctgggct	acacacgtgc	tacaatggtt	ggtacaacgg	gatgctacct	cgcgagagga	1260
cgccaatctc	ttaaaaccaa	tctcagttcg	gattgtaggc	tgcaactcgc	ctacatgaag	1320
tcggaatcgc	tagtaatcgc	ggatcagcat	gccgcgggta	atacgttccc	gggccttgta	1380
cacaccgccc	gtcacaccac	gggagtttgc	aacaccgcaa	gtcggtgagg	taaccgcaag	1440
gagccagccg	ccgaaggtgg	ggtagatgac	tgggggtaag	tcgtaacaag	gtagcc	1496

10

**REIVINDICACIONES**

1. Un microorganismo que es una cepa de *Bacillus* sp. ITB105 (NITE BP-01727).
- 5 2. El microorganismo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la cepa de *Bacillus* sp. ITB105 (NITE BP-01727) tiene un ADNr 16S que se muestra mediante la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 3.
3. Un producto de cultivo del microorganismo de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que el producto de cultivo incluye medio de cultivo o solución de cultivo que contiene el microorganismo de la reivindicación 1 o 2.
- 10 4. Una formulación microbiológica que comprende el microorganismo de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 o el producto de cultivo de acuerdo con la reivindicación 3.
- 15 5. Uso del microorganismo de la reivindicación 1 o 2, el producto de cultivo de la reivindicación 3 o la formulación microbiológica de acuerdo con la reivindicación 4 para estimular el crecimiento de las plantas.
6. Uso del microorganismo de la reivindicación 1 o 2, el producto de cultivo de la reivindicación 3 o la formulación microbiológica de acuerdo con la reivindicación 4 para controlar una enfermedad de las plantas.
- 20 7. Uso del microorganismo de la reivindicación 1 o 2, el producto de cultivo de la reivindicación 3 o la formulación microbiológica de acuerdo con la reivindicación 4 para controlar un nematodo.
8. Un método para estimular el crecimiento de una planta, que comprende una etapa para tratar una planta o un suelo con el producto de cultivo de acuerdo con la reivindicación 3 o la formulación microbiológica de acuerdo con la reivindicación 4.
- 25 9. Un método para controlar una enfermedad de las plantas, que comprende una etapa para tratar una planta o un suelo con el producto de cultivo de acuerdo con la reivindicación 3 o la formulación microbiológica de acuerdo con la reivindicación 4.
- 30 10. Un método para controlar un nematodo, que comprende una etapa para tratar una planta o un suelo con el producto de cultivo de acuerdo con la reivindicación 3 o la formulación microbiológica de acuerdo con la reivindicación 4.
- 35 11. Un método de cultivo de una planta, que comprende una etapa para tratar una planta con el producto de cultivo de acuerdo con la reivindicación 3 o la formulación microbiológica de acuerdo con la reivindicación 4.
12. Un método para la producción de una cepa variante derivada de la cepa de *Bacillus* sp. ITB105 (NITE BP-01727) o de una célula poliploidizada de la misma,
- 40 en el que el método comprende la mutación espontánea de la cepa de *Bacillus* sp. ITB105 o la inducción de la mutación en la cepa de *Bacillus* sp. ITB105 usando radiación de luz ultravioleta, radiación con rayos X o un agente mutagénico,
- 45 y en el que la variante resultante tiene una acción de control de enfermedades de las plantas, una acción de control de nematodos y una acción estimuladora del crecimiento de las plantas que es un 80 % o más en comparación con una cepa original.