

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 819 255**

51 Int. Cl.:

**A01N 63/20** (2010.01)

**A01P 5/00** (2006.01)

**A01P 21/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.10.2015 PCT/EP2015/074539**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.04.2016 WO16062829**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.10.2015 E 15787521 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.07.2020 EP 3209132**

54 Título: **Bacterias con actividad nematocida y la capacidad de promover el crecimiento vegetal**

30 Prioridad:

**23.10.2014 EP 14382416**

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

**15.04.2021**

73 Titular/es:

**FUTURECO BIOSCIENCE, S.A. (100.0%)  
Avenida del Cadí, nave 19-23 Poligono Industrial  
Sant Pere Molanta  
08799 Olèrdola - Barcelona, ES**

72 Inventor/es:

**SARRO BARO, ÁNGELA;  
LARA SÁNCHEZ, JOSE MANUEL;  
FERNÁNDEZ CASTILLO, CAROLINA;  
ALMAZÁN GARCÍA, MARTA y  
SALGUEIRO FERNÁNDEZ, NOELIA**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

**Observaciones:**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 819 255 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

Bacterias con actividad nematocida y la capacidad de promover el crecimiento vegetal

5 **Campo de la invención**

La presente invención se encuadra dentro del campo del control biológico de nematodos con capacidad de infectar plantas. Específicamente, la invención se refiere a bacterias de la especie *Lysobacter enzymogenes* con actividad nematocida y con capacidad de promover el crecimiento vegetal, así como al uso de dichas bacterias en métodos para controlar biológicamente nematodos.

**Antecedentes de la invención**

Por su naturaleza, los nematodos fitoparásitos son patógenos, pero sus interacciones con otros agentes causantes de enfermedades dificultan medir su verdadero impacto sobre el rendimiento de los cultivos y hacer una estimación a gran escala. En general, los nematodos fitoparásitos causan pérdidas anuales de entre el 11 y el 14 % en cultivos económicamente importantes tales como leguminosas, cereales, banano, yuca, cocotero, remolacha azucarera, caña de azúcar, patata, hortalizas, cultivos ornamentales y frutales.

El proceso de alimentación de los nematodos puede causar una reacción en las células vegetales afectadas, dando como resultado la muerte o debilitamiento de las puntas de las raíces y los brotes terminales, formación de lesiones y rotura de tejidos, abultamientos y agallas, arrugamiento y deformación de tallos y hojas. Algunas de estas manifestaciones están causadas por la descomposición del tejido afectado por las enzimas del nematodo, lo que, con o sin la ayuda de metabolitos tóxicos, causa desintegración del tejido y muerte celular. Otros síntomas, tales como agallamiento causado por nematodos del género *Meloidogyne*, están causados por alargamiento celular anómalo (hipertrofia), por supresión de la división celular o por la estimulación del proceso de división celular de una manera controlada que da como resultado la formación de agallas (hiperplasia) o de un gran número de raíces laterales en o cerca de los sitios de infección.

En algunos casos, sin embargo, los síntomas están ocasionados por interacciones bioquímicas de las plantas con los nematodos, que afectan a la fisiología general de las plantas, así como el papel que desempeñan los nematodos en la formación de heridas a través de las cuales otros patógenos, que son los principales responsables del daño causado, penetran en dichas plantas.

Con la aplicación de la nueva directiva europea para el uso sostenible de productos fitosanitarios, se está llevando a cabo la retirada de la mayoría de los productos químicos destinados al control de estos parásitos y patógenos de plantas, debido a su elevada toxicidad y a la agresividad de los tratamientos.

Una alternativa ecológica para el tratamiento y control de nematodos fitopatógenos consiste en el control biológico de tales nematodos por medio del uso de microorganismos con actividad nematocida. En este sentido, se ha descrito el uso de algunas cepas de bacterias pertenecientes a los géneros *Lysobacter* o *Stenotrophomonas* con actividad nematocida. A modo ilustrativo, diversos ensayos han mostrado que la cepa C3 de *L. enzymogenes* tiene actividad nematocida contra formas juveniles y adultas de diversos nematodos fitopatógenos y que provoca anomalías en huevos de nematodos en medio de cultivo (Chen *et al.*, "Influence of *Lysobacter enzymogenes* Strain C3 on nematodes", *Journal of Nematology*, 38(2):233-239, 2006); específicamente, Chen *et al.*, analizaron la influencia de la cepa C3 de *L. enzymogenes* sobre los nematodos fitopatógenos *Heterodera schachtii*, *Meloidogyne javanica*, *Pratylenchus penetrans* y *Aphelenchoides fragariae*, y observaron que (i) la eclosión de huevos de *H. schachtii* era del 50 % en presencia de la cepa C3 de *L. enzymogenes* en agar; (ii) las formas juveniles de *M. javanica* morían 4 días después de su exposición a un caldo de cultivo con quitina de la cepa C3 de *L. enzymogenes*; (iii) la inmersión de formas juveniles y adultas de *A. fragariae*, *M. javanica* y *P. penetrans* en un caldo de cultivo de la cepa C3 de *L. enzymogenes* conducía a una rápida muerte y desintegración de tales nematodos; y (iv) la exposición de formas juveniles de *H. schachtii* a un caldo de cultivo de la cepa C3 de *L. enzymogenes* daba como resultado su rápida inmovilización y lisis al cabo de 3 días. No obstante, Chen *et al.*, no mencionan nada sobre la capacidad de la cepa C3 de *L. enzymogenes* de promover el crecimiento vegetal.

La solicitud de patente china CN 101177671 describe la cepa OH11 de *L. enzymogenes* y su uso en el tratamiento de enfermedades de plantas; aunque se menciona la posibilidad de usar dicha cepa en el tratamiento de enfermedades causadas por nematodos fitopatógenos, no se demuestra la actividad nematocida de dicha cepa.

Ya Li ("University of Nebraska -Lincoln Digital Commons@University of Nebraska -Lincoln Theses, Dissertaciones, and Student Research in Agronomy and Horticulture Agronomy and Horticulture Department Fenotypic Diversity in *Lysobacter enzymogenes* in Relations to Biological Control, 2014) da a conocer el control de patógenos de plantas por varios tipos de *Lysobacter*, y en particular por varias cepas de *L. enzymogenes*. Este documento también comenta la capacidad de *L. enzymogenes* para promover el crecimiento vegetal, aunque menciona que no está disponible información sobre la capacidad de *L. enzymogenes* para estimular el crecimiento vegetal a través de mecanismos no relacionados con el control biológico de patógenos de plantas.

Por tanto, existe la necesidad de nuevas alternativas ecológicas para el control biológico de nematodos fitopatógenos.

5 **Sumario de la invención**

10 En un primer aspecto, la invención se refiere a un microorganismo de la especie *Lysobacter enzymogenes*, identificado como *L. enzymogenes* cepa MR B25, depositado en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con el número de registro CECT 8565 o un mutante del mismo en el que dicho mutante tiene un genoma que tiene una identidad de secuencia de al menos el 99 % con el genoma de la cepa MR B25 de *L. enzymogenes*, en el que el microorganismo y el mutante tienen actividad nematocida sobre un nematodo de la especie *Meloidogyne javanica* y la capacidad de promover el crecimiento vegetal en una planta de la familia *Solanaceae*.

15 En otro aspecto, la invención se refiere a un cultivo biológicamente puro del microorganismo de la invención, en el que el cultivo biológicamente puro comprende dicho microorganismo en una proporción del 95 % o superior en comparación con otros organismos presentes en dicho cultivo.

20 En otro aspecto, la invención se refiere a un método para obtener una biomasa del microorganismo de la invención que comprende cultivar dicho microorganismo en el medio de cultivo en condiciones de temperatura, pH y oxigenación constantes, en el que la temperatura está comprendida entre 25°C y 35°C, el pH está comprendido entre 5,0 y 9,0 y la oxigenación se logra por medio de agitación a velocidades de entre 200 y 500 rpm y/o suministrando aire estéril a un caudal fijo de entre 0,5 y 1,5 vvm.

25 En otro aspecto, la invención se refiere a una biomasa del microorganismo de la invención, obtenible por medio del método de la invención.

En otro aspecto, la invención se refiere a un producto fitosanitario que comprende el microorganismo de la invención, un cultivo biológicamente puro o una biomasa de la invención y un excipiente agrícola aceptable.

30 En otro aspecto, la invención se refiere a una semilla suplementada que comprende:

- (i) una semilla, y además
- 35 (ii) un segundo componente seleccionado del grupo que consiste en:
  - (a) el microorganismo de la invención,
  - (b) el cultivo biológicamente puro de la invención,
  - 40 (c) la biomasa de la invención, y
  - (d) el producto fitosanitario de la invención.

45 En otro aspecto, la invención se refiere a un método para controlar biológicamente un nematodo que comprende aplicar a dicho nematodo el microorganismo de la invención, el cultivo biológicamente puro de la invención, la biomasa de la invención o el producto fitosanitario de la invención, en el que el método no es un método de tratamiento del cuerpo humano o animal.

50 En otro aspecto, la invención se refiere a un método para prevenir la infección de una planta provocada por un nematodo que comprende aplicar una cantidad eficaz de un producto seleccionado del grupo que consiste en:

- (a) el microorganismo de la invención,
- 55 (b) el cultivo biológicamente puro de la invención,
- (c) la biomasa de la invención, y
- (d) el producto fitosanitario de la invención,

60 aplicándose dicho producto sobre dicha planta, sobre la semilla de dicha planta, en el suelo que rodea a dicha planta,

o alternativamente plantando una semilla de dicha planta, dicha semilla suplementada con un producto seleccionado del grupo que consiste en:

- 65 (a) el microorganismo de la invención,

- (b) el cultivo biológicamente puro de la invención,
- (c) la biomasa de la invención, y
- (d) el producto fitosanitario de la invención.

En otro aspecto, la invención se refiere a un método para tratar una planta infectada por un nematodo que comprende aplicar una cantidad eficaz de un producto seleccionado del grupo que consiste en:

- (a) el microorganismo de la invención,
- (b) el cultivo biológicamente puro de la invención,
- (c) la biomasa de la invención, y
- (d) el producto fitosanitario de la invención,

aplicándose dicho producto sobre dicha planta o en el suelo que rodea a dicha planta.

En otro aspecto, la invención se refiere a un método para estimular el crecimiento vegetal que comprende aplicar una cantidad eficaz de un producto seleccionado del grupo que consiste en:

- (i) el microorganismo de la invención,
- (ii) el cultivo biológicamente puro de la invención,
- (iii) la biomasa de la invención, y
- (iv) el producto fitosanitario de la invención,

aplicándose dicho producto sobre dicha planta, sobre la semilla de dicha planta o en el suelo que rodea a dicha planta,

o alternativamente plantando una semilla de dicha planta, dicha semilla suplementada con un producto seleccionado del grupo que consiste en:

- (a) el microorganismo de la invención,
- (b) el cultivo biológicamente puro de la invención,
- (c) la biomasa de la invención, y
- (d) el producto fitosanitario de la invención.

#### Breve descripción de las figuras

Figura 1. Características morfológicas de *L. enzymogenes* cepa MR B25 hecho crecer a diferentes temperaturas en agar nutritivo.

Figura 2. Evolución de la eclosión de huevos de *M. javanica* en el control y en los tratamientos con el producto químico de referencia (fenamifos) y con *L. enzymogenes* cepa MR B25 a diferentes lecturas (días).

Figura 3. Actividad nematocida sobre huevos de *M. javanica* de *L. enzymogenes* cepa MR B25 y del producto químico de referencia (fenamifos) corregida respecto al control. Las distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas.

Figura 4. Actividad nematocida sobre juveniles ( $J_2$ ) de *M. javanica* de *L. enzymogenes* cepa MR B25 y del producto químico de referencia (fenamifos). Las distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas.

Figura 5. Evolución de la eclosión de huevos de *M. javanica* en huevos tratados con 2 cepas diferentes de *L. enzymogenes* (MR B25 y B322) en comparación con el control y con el producto químico de referencia (fenamifos). La cepa B322 no se encuentra dentro del alcance de protección.

Figura 6. Porcentaje de eficacia nematocida de 2 cepas de *L. enzymogenes* (MR B25 y B322) en comparación con el producto químico de referencia (fenamifos) corregido respecto al control. Las distintas letras indican diferencias

estadísticamente significativas. La cepa B322 no se encuentra dentro del alcance de protección.

5 Figura 7. Evolución de la eclosión de huevos de *M. javanica* en huevos tratados con la biomasa y con los metabolitos de 2 cepas diferentes de *L. enzymogenes* (MR B25 y B322) en comparación con el control de agua destilada estéril y medio de cultivo estéril (control de VEG). La cepa B322 no se encuentra dentro del alcance de protección.

10 Figura 8. Eficacias nematicidas sobre huevos de *M. javanica* obtenidas por la biomasa de *L. enzymogenes* cepas MR B25 y B322 y por sus metabolitos corregidas respecto a los correspondientes controles. Las distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas. La cepa B322 no se encuentra dentro del alcance de protección.

Figura 9. Eficacia nematicida de *L. enzymogenes* cepa MR B25 y del producto químico de referencia (fenamifos) sobre huevos y juveniles de *M. javanica* en plantas de tomate.

15 Figura 10. Infectividad de los adultos de *M. javanica* tratados con *L. enzymogenes* cepa MR B25 y con el producto químico de referencia (fenamifos) en comparación con la infectividad del control. Las distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas.

20 Figura 11. Fertilidad de las hembras de *M. javanica* tratadas con *L. enzymogenes* cepa MR B25 y el producto químico de referencia (fenamifos) en comparación con el control. Las distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas.

25 Figura 12. Actividad promotora del crecimiento de *L. enzymogenes* cepa MR B25 en tomate, en comparación con la actividad promotora del crecimiento del control y con la actividad promotora del crecimiento de un producto químico de referencia (fenamifos). Las distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas.

30 Figura 13. Actividad nematicida sobre *M. javanica* de *L. enzymogenes* cepa MR B25 a diferentes dosis y del producto biológico de referencia (*Purpureocillium lilacinum PL11*) corregida respecto al control. Las distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas.

35 Figura 14. Actividad promotora del crecimiento (peso fresco aéreo y peso seco aéreo) de la planta tratada con *L. enzymogenes* MR B25 a diferentes dosis y de la planta tratada con el producto biológico de referencia (*P. lilacinum PL11*) en comparación con la actividad promotora del crecimiento del control. Las distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas.

40 Figura 15. Actividad nematicida sobre *M. javanica* de 2 cepas de *L. enzymogenes* (MR B25 y B322) y del producto biológico de referencia (*P. lilacinum PL11*) corregida respecto al control. Las distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos. La cepa B322 no se encuentra dentro del alcance de protección.

45 Figura 16. Infectividad de los adultos de *M. javanica* tratados con 2 cepas de *L. enzymogenes* (MR B25 y B322) y el producto biológico de referencia (*Purpureocillium lilacinum PL11*) en comparación con el control. Las distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas. La cepa B322 no se encuentra dentro del alcance de protección.

50 Figura 17. Fertilidad de las hembras de *M. javanica* tratadas con 2 cepas de *L. enzymogenes* (MR B25 y B322) y el producto biológico de referencia (*P. lilacinum PL11*) en comparación con la fertilidad del control. Las distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas. La cepa B322 no se encuentra dentro del alcance de protección.

Figura 18. Altura del tallo en plantas tratadas con *L. enzymogenes* MR B25 en comparación con el control. La columna marcada con un asterisco (\*) indica diferencias estadísticamente significativas respecto al control.

55 Figura 19. Peso fresco aéreo y radicular de la planta tratada con *L. enzymogenes* MR B25 en comparación con el control. Las columnas marcadas con un asterisco (\*) indican diferencias estadísticamente significativas respecto al control.

Figura 20. Peso seco aéreo y radicular de la planta tratada con *L. enzymogenes* MR B25 en comparación con el control. Las columnas marcadas con un asterisco (\*) indican diferencias estadísticamente significativas respecto al control.

60 Figura 21.- Evolución de la eclosión de huevos de *M. javanica* en el control y en tratamientos con el producto químico de referencia (fenamifos) y con *P. grimontii* cepa B949 a diferentes lecturas (días). Esta es una figura de referencia y la cepa B949 no se encuentra dentro del alcance de protección.

65 Figura 22.- Actividad nematicida sobre huevos de *M. javanica* de *P. grimontii* cepa B949 y el producto químico de referencia (fenamifos) corregida respecto al control. Las distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas. Esta es una figura de referencia y la cepa B949 no se encuentra dentro del alcance de protección.

- Figura 23.- Actividad nematocida sobre juveniles de *M. javanica* juveniles (J2) de *P. grimontii* cepa B949 y el producto químico de referencia (fenamifos). Las distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas. Esta es una figura de referencia y la cepa B949 no se encuentra dentro del alcance de protección.
- 5 Figura 24.- Eficacia nematocida de *P. grimontii* cepa B949 y el producto químico de referencia (fenamifos) sobre huevos y juveniles de *M. javanica* en plantas de tomate. Esta es una figura de referencia y la cepa B949 no se encuentra dentro del alcance de protección.
- 10 Figura 25.- Infectividad de los adultos de *M. javanica* tratados con *P. grimontii* cepa B949 y con el producto químico de referencia (fenamifos) en comparación con la infectividad del control. Las distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas. Esta es una figura de referencia y la cepa B949 no se encuentra dentro del alcance de protección.
- 15 Figura 26.- Fertilidad de hembras de *M. javanica* tratadas con *P. grimontii* cepa B949 y el producto químico de referencia (fenamifos) en comparación con el control. Las distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas. Esta es una figura de referencia y la cepa B949 no se encuentra dentro del alcance de protección.
- 20 Figura 27.- Evolución de la eclosión de huevos de *M. javanica* en el control y en tratamientos con el producto químico de referencia (fenamifos) y con *B. simplex* cepa B1169 a diferentes lecturas (días). Esta es una figura de referencia y la cepa B1169 no se encuentra dentro del alcance de protección.
- 25 Figura 28.- Actividad nematocida sobre huevos de *M. javanica* de *B. simplex* cepa B1169 y el producto químico de referencia (fenamifos) corregida respecto al control. Las distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas. Esta es una figura de referencia y la cepa B1169 no se encuentra dentro del alcance de protección.
- 30 Figura 29.- Actividad nematocida sobre juveniles de *M. javanica* (J2) de *B. simplex* cepa B1169 y el producto químico de referencia (fenamifos). Las distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas. Esta es una figura de referencia y la cepa B1169 no se encuentra dentro del alcance de protección.
- 35 Figura 30.- Eficacia nematocida de *B. simplex* cepa B1169 y el producto químico de referencia (fenamifos) sobre huevos y juveniles de *M. javanica* en plantas de tomate. Esta es una figura de referencia y la cepa B1169 no se encuentra dentro del alcance de protección.
- 40 Figura 31.- Infectividad de los adultos de *M. javanica* tratados con *B. simplex* cepa B1169 y con el producto químico de referencia (fenamifos) en comparación con la infectividad del control. Las distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas. Esta es una figura de referencia y la cepa B1169 no se encuentra dentro del alcance de protección.
- 45 Figura 32.- Fertilidad de hembras de *M. javanica* tratadas con *B. simplex* cepa B1169 y el producto químico de referencia (fenamifos) en comparación con el control. Las distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas. Esta es una figura de referencia y la cepa B1169 no se encuentra dentro del alcance de protección.
- 50 Figura 33.- Comparación de la altura del tallo en plantas tratadas con *L. enzymogenes* MR B25 y B322 en comparación con el control. Las distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas. La cepa B322 no se encuentra dentro del alcance de protección.
- 55 Figura 34.- Peso fresco aéreo de la planta tratada con *L. enzymogenes* cepa MR B25 en comparación con *L. enzymogenes* cepa B322 y el control usado. Las distintas letras indican diferencia estadísticamente significativa. La cepa B322 no se encuentra dentro del alcance de protección.
- 60 Figura 35.- Peso seco aéreo de la planta tratada con *L. enzymogenes* cepa MR B25 en comparación con *L. enzymogenes* cepa B322 y el control usado. Las distintas letras indican diferencia estadísticamente significativa. La cepa B322 no se encuentra dentro del alcance de protección.
- 65 Figura 36.- Peso fresco radicular de la planta tratada con *L. enzymogenes* cepa MR B25 en comparación con *L. enzymogenes* cepa B322 y el control usado. Las distintas letras indican diferencia estadísticamente significativa. La cepa B322 no se encuentra dentro del alcance de protección.
- Figura 37.- Peso seco radicular de la planta tratada con *L. enzymogenes* cepa MR B25 en comparación con *L. enzymogenes* cepa B322 y el control usado. Las distintas letras indican diferencia estadísticamente significativa. La cepa B322 no se encuentra dentro del alcance de protección.
- Figura 38.- Peso fresco vegetal de la planta tratada con *L. enzymogenes* cepa MR B25 en comparación con *L. enzymogenes* cepa B322 y el control usado. Las distintas letras indican diferencia estadísticamente significativa. La cepa B322 no se encuentra dentro del alcance de protección.

Figura 39.- Peso seco vegetal de la planta tratada con *L. enzymogenes* cepa MR B25 en comparación con *L. enzymogenes* cepa B322 y el control usado. Las distintas letras indican diferencia estadísticamente significativa. La cepa B322 no se encuentra dentro del alcance de protección.

## 5 Descripción detallada de la invención

Los inventores de la presente invención han descubierto una cepa bacteriana de la especie *Lysobacter enzymogenes* (*L. enzymogenes* cepa MR B25) con actividad nematocida y promotora del crecimiento vegetal. Específicamente, los inventores han observado que dicha cepa es capaz de inhibir la eclosión de huevos de nematodos de la especie *Meloidogyne javanica* en ensayos *in vitro* (Ejemplo 2) así como de inducir la mortalidad de juveniles de *M. javanica in vitro* (Ejemplo 3). Dicha actividad nematocida también se confirmó *in vivo* sobre plantas de tomate de la variedad "Marmande" (Ejemplos 6, 7 y 8). Sorprendentemente, la actividad nematocida *in vitro* de *L. enzymogenes* cepa MR B25 frente a huevos de *M. javanica* y su actividad *in vivo* frente a juveniles de *M. javanica* es mayor que la de otras cepas de la misma especie. Adicionalmente, los inventores han observado que, inesperadamente, el tratamiento de plantas de tomate con *L. enzymogenes* cepa MR B25 promueve el crecimiento de dicha planta (Ejemplos 6, 7 y 9).

Basándose en estos descubrimientos, se han desarrollado los siguientes aspectos de la invención.

### 20 Microorganismo y cultivo

En un primer aspecto, la invención se refiere a un microorganismo de la especie *Lysobacter enzymogenes*, a continuación en el presente documento microorganismo de la invención, identificado como *L. enzymogenes* cepa MR B25, depositado en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con el número de registro CECT 8565 o un mutante del mismo en el que dicho mutante tiene un genoma que tiene una identidad de secuencia de al menos el 99 % con el genoma de la cepa MR B25 de *L. enzymogenes*, en el que el microorganismo y el mutante tienen actividad nematocida sobre un nematodo de la especie *Meloidogyne javanica* y capacidad de promover el crecimiento vegetal en una planta de la familia *Solanaceae*.

30 Dicha cepa se ha depositado con anterioridad a la fecha de presentación de la presente solicitud de patente en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), como institución de depósito legalmente reconocida a tal efecto de conformidad con el Tratado de Budapest del 28 de Abril de 1977, sobre el reconocimiento internacional del depósito de microorganismos a los fines de patente.

35 El depositante ha sido Futureco Bioscience, S.A. con domicilio en Avenida del Cadí, nave 19-23, Polígono Industrial Sant Pere Molanta, 08799, Olèrdola, Barcelona, España.

Las características morfológicas y moleculares de dicha cepa se muestran en el Ejemplo 1, y las condiciones de cultivo se describen más adelante en el contexto del procedimiento para la obtención de biomasa de la invención.

40 El microorganismo de la invención pertenece a una especie identificada en la base de datos de NCBI por Taxonomy ID: 69. La especie *Lysobacter enzymogenes* fue descrita por Christensen y Cook, 1978 (Christensen, P., & Cook, F. D. (1978). *Lysobacter*, a new genus of nonfruiting, gliding bacteria with a high base ratio. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 28(3), 367-393).

45 El término "microorganismo de la invención" incluye tanto dicho microorganismo *L. enzymogenes* cepa MR B25 (CECT 8565), con actividad nematocida sobre un nematodo de la especie *Meloidogyne javanica* y la capacidad de promover el crecimiento vegetal en una planta de la familia *Solanaceae*, como sus mutantes que tienen un genoma que tiene una identidad de secuencia de al menos el 99 % con el genoma de la cepa MR B25 de *L. enzymogenes* y que mantienen dicha actividad nematocida sobre un nematodo de la especie *Meloidogyne javanica* y dicha capacidad de promover el crecimiento vegetal en una planta de la familia *Solanaceae*.

50 Tal como se usa en el presente documento, el término "mutante" se refiere a cualquier microorganismo resultante de una mutación o cambio en el ADN de uno o varios genes de *L. enzymogenes* cepa MR B25 (CECT 8565) que mantiene las mismas características que la cepa original [*L. enzymogenes* cepa MR B25 (CECT 8565)], y que mantiene específicamente la actividad nematocida sobre un nematodo de la especie *Meloidogyne javanica* y la capacidad de promover el crecimiento vegetal en una planta de la familia *Solanaceae*. El mutante puede producirse de manera natural o deliberadamente mediante métodos de mutagénesis conocidos en el estado de la técnica, tales como, por ejemplo pero sin limitarse a, crecimiento del microorganismo original en presencia de agentes mutagénicos o causantes de estrés, o por medio de ingeniería genética destinada a modificar genes específicos.

55 El mutante de la *L. enzymogenes* cepa MR B25 tiene un genoma que tiene una identidad de secuencia de al menos el 99 % o superior con el genoma de *L. enzymogenes* cepa MR B25. La identidad de secuencia entre los genomas de dos microorganismos puede determinarse usando algoritmos implementados en un ordenador y métodos que conocen ampliamente los expertos en la técnica. La identidad entre dos secuencias de nucleótidos se determina preferiblemente usando el algoritmo BLASTN (BLAST Manual, Altschul, S. *et al.*, NCBI NLM NIH Bethesda, Md.

20894, Altschul, S., *et al.*, J., 1990, Mol. Biol. 215:403-410).

El microorganismo de la invención tiene actividad nematocida sobre un nematodo de la especie *Meloidogyne javanica* y la capacidad de promover el crecimiento vegetal en una planta de la familia *Solanaceae*.

5 Tal como se usa en el presente documento, la expresión “actividad nematocida” se refiere a la capacidad de inhibir la eclosión de huevos y/o paralizar las formas larvianas de un nematodo en cualquiera de sus estadios o de impedir que un nematodo se desarrolle o crezca.

10 Tal como se usa en el presente documento, el término “nematodo” se refiere a un filo de organismos pluricelulares pseudocelomados del grupo Ecdysozoa. Tal como se usa en el presente documento, el término “nematodo” incluye cualquier nematodo. Aunque el microorganismo de la invención puede tener actividad nematocida sobre cualquier nematodo, tiene actividad nematocida sobre un nematodo fitoparásito o fitopatógeno.

15 Tal como se usa en el presente documento, el término “nematodo parásito de plantas” o “nematodo patógeno de plantas” o “nematodo fitoparásito” o “nematodo fitopatógeno” se refiere a un nematodo con la capacidad de parasitar o de provocar una enfermedad en un organismo vegetal, incluyendo:

20 - *Endoparásitos migratorios*: nematodos móviles que se alimentan dentro del tejido vegetal. Todos los estadios del ciclo de vida son móviles excepto el huevo. Perforan el tejido vegetal desplazándose de célula a célula. Mientras se alimentan, depositan los huevos en el tejido cortical de la planta o en el suelo que rodea la raíz. Las células dañadas liberan toxinas que provocan la muerte de las células adyacentes, dando lugar a manchas de tejido necrótico. Con frecuencia hongos y bacterias patógenas entran a través de las zonas dañadas provocando podredumbres en las raíces. Ejemplos: *Pratylenchus* (*P. vulnus*, *P. penetrans*, *P. brachyurus*, *P. coffeae*, *P. goodeyi*, *P. zae*, *P. thornei*, *P. neglectus*), *Radopholus* (*R. similis*, *R. citrophilus*), *Scutellonema bradys*, *Hirschmanniella*.

30 - *Endoparásitos sedentarios*: el adulto penetra en la planta y se fija a la misma, dejando parte de su cuerpo expuesto al exterior. Generalmente se alimentan de sincitios. Ejemplos: *Meloidogyne* (*M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria*, *M. hapla*), *Globodera* (*G. pallida*, *G. rostochiensis*), *Heterodera* (*H. schachtii*, *H. trifolii*, *H. goettingiana*, *H. avenae*).

35 - *Ectoparásitos*: nematodos fitófagos de vida libre. Sólo introducen en la raíz el estilete, que puede ser muy débil (*Tylenchus*, nematodo de los cítricos), en la raíz afectando solo a los pelos radiculares, o muy largo (*Longidorus* y *Xiphinema*), lo que les permite alimentarse de células de tejidos profundos. Estas últimas especies son muy problemáticas a nivel agronómico ya que son nematodos transmisores de virus.

40 El microorganismo de la invención puede tener actividad nematocida sobre cualquier nematodo parásito o patógeno de plantas de los mencionados más arriba. Los ejemplos ilustrativos de nematodos parásitos o patógenos de plantas sobre los que el microorganismo de la invención puede tener actividad nematocida incluyen nematodos pertenecientes a los géneros *Heterodera*, *Globodera*, *Pratylenchus*, *Paratylenchus*, *Rotylenchus*, *Xiphinema*, *Trichodorus*, *Ditylenchus*, *Criconemella* (*Mesocriconema*), *Helicotylechus*, *Longidorus*, *Paratrachodorus*, *Belonolaimus* y *Radopholus*.

45 En una realización particular, el microorganismo de la invención tiene actividad nematocida sobre un nematodo seleccionado de los géneros *Globodera*, *Heterodera*, *Pratylenchus*, *Tylenchulus*, *Radopholus* y *Xiphinema*. El microorganismo de la invención tiene actividad nematocida sobre un nematodo del género *Meloidogyne*. El microorganismo de la invención tiene actividad nematocida sobre *Meloidogyne javanica*. En otra realización particular, el microorganismo de la invención tiene actividad nematocida sobre un nematodo del género *Globodera*.

50 Tal como se usa en el presente documento, el término “Meloidogyne” se refiere a un género de nematodos identificados en la base de datos de NCBI por Taxonomy ID: 189290.

55 Tal como se usa en el presente documento, el término “Meloidogyne javanica” o “M. javanica” se refiere a una especie de los denominados nematodos del nódulo de la raíz identificada en la base de datos de NCBI por Taxonomy ID: 6303. Los nematodos del nódulo de la raíz son nematodos parásitos de plantas del género *Meloidogyne* que infectan las raíces de plantas dando lugar al desarrollo de agallas en los nódulos de la raíz que drenan los nutrientes de la planta.

60 Tal como se usa en el presente documento, el término “Globodera” se refiere a un género de nematodos identificados en la base de datos de NCBI por Taxonomy ID: 31242 y también denominados “nematodos formadores de quistes”.

65 El ciclo vital de un nematodo incluye 6 estadios, incluyendo el huevo, 4 estadios juveniles o larvianos y uno adulto. Todos los estadios, a excepción del primer juvenil que se forma a partir del huevo, están precedidos de una muda.

El microorganismo de la invención puede tener actividad nematicida sobre cualquiera de los estadios de un nematodo, incluyendo huevos, formas juveniles y formas adultas. En una realización particular, el microorganismo de la invención tiene actividad nematicida sobre huevos de nematodos. En otra realización particular, el microorganismo de la invención tiene actividad nematicida sobre formas juveniles de nematodos. En una realización particular, el microorganismo de la invención tiene actividad nematicida sobre huevos de nematodos y sobre formas juveniles de nematodos. En otra realización particular, el microorganismo de la invención tiene actividad nematicida sobre la forma adulta de nematodos. En otra realización particular, el microorganismo de la invención tiene actividad nematicida sobre huevos de nematodos y sobre la forma adulta de nematodos. En otra realización particular, el microorganismo de la invención tiene actividad nematicida sobre formas juveniles de nematodos y sobre la forma adulta de nematodos. En otra realización particular, el microorganismo de la invención tiene actividad nematicida sobre huevos de nematodos, sobre formas juveniles de nematodos y sobre la forma adulta de nematodos.

La actividad nematicida de un microorganismo puede determinarse por el experto en la técnica por medio de cualquier ensayo *in vivo* o *in vitro* que permita determinar y/o cuantificar la capacidad de un microorganismo para interferir con el desarrollo de los nematodos en cualquiera de sus estadios. Ejemplos ilustrativos de dichos ensayos son los siguientes:

- Un ensayo *in vitro* sobre huevos en el que, tras un periodo de tiempo de incubación de los huevos de nematodos en condiciones adecuadas para la eclosión, se determina el porcentaje de huevos que eclosionaron en presencia del agente de control, en este caso el microorganismo cuya actividad nematicida eventual va a conocerse, en comparación con una muestra de control (por ejemplo, la misma cantidad de huevos de nematodos en ausencia del agente de control). Por medio de este tipo de ensayo puede determinarse el parámetro "eficacia nematicida" como la diferencia en el porcentaje de huevos que eclosionaron en presencia del microorganismo con respecto al control en un periodo de tiempo específico. Cualquier reducción significativa en el porcentaje de huevos que eclosionaron en presencia del microorganismo con respecto al control indica que dicho microorganismo tiene actividad nematicida.

- Un ensayo *in vitro* sobre juveniles en el que, tras un periodo de tiempo de incubación de formas juveniles de nematodos en condiciones adecuadas para su desarrollo, se determina el porcentaje de juveniles vivos en presencia del agente de control, en este caso el microorganismo cuya actividad nematicida eventual va a conocerse, en comparación con una muestra de control (por ejemplo, la misma cantidad de juveniles en ausencia del agente de control). La "eficacia nematicida" determinada por medio de tal ensayo se define como el porcentaje de mortalidad de juveniles corregido respecto al control en un periodo de tiempo específico. Cualquier reducción significativa en el porcentaje de juveniles vivos en presencia del microorganismo con respecto al control indica que dicho microorganismo tiene actividad nematicida.

- Un ensayo *in vivo* en el que se inocula una planta con formas juveniles del nematodo y, tras un periodo de tiempo en condiciones adecuadas para el crecimiento de la planta y tras tratarse con el microorganismo cuya actividad nematicida eventual va a conocerse, se evalúa el número de huevos, y/o juveniles y/o adultos del nematodo presentes en la planta tratada con el microorganismo en comparación con el control (por ejemplo, dicha planta no tratada con el microorganismo). La "eficacia nematicida", determinada por medio de tal ensayo, se define como la diferencia en el porcentaje de huevos y/o estadios juveniles y/o adultos en presencia del microorganismo corregido respecto al control en un periodo de tiempo específico. Cualquier reducción significativa en el porcentaje de huevos y/o juveniles y/o adultos en presencia del microorganismo con respecto al control indica que dicho microorganismo tiene actividad nematicida. En una realización particular, la actividad nematicida del microorganismo de la invención se determina por medio de los ensayos usados en los Ejemplos 2-8 de la presente memoria descriptiva.

El microorganismo de la invención tiene una eficacia nematicida de, al menos, el 2 %; al menos, el 5 %; al menos, el 10 %; al menos, el 15 %; al menos, el 20 %; al menos, el 25 %; al menos, el 30 %; al menos, el 40 %; al menos, el 50 %; al menos, el 60 %; al menos, el 70 %; al menos, el 80 %; al menos, el 90 %; al menos, el 95 %; al menos el 99 % o el 100 % respecto a un control.

En una realización particular, el microorganismo de la invención tiene una eficacia nematicida, medida como eficacia corregida en la reducción de la eclosión de huevos de *M. javanica*, determinada por medio de un ensayo *in vitro* sobre huevos de *M. javanica* usando las condiciones descritas en el Ejemplo 2 de la memoria descriptiva de, al menos, un 80 % respecto a un control; o de alrededor de un 60 % (59,80 %) respecto al producto químico (fenamifos) usado como referencia, usando las condiciones descritas en el Ejemplo 4 de la memoria descriptiva; o de alrededor del 30 % (30,24 %) usando las condiciones descritas en el Ejemplo 5 de la memoria descriptiva.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "capacidad de promover el crecimiento vegetal" se refiere a la capacidad para facilitar o estimular el desarrollo del sistema radicular de la planta, el crecimiento de los tallos y/o el desarrollo de la biomasa foliar. La capacidad (actividad) promotora del crecimiento vegetal del microorganismo de la invención (o de cualquier microorganismo cuya capacidad o actividad promotora del crecimiento vegetal va a conocerse) puede determinarse por el experto en la técnica por medio de cualquier ensayo en el que se determina un parámetro relacionado con el crecimiento de la planta, tal como altura, peso seco o peso fresco radicular, peso

seco o peso fresco aéreo, en presencia o ausencia del microorganismo en cuestión.

5 En una realización particular, la capacidad de promover el crecimiento vegetal es la capacidad de aumentar la biomasa vegetal. En el contexto de la presente invención, se entiende por "biomasa vegetal" la cantidad de materia orgánica presente en una planta, es decir, la materia orgánica que constituye tanto la parte aérea de la planta, es decir, el tallo, el tronco, las hojas, las ramas, el fruto, las inflorescencias (biomasa aérea), como la parte subterránea de la misma, es decir, raíces, bulbos, tubérculos (biomasa subterránea). La "biomasa vegetal" puede medirse como el "peso seco" o como el "peso fresco" de la planta o de determinadas partes de la planta, tal como sea apropiado.

10 Tal como se usa en el presente documento, el término "peso fresco" se refiere al peso de la planta en su totalidad o de una parte de la planta, tal como las hojas, tallos, flores y otras estructuras aéreas (peso fresco aéreo) o las raíces (peso fresco radicular).

15 Tal como se usa en el presente documento, el término "peso seco" se refiere al peso de la planta en su totalidad o de una parte de la planta, tal como las hojas, tallos, flores y otras estructuras aéreas (peso seco aéreo) o las raíces (peso seco radicular) una vez extraída toda el agua posible a través de un proceso de secado.

20 En la presente invención, se entiende por "aumento de la biomasa vegetal de una planta" el efecto sobre la planta de obtener una tasa de crecimiento mayor de 1, en donde la tasa de crecimiento (GR, del inglés "*growth rate*") se define por la fórmula:

$$GR = \text{Peso final/peso inicial.}$$

25 Tal como entenderá un experto en la técnica, en el estado de la técnica existen otros parámetros que están relacionados o bien directa o bien indirectamente con la GR y pueden usarse para determinar el crecimiento de la biomasa vegetal de una planta. Los ejemplos de dichos parámetros incluyen:

30 - la tasa de crecimiento relativo (RGR, del inglés "*relative growth rate*") o ganancia de biomasa por unidad de biomasa y tiempo, y se define por la fórmula:

$$RGR = (\ln P_2 - \ln P_1) / (t_2 - t_1)$$

35 en donde  $P_1$  y  $P_2$  son el peso de la planta en los tiempos 2 y 1 ( $t_2 - t_1$  respectivamente) [Valladares, F. 2004, Ecología del bosque mediterráneo en un mundo cambiante, páginas 191-227. Ministerio de Medio Ambiente, EGRAF, S.A., Madrid];

40 - la razón de área foliar (LAR, del inglés "*leaf area ratio*") o razón de área foliar y peso total de la planta. Se expresa en  $\text{m}^2$  (hoja)  $\text{kgkg}^{-1}$  (planta). El área foliar puede medirse por varios métodos. Existen medidores automáticos del área foliar, provistos de una cámara de video, tarjeta de digitalización y software de análisis de imagen que permiten mediciones del área (además de mediciones de otras dimensiones: anchura, longitud) de varias hojas con bastante rapidez. Otro sistema es fotocopiar o escanear las hojas y estimar el área de superficie por medio de un programa de análisis de imagen. Otra alternativa sencilla es recortar las siluetas de las hojas fotocopiadas y pesarlas, usando un recorte del mismo papel con un área de superficie conocida para calibrar la razón peso/área. Una vez medida el área de superficie de las hojas, las hojas se guardan en sobres de papel, con su identificación, se secan en un incubador y se pesan para obtener así el "peso seco";

45 - el área foliar específica (SLA, del inglés "*specific leaf area*") o razón de área foliar y peso foliar. Se expresa en  $\text{m}^2$  (hoja)  $\text{kg}^{-1}$  (hoja);

50 - la fracción media foliar (LMF, del inglés "*leaf mean fraction*") o razón de biomasa foliar y biomasa total de la planta. Se expresa como  $\text{kg}$  (hoja)  $\text{kg}^{-1}$  (planta);

55 - la tasa de asimilación neta (NAR, del inglés "*net assimilation rate*") o tasa de aumento del peso de la planta por unidad de área foliar. Se expresa en  $\text{kg}$  (planta)  $\text{m}^2$  (hoja)  $\text{día}^{-1}$ . La tasa de crecimiento relativo es igual al producto de LAR por NAR.

Otros parámetros para analizar el crecimiento incluyen:

60 - la fracción de masa del tallo (SMF, del inglés "*stem mass fraction*") o razón de biomasa del tallo y biomasa total de la planta. Se expresa en  $\text{kg}$  (tallo)  $\text{kg}^{-1}$  (planta);

- la fracción de masa radicular (RMF, del inglés "*root mass fraction*") o razón de biomasa radicular y biomasa total de la planta. Se expresa en  $\text{kg}$  (raíz)  $\text{kg}^{-1}$  (planta); y

65 - el contenido de materia seca (DM, del inglés "*dry matter*") o razón de peso seco y peso fresco de la planta.

Se expresa en kg (peso seco) kg<sup>-1</sup> (peso fresco).

Cualquier aumento significativo en cualquiera de los parámetros anteriores relacionados con el crecimiento vegetal en presencia de un microorganismo, por ejemplo, un microorganismo de la invención, con respecto al control (la misma planta en ausencia del microorganismo) indica que dicho microorganismo tiene la capacidad de promover el crecimiento vegetal.

En una realización particular, la capacidad de promover el crecimiento vegetal de un microorganismo, tal como un la invención, por ejemplo, se determina por medio de un parámetro seleccionado de altura de la planta, peso fresco radicular, peso fresco aéreo, peso seco radicular y peso seco aéreo siguiendo un método tal como el descrito en el Ejemplo 9 de la memoria descriptiva.

En una realización particular, el microorganismo de la invención tiene capacidad de promover el crecimiento vegetal de una planta de una familia seleccionada de *Musaceae*, *Fabaceae*, *Malvaceae*, *Amaranthaceae*, *Vitaceae*, *Rutaceae*, *Cucurbitaceae*, *Poaceae*, *Rubiaceae*, familias de plantas ornamentales o una familia de árboles frutales.

Tal como se usa en el presente documento, el término "*Solanaceae*" se refiere a una familia de plantas identificada en la base de datos de NCBI por Taxonomy ID: 4070. Se trata de una familia de plantas herbáceas o leñosas con hojas alternas, simples y sin estípulas, pertenecientes al orden Solanales, de las dicotiledóneas. Ejemplos ilustrativos de plantas de la familia *Solanaceae* incluyen los géneros *Solanum*, *Lycianthes*, *Cestrum*, *Nolana*, *Lycium*, *Nicotiana* y *Brunfelsia*.

El microorganismo de la invención tiene la capacidad de promover el crecimiento vegetal de una planta de la familia *Solanaceae*, preferiblemente del género *Solanum*.

Tal como se usa en el presente documento, el término "*Solanum*" se refiere a un género de plantas identificado en la base de datos de NCBI por Taxonomy ID: 4107. Ejemplos ilustrativos de plantas del género *Solanum* incluyen *S. lycopersicum* (tomate), *S. tuberosum* (patata) y *S. melongena* (berenjena).

El microorganismo de la invención tiene la capacidad de promover el crecimiento vegetal de una planta de la familia *Solanaceae*. En una realización la planta es de la especie *Solanum lycopersicum*.

Tal como se usa en el presente documento, el término "*Solanum lycopersicum*" se refiere a una especie de plantas identificada en la base de datos de NCBI por Taxonomy ID: 4081, comúnmente conocida como tomate. El término "*Solanum lycopersicum*" incluye cualquier variedad de tomate, incluyendo a modo ilustrativo *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* (tomate cherry).

En una realización particular, el microorganismo de la invención tiene la capacidad de promover el crecimiento vegetal de una planta de la especie *Solanum lycopersicum* variedad "Marmande". La variedad "Marmande" es una variedad de tomate extremadamente precoz. La planta es de tallo alto y el número de frutos por piso floral oscila entre 5 y 10; siendo dichos frutos de tamaño grande, aplanados y estriados, y tienen un color rojo brillante.

Tal como se usa en el presente documento, el término "*Musaceae*" se refiere a una familia de plantas identificada en la base de datos de NCBI por Taxonomy ID: 4637. Los ejemplos ilustrativos de plantas de la familia *Musaceae* incluyen los géneros *Musa* y *Ensete*. En una realización particular, la semilla pertenece al género *Musa* (Taxonomy ID: 4640) al que pertenecen diferentes especies productoras de bananas.

Tal como se usa en el presente documento, el término "*Fabaceae*" se refiere a una familia de plantas, comúnmente conocidas como leguminosas, identificada en la base de datos de NCBI por Taxonomy ID: 3803. En una realización particular, la planta pertenece al género *Glycine*. En una realización incluso más particular, la planta pertenece a la especie de planta *Glycine max* (Taxonomy ID: 3847) que produce soja.

Tal como se usa en el presente documento, el término "*Malvaceae*" se refiere a una familia de plantas identificada en la base de datos de NCBI por Taxonomy ID: 3629. En una realización particular, la planta pertenece al género *Gossypium* (Taxonomy ID: 3847), al que pertenecen diferentes especies productoras de algodón.

Tal como se usa en el presente documento, el término "*Amaranthaceae*" se refiere a una familia de plantas identificada en la base de datos de NCBI por Taxonomy ID: 3563. En una realización particular, la planta pertenece al género *Beta*, más específicamente a la especie de planta *Beta vulgaris* (Taxonomy ID: 161934) que produce remolacha.

Tal como se usa en el presente documento, el término "*Vitaceae*" se refiere a una familia de plantas identificada en la base de datos de NCBI por Taxonomy ID: 3602. En una realización particular, la planta pertenece al género *Vitis*, más concretamente a la especie de planta *Vitis vinifera* (Taxonomy ID: 29760) que produce uvas.

Tal como se usa en el presente documento, el término "*Rutaceae*" se refiere a una familia de plantas identificada en

la base de datos de NCBI por Taxonomy ID: 23513. En una realización particular, la planta pertenece al género *Citrus* (Taxonomy ID: 2706) formado por diferentes especies de plantas productoras de cítricos tales como naranjas, limones, pomelos y limas.

5 Tal como se usa en el presente documento, el término "*Cucurbitaceae*" se refiere a una familia de plantas identificada en la base de datos de NCBI por Taxonomy ID: 3650. Los ejemplos ilustrativos de plantas de la familia *Cucurbitaceae* cuyas semillas pueden usarse para obtener la semilla suplementada de la invención incluyen los géneros *Cucurbita* (plantas productoras de calabaza y calabacín), *Lagenaria*, *Citrullus* (plantas productoras de sandía), *Cucumis* (plantas productoras de pepino y melón) y *Luffa*. En una realización particular, la planta pertenece a la familia *Cucurbitaceae*.

10 Tal como se usa en el presente documento, el término "*Poaceae*" se refiere a una familia de plantas identificada en la base de datos de NCBI por Taxonomy ID: 4479. Los ejemplos ilustrativos de plantas de esta familia son plantas productoras de trigo, cebada, arroz o maíz.

15 Tal como se usa en el presente documento, el término "*Rubiaceae*" se refiere a una familia de plantas identificada en la base de datos de NCBI por Taxonomy ID: 24966. En una realización particular, las plantas de la familia *Rubiaceae* son plantas que producen café.

20 Tal como se usa en el presente documento, el término "ornamental" se refiere a plantas que se cultivan y comercializan con propósitos decorativos dadas sus características estéticas, tales como flores, hojas, aroma, textura de su follaje, frutos o tallos en jardines, una planta de interior o una flor cortada. Los ejemplos ilustrativos de familias incluidas en esta definición son *Liliaceae* (que incluye especies de tulipanes, dracaena o azucena), *Iridiaceae* (que incluye especies de los géneros *Crocus*, *Iris* o *Gladiolus*), *Amaryllidaceae* (que incluye especies tales como un narciso), *Rosaceae* (que incluye especies de rosas) o *Geraniae* (que incluye especies de geranios).

25 Tal como se usa en el presente documento, el término "árbol frutal" se refiere a cualquier árbol leñoso o vid que produce una fruta de interés agrícola o industrial. El término "fruta" se refiere a una parte de una planta con flores que se deriva de tejidos específicos de la flor y no se limita a frutas culinarias. Los ejemplos ilustrativos de árboles frutales cuyas semillas pueden usarse para obtener la semilla suplementada de la invención incluyen aguacate, almendro, banano o platanera, cerezo, ciruelo, cítricos, albaricoquero, melocotonero, durián, naranjo, guindo, mango, manzano, membrillo, níspero, nogal y peral.

35 En un segundo aspecto, la invención se refiere a un cultivo biológicamente puro del microorganismo de la invención, en el que el cultivo biológicamente puro comprende dicho microorganismo en una proporción del 95 % o más en comparación con otros organismos presentes en dicho cultivo.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "cultivo biológicamente puro" se refiere a un cultivo en el que el microorganismo de la invención se encuentra en una proporción del 95 % o más, por ejemplo el 96 % o más, el 97 % o más, el 98 % o más, el 99 % o más o el 100 %, en comparación con otros organismos presentes en el cultivo. Tal como se usa en el presente documento, el término "cultivo" se refiere a una población de los microorganismos de la invención. Un cultivo puede comprender otros elementos además de los microorganismos de la invención, tal como el medio de cultivo o cualquier otra sustancia que pueda añadirse al medio de cultivo que sea beneficiosa para el crecimiento o mantenimiento del cultivo. El término "medio de cultivo" o "medio" se reconoce en la técnica, y se refiere en general a cualquier sustancia o preparación que se usa para el cultivo de las células vivas. Tal como se utiliza en referencia a un cultivo celular, el término "medio" incluye los componentes del entorno que rodea a las células. El medio puede ser sólido, líquido, gaseoso o una mezcla de las fases y materiales. Los medios de crecimiento incluyen medios de cultivo líquidos, así como medios líquidos que no soportan el crecimiento celular. El medio también incluye medios gelatinosos tales como agar, agarosa, gelatina y matrices de colágeno. Los medios gaseosos a modo de ejemplo incluyen la fase gaseosa a la que las células que crecen en una placa de Petri u otro soporte sólido o semisólido están expuestas. El término "medio" también se refiere a material que debe usarse en un cultivo celular, incluso si todavía no se ha puesto en contacto con las células. En otras palabras, un líquido rico en nutrientes preparado para cultivo bacteriano es un medio. Asimismo, una mezcla en polvo que cuando se mezcla con agua o con otro líquido se convierte en adecuada para el cultivo celular puede denominarse "medio en polvo".

40 "Medio definido" se refiere a los medios constituidos por componentes que tienen una constitución química definida (generalmente purificada). Los medios definidos no contienen extractos biológicos que no estén completamente caracterizados, tales como extracto de levadura y caldo de carne. "Medio rico" incluye medios diseñados para soportar el crecimiento de la mayoría o todas las formas viables de una especie en particular. Los medios enriquecidos incluyen a menudo extractos biológicos complejos. Cualquier medio de cultivo convencional adecuado para *L. enzymogenes* conocido en la técnica puede usarse en la presente invención, tal como, por ejemplo, caldo nutritivo compuesto por extracto de carne (3 g/l) y peptona de soja (5 g/l); o medio TSB compuesto por triptona (17 g/l), peptona de soja (3 g/l), NaCl (5 g/l), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (2,5 g/l) y glucosa (2,5 g/l). En una realización particular, el medio de cultivo que puede formar parte del cultivo biológicamente puro de la invención está compuesto por: extracto de levadura (5 g/l), triptona (10 g/l) y cloruro de sodio (10 g/l).

65 Biomasa y método para la obtención de biomasa

El microorganismo de la invención puede usarse en forma de una biomasa de dicho microorganismo multiplicado en cultivo en métodos para el control biológico de nematodos, o para prevenir o tratar la infección de una planta provocada por nematodos, o para promover el crecimiento vegetal de una planta.

5 Por tanto, en un tercer aspecto, la invención se refiere a un método para obtener una biomasa del microorganismo de la invención, que comprende cultivar dicho microorganismo en el medio de cultivo en condiciones constantes de temperatura, pH y oxigenación, en el que la temperatura está comprendida entre 25°C y 35°C, el pH está comprendido entre 5,0 y 9,0 y la oxigenación se logra por medio de agitación a velocidades de entre 200 y 500 rpm y/o suministrando aire estéril a un caudal fijo de entre 0,5 y 1,5 vvm.

Tal como se usa en el presente documento, el término "biomasa" se refiere al material biológico de organismos vivos, en particular del microorganismo de la invención.

15 Las condiciones adecuadas para el crecimiento del microorganismo de la invención serán aquellas condiciones que permitan el mantenimiento y la multiplicación del microorganismo. En una realización particular, dichas condiciones comprenden cultivar el microorganismo de la invención en presencia de un medio de cultivo o sustrato que contiene una o varias fuentes de carbono, una o varias fuentes de nitrógeno y sales inorgánicas y orgánicas a concentraciones adecuadas para obtener rendimientos de biomasa máximos. Dicho medio o sustrato puede ser sólido o líquido. Las fuentes de carbono consisten en monosacáridos, polisacáridos, cereales o extractos vegetales. Las fuentes de nitrógeno comprenden hidrolizados de proteínas vegetales, peptonas o aminoácidos libres, puros o mezclados. Las sales son sulfatos o fosfatos de elementos tales como Na, Ca, Mg, Fe, K. En una realización particular, el medio de cultivo o sustrato contiene entre 1 y 5 fuentes de carbono, entre 1 y 5 fuentes de nitrógeno y entre 1 y 10 sales.

25 Las condiciones adecuadas para el crecimiento del microorganismo de la invención comprenden cultivar el microorganismo en el medio de cultivo en condiciones constantes de temperatura, pH y oxigenación. La temperatura está comprendida entre 25°C y 35°C, preferiblemente es 30°C. El pH está comprendido entre 5,0 y 9,0, preferiblemente entre 6,0 y 8,0, más preferiblemente 7,0. La oxigenación se consigue por medio de agitación a velocidades de entre 200 y 500 rpm y/o suministrando aire estéril a un caudal fijo de entre 0,5 y 1,5 v.v.m; preferiblemente a velocidades de entre 200 y 300 rpm y/o suministrando aire estéril a un caudal fijo de entre 0,8 y 1,2 v.v.m; más preferiblemente la oxigenación se consigue por medio de agitación durante 24 horas a una velocidad de 250 rpm y/o suministrando aire estéril a un caudal fijo de 1,0 v.v.m.

35 El tiempo durante el cual debe mantenerse el microorganismo en condiciones adecuadas para su crecimiento es el tiempo necesario para que el microorganismo alcance una concentración correspondiente a una conversión de sustrato en biomasa mínima del 80 %. En una realización particular, dicho tiempo de crecimiento para alcanzar estos rendimientos está entre 1 y 10 días.

40 Una vez finalizada la etapa de crecimiento del microorganismo, la biomasa obtenida puede recuperarse del sustrato agotado aplicando una o varias operaciones unitarias que pueden comprender centrifugación, decantación, filtración o una combinación de varias de estas operaciones. Por tanto, en una realización particular, el método para obtener la biomasa del microorganismo de la invención comprende adicionalmente una etapa para separar la biomasa del sustrato. En una realización incluso más particular, dicha biomasa se separa del sustrato por medio de una o más etapas de centrifugación, decantación o filtración, o una combinación de las mismas.

En una realización particular, tras la separación de la biomasa del sustrato, la biomasa puede secarse usando condiciones de baja temperatura y/o presión para retirar la humedad de la biomasa. En una realización más particular, dichas condiciones son de entre 18 y 25°C y entre 266,644731 y 799,934192 Pa (entre 2 y 6 mm de Hg).

50 Por medio del método del tercer aspecto, se obtiene una biomasa del microorganismo de la invención. Por tanto, en un cuarto aspecto, la invención se refiere a una biomasa del microorganismo de la invención obtenible por medio del método según el tercer aspecto.

#### 55 Producto fitosanitario y semilla suplementada

En un quinto aspecto, la invención se refiere a un producto fitosanitario que comprende el microorganismo de la invención, el cultivo biológicamente puro de la invención o la biomasa de la invención, y un excipiente agrícolamente aceptable.

60 Tal como se usa en el presente documento, el término "producto fitosanitario" se refiere a todas las sustancias destinadas a la protección de cultivos y el control de plagas y enfermedades de los mismos.

65 Tal como se usa en el presente documento, el término "excipiente agrícolamente aceptable" se refiere a cualquier sustancia o combinación de sustancias que puede usarse en el sector agrícola, e incluye cualquier material líquido o sólido agrícolamente aceptable que pueda añadirse y/o mezclarse con el microorganismo, cultivo biológicamente

puro o biomasa de la invención, para ponerlo en una forma de aplicación más sencilla o mejorada, o con una intensidad de activación aplicable o deseable. Debido a la naturaleza del principio activo de la composición agrícola (microorganismo de la invención), dicho vehículo agrícolamente aceptable tiene que permitir, o no perjudicar ni comprometer, la viabilidad y la capacidad de control de dicho microorganismo.

El producto fitosanitario de la invención comprende, como principio activo técnico con actividad nematocida y promotora del crecimiento, el microorganismo de la invención, el cultivo de la invención o la biomasa de la invención. Dicho producto fitosanitario de la invención se corresponde con uno o varios tipos de formulaciones de productos fitosanitarios descritas actualmente en el manual de la FAO/OMS en estado sólido o líquido que comprenden polvos humectables (WP), dispersiones oleosas (OD), gránulos encapsulados (CG), suspensiones de cápsulas (CS), concentrados o gránulos emulsionables (EC/EG), gránulos (GR), microgránulos (MG), microemulsiones (ME), gránulos dispersables en agua (WG).

La formulación consiste de una cantidad adecuada de principio activo técnico de *Lysobacter enzymogenes* para garantizar una concentración de entre  $10^3$ - $10^{15}$  UFC/g de producto, mezclada con sustancias orgánicas o inorgánicas, conocidas como excipientes, que le aportan las características técnicas necesarias para cumplir con los estándares de la FAO/OMS (fitosanitario o nutricional) y con un disolvente o portador para ajustar la concentración. Los excipientes comprenden sustancias iónicas o aniónicas con actividad tensioactiva, actividad dispersante, actividad humectante, actividad desecante y actividad antiaglomerante, entre otras. Consisten en ésteres alquil-sulfúricos, sulfonatos de alquilarilo, alquil aril éteres, alcoholes etoxilados, ácidos grasos etoxilados, éteres de polietilenglicol, azúcares de ácido, sales de potasio de ácidos grasos, sales de sodio de ácidos grasos, carragenina, carboximetilcelulosa, goma xantana, ácido lignosulfónico, lignosulfonatos de calcio, magnesio y zinc, óxido de silicio, bentonitas, glicerina, óxidos de magnesio, calcio, aluminio, hierro, entre otros. La formulación en estado sólido usa como portador o disolvente una o varias sustancias tales como serita, caolines, tierra de diatomeas, tierras ácidas, salvado de cereales, glutamato monosódico, glucosa, dextrosa, lactosa, sacarosa. La formulación en estado líquido usa como portador o disolvente una o varias sustancias tales como aceites vegetales, aceites parafínicos ligeros, ésteres de polietilenglicol con ácidos grasos saturados o insaturados, glicerina vegetal.

El producto fitosanitario de la invención puede contener además, si se desea, otros ingredientes o constituyentes comúnmente usados en productos fitosanitarios, tales como, pero sin limitarse a, disolventes, agentes activos o reguladores del pH, fertilizantes, siempre y cuando todos ellos permitan o no perjudiquen ni comprometan la viabilidad del microorganismo presente en el producto fitosanitario. Dichos ingredientes o constituyentes comúnmente usados en los productos fitosanitarios los conocen generalmente los expertos en la técnica.

El producto fitosanitario de la invención puede obtenerse por métodos convencionales basados, generalmente, en el mezclado de cantidades adecuadas los distintos componentes de la composición agrícola.

En un sexto aspecto, la invención se refiere a una semilla suplementada, a continuación en el presente documento semilla suplementada de la invención, que comprende una semilla y, además, el microorganismo de la invención, o el cultivo biológicamente puro de la invención, o la biomasa de la invención, o el producto fitosanitario de la invención. Dicha semilla puede ser una semilla de cualquier planta de interés agronómico, forestal, alimenticio (para alimentación humana o animal), aplicaciones ornamentales, aplicaciones energéticas.

En una realización particular, la semilla suplementada de la invención comprende una semilla de una planta de una familia seleccionada de *Solanaceae*, *Fabaceae*, *Malvaceae*, *Amaranthaceae* y *Cucurbitaceae*. En una realización más particular, la semilla suplementada de la invención comprende una semilla de una planta del género *Solanum*. En una realización incluso más particular, la semilla suplementada de la invención comprende una semilla de una planta de la especie *Solanum lycopersicum*. En una realización todavía más particular, la semilla suplementada de la invención comprende una semilla de una planta de la especie *Solanum lycopersicum* variedad "Marmande".

Los términos "*Solanaceae*", "*Fabaceae*", "*Malvaceae*", "*Amaranthaceae*", "*Cucurbitaceae*", así como realizaciones preferidas y particulares de los mismos, se han definido previamente en relación con el microorganismo de la invención.

El microorganismo de la invención puede recubrir total o parcialmente la semilla.

Dicha semilla suplementada de la invención puede obtenerse por métodos convencionales; a modo ilustrativo, puede obtenerse sumergiendo la semilla en una suspensión o cultivo puro del microorganismo de la invención o, alternativamente, pulverizando dicha suspensión o cultivo sobre la semilla. Otros métodos comprenden mezclar la semilla y el microorganismo de la invención previamente incorporado a un soporte sólido inerte que facilite la adhesión del microorganismo de la invención a dicha semilla.

Además, puede usarse un adhesivo de tipo agrícola que contiene una concentración adecuada de dicho microorganismo, tal como un gel o polímero de tipo orgánico, tal como goma arábica, polímeros de alginato, metilcelulosa, para mejorar la adhesión del microorganismo de la invención a la semilla. Por tanto, en una realización particular, la semilla suplementada de la invención está soportada, unida o adherida a un adhesivo, tal como un

adhesivo agrícolamente aceptable, por ejemplo, un polímero orgánico que es inerte para el microorganismo de la invención (por ejemplo, goma arábiga, alginato, metilcelulosa, etc.).

Procedimiento para controlar biológicamente un nematodo

En un séptimo aspecto, la invención se refiere a un método para controlar biológicamente un nematodo que comprende aplicar a dicho nematodo un microorganismo según el primer aspecto, un cultivo biológicamente puro según el segundo aspecto, una biomasa según el cuarto aspecto o un producto fitosanitario según el quinto aspecto, en el que el método no es un método de tratamiento del cuerpo humano o animal.

El nematodo no está ubicado en un animal o en un ser humano. En otra realización, el nematodo no está ubicado en un animal vivo o en un ser humano vivo.

Tal como se usa en el presente documento, el término “controlar biológicamente un nematodo” se refiere al uso de organismos vivos para controlar la población de nematodos, es decir, controlar su desarrollo, reproducción, número de individuos., o bien directamente (por la acción de los organismos usados como agentes de control biológico) o bien indirectamente (como resultado de los compuestos producidos por dichos organismos). El control biológico de nematodos puede implicar destruir nematodos o impedir que los nematodos se desarrollen. Tal como se usa en el presente documento, controlar biológicamente nematodos también cubre controlar la progenie de los nematodos (desarrollo de quistes viables y/o masas de huevos).

El método según el séptimo aspecto comprende aplicar a los nematodos que van a controlarse biológicamente un microorganismo según el primer aspecto, un cultivo biológicamente puro según el segundo aspecto, una biomasa según el cuarto aspecto o un producto fitosanitario según el quinto aspecto.

El término “nematodo” ha sido previamente definido, así como realizaciones particulares y preferidas del mismo. En una realización particular, el nematodo es un nematodo parásito de plantas. En una realización particular, el nematodo se selecciona de los géneros *Meloidogyne*, *Globodera*, *Heterodera*, *Pratylenchus*, *Tylenchulus*, *Radophulus* y *Xiphinema*. En una realización incluso más particular, el nematodo se selecciona de los géneros *Meloidogyne* y *Globodera*. En una realización todavía más particular, el nematodo es *Meloidogyne javanica*.

La puesta en contacto del nematodo que va a controlarse biológicamente con el microorganismo, cultivo, biomasa o producto fitosanitario de la invención puede llevarse a cabo por cualquier técnica o método adecuado, usando aparatos, equipos y dispositivos adecuados. El experto en la técnica conoce las técnicas y métodos, así como los aparatos, equipos y dispositivos adecuados para la aplicación de agentes de control biológico. El método según el séptimo aspecto puede llevarse a cabo aplicando el microorganismo, cultivo, biomasa o producto fitosanitario de la invención directamente sobre el nematodo, en el hábitat del nematodo, por ejemplo en el suelo donde va a cultivarse o se cultiva una planta, en la planta susceptible de ser atacada por dicho nematodo o sobre una semilla de una planta susceptible de ser atacada por dicho nematodo. El microorganismo, cultivo, biomasa o producto fitosanitario de la invención también puede aplicarse por medio de sistemas de riego manual o automatizado.

En una realización particular, el método según el séptimo aspecto comprende adicionalmente el uso de un fungicida, un nematicida o un insecticida de suelo.

Tal como se usa en el presente documento, el término “fungicida” se refiere a agentes con la capacidad de aumentar la mortalidad o inhibir la tasa de crecimiento de los hongos, y también la capacidad de inhibir la germinación de esporas de hongos. Los ejemplos ilustrativos de fungicidas incluyen:

- Compuestos de cobre: cloruro de cobre, oxiclорuro de cobre, óxido cúprico, “caldo bordelés”, quinolinolato de cobre-8, carbonato de cobre básico, naftenato de cobre, sulfato de cobre, cromato de cobre, oleato de cobre.
- Compuestos de mercurio: Calomel (cloruro mercurioso), óxido mercúrico, lactato de mercurio, mercuram (acetato fenilmercúrico), MEMC (cloruro metoxietilmercúrico), PMA (acetato fenilmercúrico).
- Compuestos de estaño: acetato de fentina (acetato de trifenilestaño), cloruro de fentina (cloruro de trifenilestaño), óxido de butilestaño, Plictran (hidróxido de triclorohexilestaño).
- Compuestos de zinc: cloruro, cromato, naftenato y oleato de zinc.
- Compuestos metálicos: permanganato de potasio, cloruro de cadmio, sulfato ferroso, neo-asozin (arsonato monometilférico), rizoctol (sulfito de metilarsénico), urbacid, naftaleno de cromo.
- Compuestos de azufre: sofril, cal de azufre.

- Compuestos organofosforados: pirazofos, IBP/kitazina, edifenfos, ditalimfos.
- Ditiocarbamatos: zineb, maneb, mancoceb, nabam, tiram, ferbam, bunema, vapam, metiram, metilmetiram.
- 5 • Carbamatos: tiofanato, metiltiofanato.
- Hidrocarburos halogenados: 1,1-diclorometano, dibromometano, bromometano, cloropicrina, tetracloruro de carbono, p-diclorobenceno, hexaclorobenceno, cloroneb, bromuro de dodecilamonio, hexaclorofeno, pentaclorofenol, isobac (sal monosódica de hexaclorofeno).
- 10 • Nitrocompuestos aromáticos: dinitrofenol, nitrodifenilo, DNOC (4,6-dinitro-o-cresol), dinobuton, tecnaceno, binapacril, dinocap, nirit, brassicol (pentacloronitrobenceno).
- Quininas: cloranil, diclona, benzoquinona, ditianona.
- 15 • Anilidas: benodanil, pirocarbolid, carboxina, oxicarboxina, salicilanilida.
- Compuestos de guanidina: donina (acetato de dodecilguanidina), guzatina.
- 20 • Ftalimidias: folpet, captan, captafol, clorotanolino, dimetakion.
- Pirimidinas: dimetirimol, etirimol, bupirimato.
- Tiodiazoles: dazomet, terrazole, milneb.
- 25 • Triazinas: anilazina, triadimefon.
- Isoxazolonas: himexazol, drazoxolon.
- 30 • Imidazoles: gliodina, bencmil, tiabendazol, triflorina, carbendazim.
- Otros compuestos heterocíclicos: tridemorf, quinometionato.
- Antibióticos: blasticidina, gliotoxina, griseofulvina, polioxina, fitobacteriomicina, kasugamicina, validamicina.
- 35 • Aceites: antraceno, naftenato de amonio.
- Aldehídos, cetonas, óxidos: formaldehído, p-formaldehído, alcohol alílico, óxido de etileno, óxido de propileno.
- 40 • Extractos vegetales: comercializados como fitofortificantes u OMDF (otros medios de defensa fitosanitaria).
- Otros: rodamina, Trapex® (isocianato de metilo), diclofuanid, fenaminosulf.
- 45 • Productos biológicos: *Trichoderma* (Tusal®), *Streptomyces* (Actinovate®).

Tal como se usa en el presente documento, el término “nematicida” se refiere a agentes con capacidad de inhibir la eclosión de huevos y/o paralizar formas larvarias en cualquiera de sus estadios y/o formas adultas o de impedir que los nematodos se desarrollen. Los ejemplos ilustrativos de nematicidas que pueden usarse en el método para controlar biológicamente un nematodo incluyen:

- Fumigantes: D-D (mezcla de 1,2-dicloropropano y 1,3-dicloropropeno); dibromuro de etileno; 1,2-dibromo-3-cloropropano; bromuro de metilo; cloropicrina (nitrocloroformo); metam sodio (metilditiocarbamato de sodio); Dazomet (3,5-dimetil-1,3,5-tiadiazinano-2-tiona); isotiocianato de metilo (MITC); tetratiocarbonato de sodio.
- 55 • Carbamatos: aldicarb (2-metil-2-(metiltio)propanal O-(N-metilcarbamoil)oxima); aldoxicarb ((E)-(2-metil-2-metilsulfonilpropiliden)amino]N-metilcarbamato); carbofurano (2,2-dimetil-2,3-dihidro-1-benzofuran-7-ilmetilcarbamato); (metil-2-(dimetilamino)-N-[(metilcarbamoil)oxi]-2-oxoetanimidato de oxamilo).
- 60 • Organofosfatos: etoprop (S,S-dipropilfosforoditioato de O-etilo); femanifos (til-3-metil-4-(metiltio)fenil(1-metiletil)fosforamidato); cadusafos (S,S-di-sec-butilfosforoditioato de O-etilo); fosfiazato ((RS)-2-oxo-1,3-tiazolidin-3-ilfosfonotioato de S-sec-butilo y O-etilo); tionazina (fosforotioato de O,O-dietilo y O-2-pirazinilo); fostietano (1,3-

ditietan-2-ilidenfosforamidato de dietilo); isazofos (O,O-dietilfosforotioato de O-5-cloro-1-isopropil-1H-1,2,4-triazol-3-ilo).

- Agentes bioquímicos: DiTera® (mezcla de compuestos producidos por el hongo parásito de nematodos *Myrothecium verrucaria*), Cladosan® (producto obtenido de exoesqueletos de cangrejo y langostas, rico en quitina y urea), Sincoin® (mezcla de extractos de higo chumbo *Opuntia lindheimeri*, roble *Quercus falcata*, zumaque *Rhus aromatica* y mangle *Rhizophora mangle*).

- Productos biológicos: esporas del hongo *Paecilomyces lilacinus* (BioAct®, Biostat®), *Bacillus firmus* (Flocter®).

Tal como se usa en el presente documento, el término “insecticida de suelo” se refiere a un agente capaz de matar, controlar y/o repeler insectos cuyo ciclo de vida incluye un estadio en el suelo. Los ejemplos ilustrativos de insecticidas de suelo incluyen: aldrina (hexaclorohexahidro-endo-exodimetanonaftaleno); dieldrina (hexacloroepoxi-octahidro-endo-exo-dimetanonaftaleno); clorodano (octacloro-4,7-metanotetrahidro-indano); Temik® (Aldicarb: 2-metil-2-(metiltio)propanal-O-(N-metilcarbamoil)oxima); carbofurano (2,3-dihidro-2,2-dimetil-7-benzofurano-metilcarbamato); Landrin® (metilcarbamato de trimetilfenilo); clorfenvinfos (2-cloro-1-(2,4-diclorofenil)vinildietilfosfato); Phorato® (O,O-dietil-S-[(etiltio)metil]fosforoditioato); Terburox® (S-terc-butiltiometil-O-O-dietilfosforoditioato); productos biológicos tales como el hongo *Beauveria bassiana* (Botanigard®, Naturalis®), esporas del hongo *Paecilomyces fumosoroseus* (NoFly®, PreFeRal®), *Bacillus thuringiensis* (Dipel®).

Procedimiento para prevenir la infección de una planta provocada por un nematodo y procedimiento para tratar una planta infectada por un nematodo

En un octavo aspecto, la invención se refiere a un método para prevenir la infección de una planta provocada por un nematodo, que comprende aplicar una cantidad eficaz de un microorganismo según el primer aspecto, un cultivo biológicamente puro según el segundo aspecto, una biomasa según el cuarto aspecto o un producto fitosanitario según el quinto aspecto sobre dicha planta, sobre la semilla de dicha planta o en el suelo que rodea a dicha planta, o alternativamente plantar una semilla de dicha planta suplementada con un microorganismo según el primer aspecto, un cultivo biológicamente puro según el segundo aspecto, una biomasa según el cuarto aspecto o un producto fitosanitario según el quinto aspecto.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión “prevenir la infección de una planta provocada por un nematodo” se refiere a cualquier actividad que previene, impide, retarda o retrasa la infección de la planta provocada por un nematodo.

El término “nematodo” se ha definido anteriormente. En una realización preferida, el nematodo es un nematodo parásito de plantas. En una realización más preferida, el nematodo parásito de plantas se selecciona de los géneros *Meloidogyne*, *Globodera*, *Heterodera*, *Pratylenchus*, *Tylenchulus* y *Radophulus*. En una realización incluso más particular, el nematodo parásito de plantas es del género *Meloidogyne*. En una realización todavía más particular, el nematodo parásito de plantas es *Meloidogyne javanica*.

Tal como se usa en el presente documento, el término “planta” se refiere a cualquier ser vivo que pertenece al reino *Plantae* (en el sentido más estricto) que incluye seres vivos eucariotas con capacidad fotosintética, sin capacidad locomotora y cuyas paredes celulares se componen principalmente de celulosa. En el sentido más estricto, el término *Plantae* incluye el clado *Embryophyta* (plantas terrestres: vasculares y no vasculares (briófitas)) que comprende: hepáticas, antoceros, musgos, licopodiófitos y plantas con semilla (gimnospermas y angiospermas). En la presente invención este término se refiere a especies del taxón *Angiospermae*.

En una realización particular, la planta pertenece a una familia seleccionada de *Solanaceae*, *Musaceae*, *Fabaceae*, *Malvaceae*, *Amaranthaceae*, *Vitaceae*, *Rutaceae*, *Cucurbitaceae*, *Poaceae*, *Rubiaceae*, familias de plantas ornamentales o una familia de árboles frutales. Todas estas familias, así como realizaciones particulares de las mismas, se han descrito anteriormente.

En una realización preferida, la planta pertenece a la familia *Solanaceae*. En una realización más preferida, la planta de la familia *Solanaceae* pertenece al género *Solanum*. En una realización incluso más preferida, la planta del género *Solanum* es *Solanum lycopersicum*. En una realización todavía más preferida, la planta del género *Solanum* es *Solanum lycopersicum* variedad “Marmande”. Los términos “*Solanum*”, “*Solanum lycopersicum*” y “*Solanum lycopersicum* variedad “Marmande”” se han descrito anteriormente.

La prevención de la infección de una planta provocada por un nematodo puede llevarse a cabo sobre la planta una vez que se ha plantado o sobre la semilla de dicha planta antes de que se plante. Por tanto, el método según el octavo aspecto comprende las siguientes alternativas:

(i) Aplicar una cantidad eficaz del microorganismo, cultivo biológicamente puro, biomasa o producto fitosanitario de la invención sobre dicha planta, sobre la semilla de dicha planta o en el suelo que rodea a dicha planta.

Tal como se usa en el presente documento, el término “cantidad eficaz” se refiere a la cantidad necesaria para estabilizar, impedir, retardar o retrasar la progresión de estadios de desarrollo del nematodo en cuestión en la planta y obtener, de ese modo, resultados beneficiosos o deseados. El término “cantidad eficaz” hace referencia a la cantidad mínima de microorganismo en UFC totales, independientemente de si se encuentra en forma de un cultivo, una biomasa o una formulación de producto fitosanitario. La cantidad eficaz del microorganismo, cultivo biológicamente puro, biomasa o producto fitosanitario que puede aplicarse sobre la planta para prevenir, retrasar o reducir la infección provocada por un nematodo puede variar dentro de un amplio intervalo y puede determinarla el experto en la técnica teniendo en cuenta, entre otros factores, el tipo de planta y el tipo de nematodo. En una realización particular, la planta es de la familia *Solanaceae*, preferiblemente una planta del género *Solanum*, incluso más preferiblemente de la especie *Solanum lycopersicum*, incluso más preferiblemente de la variedad “Marmande”, y el nematodo es un nematodo del género *Meloidogyne*, más preferiblemente de la especie *Meloidogyne javanica*, en cuyo caso la cantidad eficaz del microorganismo de la invención está comprendida entre  $1 \times 10^5$  UFC y  $1 \times 10^{12}$  UFC, preferiblemente entre  $1 \times 10^8$  UFC y  $1 \times 10^{11}$  UFC.

La cantidad eficaz puede aplicarse en una única administración o en varias administraciones. Cuando se aplica en varias administraciones, estas pueden ser 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aplicaciones en las que la aplicación 4 se aplica 10-20 días después de la aplicación 3, y más preferiblemente 15-20 días después de la aplicación 3. En una realización particular, la cantidad eficaz del microorganismo, cultivo biológicamente puro, biomasa o producto fitosanitario de la invención se realiza en varias aplicaciones: se aplica en una primera aplicación antes del trasplante de la planta, en una segunda aplicación después del trasplante de la planta y, al menos, un número “n” de aplicaciones, en donde “n” es un número entero comprendido entre 1 y 10, en donde cada una de dichas “n” aplicaciones se aplica entre 10 y 20 días después de la aplicación precedente, más preferiblemente entre 15 y 20 días después de la aplicación precedente.

En una realización incluso más particular, la cantidad eficaz del microorganismo, cultivo biológicamente puro, biomasa o producto fitosanitario de la invención se realiza en tres aplicaciones: una primera aplicación antes del trasplante de la planta, una segunda aplicación después del trasplante y la tercera después de la segunda aplicación. En una realización más particular, la segunda aplicación se realiza entre 10 y 20 días después del trasplante, preferiblemente 15 días después del trasplante. En una realización incluso más particular, la cantidad eficaz del microorganismo, cultivo biológicamente puro, biomasa o producto fitosanitario de la invención se realiza en cuatro aplicaciones: una primera aplicación antes del trasplante de la planta, una segunda aplicación después del trasplante de la planta, una tercera aplicación después de la segunda aplicación y una cuarta aplicación después de la tercera aplicación. En una realización todavía más particular, la tercera aplicación se realiza entre 10 y 20 días después de la segunda aplicación, preferiblemente 15 días después de la segunda aplicación. En una realización todavía más particular, la cuarta aplicación se realiza entre 10 y 20 días después de la tercera aplicación, preferiblemente 15 días después de la tercera aplicación.

La cantidad eficaz del microorganismo, cultivo biológicamente puro, biomasa o producto fitosanitario de la invención puede aplicarse sobre la planta, sobre la semilla de la planta o en el suelo que rodea a la planta.

Si se aplica sobre la planta, la aplicación puede hacerse sobre la totalidad de la planta o sobre algunas partes de la planta, por ejemplo, en la base del tallo, en el área que ocupan las raíces, tubérculos y bulbos. La cantidad eficaz del microorganismo, cultivo biológicamente puro, biomasa o producto fitosanitario de la invención puede aplicarse sobre la planta por cualquier técnica o método adecuado, utilizando aparatos, equipos y dispositivos adecuados. El experto en la técnica conoce las técnicas y métodos, así como los aparatos, equipo y dispositivos adecuados para la aplicación de agentes de control biológico sobre plantas. En una realización particular, el microorganismo, cultivo o biomasa de la invención se formula en forma de un producto fitosanitario adecuado para su administración a una planta por cualquier técnica o método convencional y usando cualquier dispositivo convencional, por ejemplo, pulverizando, espolvoreando o por cualquier otro método de administración agrícola adecuado, por ejemplo por medio de cebos, incorporación en el suelo o en sistemas de riego automatizados o manuales.

La aplicación también puede tener lugar sobre la semilla de la planta. Tal como se usa en el presente documento, el término “semilla” se refiere a cualquier estadio de reposo de una planta que se separa físicamente de la fase vegetativa de la planta y/o que puede almacenarse durante periodos de tiempo más o menos prolongados y/o que puede usarse para hacer que otra planta individual de la misma especie crezca de nuevo. En este caso, la aplicación puede realizarse antes o durante la plantación de la semilla en el suelo. El experto en la técnica conoce técnicas adecuadas para administrar un agente de control biológico tal como el microorganismo, cultivo, biomasa o producto fitosanitario de la invención a una semilla de una planta.

La aplicación también puede tener lugar en el suelo que rodea a la planta. En una realización particular, la administración se realiza cerca del cuello de la raíz de la planta. El experto en la técnica conoce técnicas adecuadas para administrar un agente de control biológico tal como el microorganismo, cultivo, biomasa o producto fitosanitario de la invención al suelo que rodea a una planta.

En un aspecto particular, la aplicación también puede tener lugar sobre un nematodo susceptible de infectar a la

planta. En ese caso, la aplicación del microorganismo, cultivo, biomasa o producto fitosanitario de la invención sobre el nematodo susceptible de infectar a la planta se lleva a cabo poniendo en contacto dicho nematodo con el microorganismo, cultivo, biomasa o producto fitosanitario de la invención por medio de cualquiera de las técnicas o métodos descritos en relación con el método para controlar biológicamente un nematodo según el séptimo aspecto.

(ii) Plantar una semilla de dicha planta suplementada con un microorganismo, cultivo biológicamente puro, biomasa o producto fitosanitario de la invención.

La semilla que se ha suplementado con un microorganismo, cultivo biológicamente puro, biomasa o producto fitosanitario de la invención se ha descrito anteriormente.

Tal como se usa en el presente documento, el término “plantar” se refiere a colocar una semilla en un terreno preparado para que germine, dando lugar al desarrollo de una planta. La semilla suplementada de la invención puede plantarse por medio de cualquier técnica adecuada para plantar semillas de una planta. Dichas técnicas las conoce el experto en la técnica.

En un noveno aspecto, la invención se refiere a un método para tratar una planta infectada por un nematodo que comprende aplicar una cantidad eficaz de un microorganismo según el primer aspecto, un cultivo biológicamente puro según el segundo aspecto, una biomasa según el cuarto aspecto o un producto fitosanitario según el quinto aspecto sobre dicha planta o sobre el suelo que rodea a dicha planta.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión “tratar una planta infectada por un nematodo” se refiere a realizar cualquier actividad dirigida a retardar, detener o reducir la progresión de la infección provocada por un nematodo, o mejorar al menos un síntoma de dicha infección. Se entiende que retardar o detener la progresión de la infección significa obtener los resultados beneficiosos o deseados, incluyendo pero sin limitarse a, reducción de los síntomas, reducción de la duración de la enfermedad, estabilización de los estados patológicos (específicamente para prevenir un deterioro adicional), retraso de la progresión de la enfermedad, mejora del estado patológico y remisión (tanto parcial como total). El control de la progresión de la enfermedad también implica una prolongación de la supervivencia, en comparación con la supervivencia esperada si no se aplicara el tratamiento.

Los términos “planta”, “nematodo” y “cantidad eficaz” se han descrito anteriormente. Los métodos para aplicar el microorganismo, cultivo, biomasa o producto fitosanitario de la invención sobre la planta o sobre el suelo que rodea a la planta se han descrito anteriormente.

Las realizaciones particulares del método del octavo aspecto también se aplican al noveno aspecto.

En una realización particular, la planta tratada por medio del método del noveno aspecto pertenece a la familia *Solanaceae*.

En una realización particular del método del noveno aspecto, la cantidad eficaz de un microorganismo según el primer aspecto, un cultivo biológicamente puro según el segundo aspecto, una biomasa según el cuarto aspecto o un producto fitosanitario según el quinto aspecto se aplica una primera vez antes del trasplante de la planta y una segunda vez después del trasplante de la planta.

En una realización particular, el método según el octavo o el noveno aspecto comprende adicionalmente el uso de un fungicida, nematicida o insecticida de suelo. Los términos “fungicida”, “nematicida” e “insecticida de suelo”, así como realizaciones particulares de los mismos, se han descrito anteriormente.

#### Método para estimular el crecimiento de una planta

En un décimo aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para estimular el crecimiento de una planta que comprende aplicar una cantidad eficaz de un microorganismo según el primer aspecto, un cultivo biológicamente puro según el segundo aspecto, una biomasa según el cuarto aspecto o un producto fitosanitario según el quinto aspecto sobre dicha planta, sobre la semilla de dicha planta o en el suelo que rodea a dicha planta, o alternativamente plantar una semilla de dicha planta suplementada con un microorganismo según el primer aspecto, un cultivo biológicamente puro según el segundo aspecto, una biomasa según el cuarto aspecto o un producto fitosanitario según el quinto aspecto.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión “estimular el crecimiento de una planta” se refiere a la capacidad para facilitar o estimular el desarrollo del sistema radicular de la planta, el crecimiento de los tallos, la floración de la planta. La actividad promotora del crecimiento vegetal por parte del microorganismo de la invención puede determinarla el experto en la técnica por medio de cualquier ensayo en el que se determina un parámetro relacionado con el crecimiento de la planta, tal como altura, peso seco o peso fresco radicular, peso seco o peso fresco aéreo, en presencia o ausencia del microorganismo de la invención tal como se describió anteriormente.

El término “planta”, así como realizaciones particulares y preferidas del mismo, se ha descrito anteriormente.

La estimulación del crecimiento de una planta puede llevarse a cabo sobre la planta una vez que se ha plantado o sobre la semilla de dicha planta antes de que se plante. Por tanto, el método según el décimo aspecto comprende las siguientes alternativas:

(i) Aplicar una cantidad eficaz del microorganismo, cultivo biológicamente puro, biomasa o producto fitosanitario de la invención sobre dicha planta, sobre la semilla de dicha planta o en el suelo que rodea a dicha planta.

Tal como se usa en el presente documento, el término “cantidad eficaz” se refiere a la cantidad necesaria para producir en la planta el efecto deseado, específicamente, estimular o promover el crecimiento de la planta. El término “cantidad eficaz” hace referencia a la cantidad mínima de UFC del microorganismo total independientemente de si está en forma de un cultivo, biomasa o formulación de producto fitosanitario. La cantidad eficaz del microorganismo, cultivo biológicamente puro, biomasa o producto fitosanitario que puede aplicarse sobre la planta para promover el crecimiento de dicha planta puede variar dentro de un amplio intervalo y puede determinarla el experto en la técnica teniendo en cuenta, entre otros factores, el tipo de planta. En una realización particular, la planta es de la familia *Solanaceae*, preferiblemente una planta del género *Solanum*, incluso más preferiblemente de la especie *Solanum lycopersicum*, incluso más preferiblemente de la variedad “Marmande”, en cuyo caso la cantidad eficaz del microorganismo de la invención está comprendida entre  $1 \times 10^7$  UFC y  $1 \times 10^{12}$  UFC, preferiblemente entre  $1 \times 10^8$  UFC y  $1 \times 10^{11}$  UFC.

La cantidad eficaz puede aplicarse en una única administración o en varias administraciones, tal como se describió anteriormente en relación con el método para prevenir la infección de una planta provocada por un nematodo.

La cantidad eficaz del microorganismo, cultivo biológicamente puro, biomasa o producto fitosanitario de la invención puede aplicarse sobre la planta, sobre la semilla de la planta o en el suelo que rodea a la planta tal como se describió anteriormente en relación con el método para prevenir la infección de una planta provocada por un nematodo.

(ii) Plantar una semilla de dicha planta suplementada con un microorganismo, cultivo biológicamente puro, biomasa o producto fitosanitario de la invención.

La semilla que se ha suplementado con un microorganismo, cultivo biológicamente puro, biomasa o producto fitosanitario de la invención se ha descrito anteriormente.

El término “plantar” también se ha descrito anteriormente.

En una realización particular, el método según el décimo aspecto comprende adicionalmente el uso de un fungicida, nematicida, insecticida de suelo o promotor del crecimiento vegetal. Los términos “fungicida”, “nematicida” e “insecticida de suelo”, así como realizaciones particulares de los mismos, se han descrito anteriormente.

Tal como se usa en el presente documento, el término “promotor del crecimiento vegetal” se refiere a un agente que es capaz de estimular el crecimiento de la planta y por tanto ayudar a la planta a resistir frente a otras plagas y/o enfermedades. Los ejemplos ilustrativos de promotores de crecimiento vegetal incluyen: *Azotobacter chroococcum* y *Bacillus megaterium*; *Azotobacter vinelandii*; *Azotobacter vinelandii*, *Bacillus licheniformis* y *Bacillus megaterium*; *Bacillus licheniformis*; *Bacillus licheniformis* más *Bacillus pumilus*; *Bacillus pumilus*; *Bacillus sp.*; *Bacillus velezensis*; formononetina; *Lactobacillus* y otras bacterias; *Paecilomyces lilacinus*; *Pseudomonas fluorescens* más *Pseudomonas putida*; *Trichoderma hamatum* más *Trichoderma koningii*; *Trichoderma hamatum* más *Trichoderma longibrachiatum*; *Trichoderma harzianum*; *Trichoderma koningii* más bacterias de la rizosfera; *Trichoderma viride*; Bionema plus®; Biobalance®.

## Ejemplos

Los siguientes ejemplos ilustran la invención y deben considerarse en un sentido ilustrativo de la misma.

### Ejemplo 1

#### Producción y caracterización de *Lysobacter enzymogenes* cepa MR B25

##### Producción

La cepa MR B25 de *Lysobacter enzymogenes* se aisló de una planta de pimiento recolectada/procedente de un campo gestionado según prácticas de agricultura ecológica ubicado en Gavá, Barcelona, en septiembre de 2011.

Para su aislamiento, las raíces se desinfectaron en la superficie por inmersión en una disolución de hipoclorito de sodio al 5 % durante 5 minutos y 3 lavados posteriores en agua destilada estéril. La desinfección se verificó sembrando en placas de Petri con medio de cultivo de agar de dextrosa de patata (PDA: extracto de patata, 4 g/l;

5 dextrosa, 20 g/l; agar 15 g/l) y agar nutritivo (NA: extracto de carne, 1 g/l, extracto de levadura 2 g/l, peptona de soja 5 g/l, cloruro de sodio 5 g/l y agar 15 g/l). Una vez desinfectadas, se sometieron a rotura mecánica en tampón fosfato por medio de un mortero previamente esterilizado. La disolución resultante se filtró a través de un matraz Kitasato para eliminar los fragmentos de raíz. Entonces se realizaron diluciones en serie de desde  $10^0$  hasta  $10^{-5}$  y se sembraron en placas de PDA, NA y CZAPEK (sacarosa (30 g/l),  $\text{NaNO}_3$  (3 g/l),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,5 g/l), KCl (0,5 g/l),  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,01 g/l),  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (1 g/l) y agar (13,5 g/l)). Estas placas se incubaron en un incubador a  $26^\circ\text{C}$  y se observaron a diario. Cada una de las colonias que creció (bacterias u hongos) volvió a sembrarse en placas nuevas con el mismo medio del que procedían hasta obtener cultivos puros de los microorganismos seleccionados. Finalmente, los aislados se separaron del medio raspando la placa en peptona de soja con glicerol al 10 %, dando lugar a la generación 0 de cada microorganismo, que se almacenó a  $-80^\circ\text{C}$ .

### Caracterización

15 La cepa se ha caracterizado a nivel morfológico y molecular. Para la caracterización morfológica, la bacteria se incubó en un medio general [agar nutritivo (NA)] a 2 temperaturas ( $26^\circ\text{C}$  y  $32^\circ\text{C}$ ) y se observaron las características de las colonias.

#### Caracterización morfológica:

20 *Lysobacter enzymogenes* cepa MR B25 es un bacilo Gram-negativo. Tiene una colonia con un diámetro de 3 mm tras 96 horas de crecimiento en placas de Petri con medio NA en un incubador bacteriológico a una temperatura constante de  $26^\circ\text{C}$ . Las colonias resultantes son colonias medianas, redondas con poco relieve y ligeramente rugosas. Cuando se hacen crecer a  $26^\circ\text{C}$ , las colonias tienen aspecto opaco con una coloración amarilla cremosa, mientras que a  $32^\circ\text{C}$  forma colonias de color amarillo brillante en el centro con un anillo cremoso exterior (figura 1).

25

#### Caracterización molecular:

La identificación molecular de *Lysobacter enzymogenes* cepa MR B25 se realizó por medio de la amplificación de la subunidad 16S del ADN ribosómico con el uso de los cebadores:

30 DIRECTO: 8-f (AGTTTGATCCTGGCTCAG) (SEQ ID NO: 1) e

INVERSO: 1492-r (ACGGTTACCTTGTTACGACTT) (SEQ ID NO: 2).

35 La búsqueda de secuencias coincidentes se realizó usando el software BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) y los resultados mostraron que la secuencia amplificada estaba dentro de la especie *Lysobacter enzymogenes*.

La secuencia obtenida del fragmento amplificado por estos cebadores (SEQ ID NO: 3) se muestra a continuación:

```
CGGCAGCACAGNGGAGCTTGCTCCTTGGGTGGCGAGTGGCGGACGGGTGAGGAATACGTCGGAA
TCTGCCATTTGTGGGGGATAACGTAGGGAACTTACGCTAATACCGCATAACGACCTACGGGTG
AAAGTGGGGGACCGCAAGGCCTCACGCAGATAGATGAGCCGACGTCGGATTAGCTAGTTGGCGG
GGTAAAGGCCACCAAGGCGACGATCCGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAC
TGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCC
TGATCCAGCCATGCCCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTTGTCCGGAAG
AAAAGCTTAGGGTTAATAACCTTGAGTCATGACGGTACCGGAAGAATAAGCACCGGCTAAC TTC
GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGTGCAAGCGTTACTCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGT
GCGTAGGTGGTTTGTAAAGTCTGATGTGAAAGCCCTGGGCTCAACCTGGGAATGGCATTGGAAA
CTGGCTTACTAGAGTGCGGTAGAGGGTAGCGGAATTCCCAGGTAGCAGTGAAATGCGTAGATA
TCGGGAGGAACATCTGTGGCGAAGGCGGCTACCTGGACCAGCACTGACACTGAGGCACGAAAGC
GTGGGGAGCAAACAGGATTAGATAACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGCGAACTGGATGTT
GGGGCAACTTGGCCCTCAGTATCGAAGCTAACCGGTTAAGTTCGCCGCCNGGGAAGTACGGTC
GCAAGACTGAAACTCNGGAATTGACGGGGGCCNGCACAAGCGGTGGAGTATGTGGTTTAATTC
NATGCANCGGAAGAACCTTACCTGGCCTTGACNTGTGAGAACTTTNCA (SEQ ID NO:
```

3)

**Ejemplo 2**Actividad nematocida *in vitro* de *Lysobacter enzymogenes* cepa MR B25 frente a huevos de *Meloidogyne javanica*

## Materiales y métodos

Ensayo sobre huevos:

La capacidad nematocida *in vitro* de la bacteria *L. enzymogenes* cepa MR B25 sobre huevos de *M. javanica* se evaluó en las cámaras de eclosión (placas de múltiples pocillos Nunclon™ Surface, Nunc, Dinamarca) en las que se habían añadido 2 g de suelo previamente esterilizado. Entonces se inoculó el sustrato con una suspensión acuosa que contenía 350 huevos de *M. javanica*. El agente de control biológico *L. enzymogenes* cepa MR B25 se aplicó a  $1 \times 10^{10}$  UFC/ml.

La cámara de eclosión se incubó a 26°C durante 3 semanas y se tomaron lecturas periódicas a las 24 h después de la aplicación del agente de control biológico y 1, 2 y 3 semanas después para determinar el porcentaje de eclosión. Se incluyeron ocho repeticiones de cada tratamiento, un control negativo con un producto químico de referencia a la dosis comercialmente recomendada (Nemacur® 0,0125 %; principio activo: fenamifos) y un control con agua destilada estéril para establecer una referencia para los resultados con respecto al porcentaje de eclosión normal.

## Resultados y discusión

Tabla 1.- Eficacia ( %) corregida respecto al control del producto químico usado como referencia y *L. enzymogenes* cepa MR B25 frente a huevos de *M. javanica*.

Tratamientos	Eficacia (%)
Nemacur® (Fenamifos)	67,59
<i>L. enzymogenes</i> MR B25	80,70

En el seguimiento de la eclosión de huevos de *M. javanica* durante los 21 días de duración del ensayo, el tratamiento con *L. enzymogenes* cepa MR B25 mostró una reducción significativa respecto al control (figura 2).

Tres semanas después de la aplicación de los distintos tratamientos, el 37,55 % de los huevos no tratados (control) eclosionaron, mientras que de los tratados con *L. enzymogenes* cepa MR B25 eclosionaron el 7,25 % y el 12,17 % de los tratados con Nemacur® (producto químico de referencia).

Por tanto, *L. enzymogenes* cepa MR B25 tiene una eficacia de reducción de la eclosión del 80,70 % respecto al control en condiciones *in vitro*, mientras que en el producto químico de referencia, la eficacia en la reducción de la eclosión fue del 67,59 %, es decir, un 13,11 % menos que con un microorganismo objeto de la presente invención (*L. enzymogenes* cepa MR B25) (figura 3).

**Ejemplo 3**Actividad nematocida *in vitro* de *Lysobacter enzymogenes* cepa MR B25 frente a juveniles de *Meloidogyne javanica*

## Materiales y métodos

La capacidad nematocida de la bacteria *L. enzymogenes* cepa MR B25 se evaluó *in vitro* frente a huevos de *M. javanica* en cámaras de eclosión (placas de múltiples pocillos Nunclon™ Surface, Nunc, Dinamarca), en las que se añadieron 2 g de suelo previamente esterilizado. Entonces se añadió una suspensión acuosa que contenía 200 formas juveniles de *M. javanica* y el agente de control biológico, *L. enzymogenes* cepa MR B25, se aplicó a  $1 \times 10^{10}$  UFC/ml ( $1 \times 10^{10}$  UFC/ml). La cámara de eclosión se incubó a 26°C durante 7 días y se realizaron recuentos por medio de la cámara Hawksley® después de 24 horas (1 día) y después de 7 días para determinar el número de juveniles vivos ( % de mortalidad). Se incluyeron un control con agua destilada estéril y otro control con un producto químico de referencia (Nemacur® 0,0125 %: principio activo = fenamifos). Se realizaron ocho repeticiones de cada tratamiento.

## Resultados y discusión

Tabla 2.- Eficacia ( %) corregida respecto al control de *L. enzymogenes* MR B25 y del producto químico usado como

referencia frente a juveniles de *M. javanica*.

Tratamientos	Eficacia (%)	
	1 día	7 días
Nemacur® (Fenamifos)	96,72	100
<i>L. enzymogenes</i> MR B25	95,62	100

5 *L. enzymogenes* cepa MR B25 muestra unos porcentajes de mortalidad de juveniles corregidos respecto al control del orden del 96 % 24 horas después de su aplicación. No existen diferencias significativas respecto al producto químico de referencia usado (figura 4).

10 **Ejemplo 4**

Comparación de la actividad nematocida *in vitro* de *Lysobacter enzymogenes* cepa MR B25 y cepa B322 frente a huevos de *Meloidogyne javanica*. La cepa B322 es una cepa de referencia

15 Materiales y métodos

Ensayo sobre huevos:

20 La capacidad nematocida de la bacteria *L. enzymogenes* cepa MR B25 y de *L. enzymogenes* cepa B322 se evaluó *in vitro* frente a huevos de *M. javanica* en cámaras de eclosión (placas de múltiples pocillos Nunclon™ Surface, Nunc, Dinamarca), en las que se añadieron 2 g de suelo previamente esterilizado. Entonces se añadió una suspensión acuosa correspondiente a 650 huevos de *M. javanica* y los agentes de control biológico *L. enzymogenes* cepa MR B25 y *L. enzymogenes* cepa B322 se aplicaron a una concentración de 2,96x10<sup>10</sup> UFC/ml (2,96E+10 UFC/ml) y 2,86x10<sup>10</sup> UFC/ml (2,86E+10 UFC/ml), respectivamente. La cámara de eclosión se incubó a 26°C durante 7 días y se realizaron recuentos por medio de la cámara Hawksley® 24 horas y 1, 2, 3 y 4 semanas después de la aplicación de los agentes de control biológico, para determinar el porcentaje de eclosión. Se incluyeron un control con agua destilada estéril y otro con un producto químico de referencia (Nemacur® 0,0125 %: principio activo: fenamifos). Se realizaron ocho repeticiones de cada tratamiento.

30 Resultados y discusión

Tabla 3.- Comparación de la eficacia ( %) corregida respecto al control de dos cepas de *L. enzymogenes*, MR B25 y B322 y del producto químico usado como referencia.

Tratamientos	Eficacia (%)
Nemacur® (Fenamifos)	62,03%
<i>L. enzymogenes</i> MR B25 2,96E+10	59,80%
<i>L. enzymogenes</i> B322 2,86E+10	25,17%

35 Los datos sobre la evolución de la eclosión durante los 28 días de duración del experimento muestran claras diferencias entre ambas cepas de *L. enzymogenes* (figura 5). La cepa MR B25 tiene unos niveles de control del orden del producto químico usado como referencia, mientras que la cepa B322 tiene unos niveles más cercanos al control sin tratar.

40 El porcentaje de eficacia obtenido por la cepa MR B25 no tiene diferencias estadísticamente significativas respecto al producto químico usado como referencia y sí frente a la otra cepa de *L. enzymogenes* (B322) usada para este ensayo, que muestra un porcentaje de eficacia del 25 % (figura 6), casi un 35 % menos que la cepa objeto de esta invención. Tal como se demuestra mediante los resultados de este experimento, el elevado efecto nematocida de la cepa MR B25 de *L. enzymogenes* no es una propiedad de todas las cepas de la especie *L. enzymogenes*, sino que es característico de la cepa MR B25 objeto de la presente invención.

45 **Ejemplo 5**

50 Comparación de la actividad nematocida *in vitro* de *Lysobacter enzymogenes* cepa MR B25 y cepa B322 y sus respectivos metabolitos frente a huevos de *Meloidogyne javanica*. La cepa B322 es una cepa de referencia.

## Materiales y métodos

El objetivo de este ensayo era verificar que la actividad nematocida de *L. enzymogenes* MR B25 es un rasgo característico de la cepa y no de la especie, además de demostrar que la acción de control sobre nematodos fitopatógenos se debe fundamentalmente al microorganismo y no a los posibles metabolitos liberados al medio por el microorganismo.

Después de 24 horas de crecimiento de *L. enzymogenes* cepa MR B25 y B322 en medio LB en condiciones óptimas de crecimiento de la especie, se separó la biomasa por medio de centrifugación obteniéndose el sedimento de ambas cepas. Entonces se esterilizaron los sobrenadantes de ambos cultivos a través de filtración en un matraz Kitasato por medio de un filtro de 0,2 µm para eliminar cualquier célula bacteriana que hubiera podido quedar en el caldo.

### Ensayo sobre huevos:

La capacidad nematocida de la bacteria *L. enzymogenes* cepa MR B25 y cepa B322 y sus respectivos metabolitos se evaluó *in vitro* frente a huevos de *M. javanica* en cámaras de eclosión (placas de múltiples pocillos Nunclon™ Surface, Nunc, Dinamarca), en las que se añadieron 2 g de suelo previamente esterilizado. Entonces se añadió una concentración correspondiente a 500 huevos de *M. javanica*. Se sometieron a ensayo 4 tratamientos: 2 de estos tratamientos se realizaron con los sedimentos de *L. enzymogenes* cepa MR B25 y *L. enzymogenes* cepa B322, a una concentración de  $6,8 \times 10^8$  UFC/ml ( $6,8E+08$  UFC/ml) y  $3,2 \times 10^8$  UFC/ml ( $3,2E+08$  UFC/ml), respectivamente; y los otros 2 tratamientos se realizaron con los metabolitos obtenidos de la fermentación de ambas cepas, en los que se añadieron 200 µl de la disolución. La cámara de eclosión se incubó a 26°C durante 7 días y se realizaron recuentos por medio de la cámara Hawksley® 24 horas y 1, 2, 3 y 4 semanas después de la aplicación de los tratamientos, para determinar el porcentaje de eclosión de huevos de nematodos. Se incluyeron un control con agua destilada estéril y otro control con el medio de cultivo estéril usado para el crecimiento de las bacterias. Se realizaron seis repeticiones de cada tratamiento.

## Resultados y discusión

Tabla 4.- Eficacias obtenidas en los diferentes tratamientos corregidas respecto a sus correspondientes controles.

Tratamientos	Eficacia (%)
Biomasa de <i>L. enzymogenes</i> MR B25 $6,8E+08$	30,24
Biomasa de <i>L. enzymogenes</i> B322 $3,2E+08$	12,47
Metabolitos de <i>L. enzymogenes</i> MR B25	9,08
Metabolitos de <i>L. enzymogenes</i> B322	4,58

Los datos sobre la evolución de la eclosión muestran diferencias entre *L. enzymogenes* MR B25 y el control y *L. enzymogenes* cepa B322 después del día 7. En el caso de los metabolitos, cuando se comparan los resultados con el medio de cultivo de control (control de VEG), no se observan diferencias en ningún punto del experimento (figura 7).

La biomasa de *L. enzymogenes* MR B25 muestra una eficacia en el control de *M. javanica* del 30 %, con diferencias estadísticamente significativas respecto a la eficacia obtenida por la biomasa de la cepa B322 (tabla 4 y figura 8). A su vez, los metabolitos obtenidos de la fermentación de ambas cepas muestran porcentajes de eficacia corregida respecto al control del medio de cultivo (control de VEG) inferiores a los obtenidos por la biomasa corregida respecto al control. Esto puede deberse a que la acción nematocida de la cepa MR B25 se debe al microorganismo y no a las posibles sustancias liberadas al medio de cultivo usado, mostrando también diferencias estadísticamente significativas entre la eficacia obtenida por la biomasa de *L. enzymogenes* MR B25 y sus metabolitos.

Según los resultados obtenidos en este ensayo, puede inferirse que la acción nematocida está ejercida fundamentalmente por el microorganismo y no por sus metabolitos, aunque dichos metabolitos pueden formar parte del modo de acción del microorganismo. Nuevamente se demuestra que esta actividad no puede atribuirse a todas las cepas de la especie *L. enzymogenes*.

## Ejemplo 6

### Actividad nematocida *in vivo* de *Lysobacter enzymogenes* cepa MR B25 frente a *Meloidogyne javanica*

#### Materiales y métodos

La capacidad nematocida *in vivo* de la bacteria *L. enzymogenes* cepa MR B25 se evaluó en la variedad de tomate

“Marmande” frente a juveniles de *M. javanica*. Cada tratamiento consistió en 12 repeticiones y cada una se inoculó con 1.000 juveniles. El calendario del ensayo es tal como sigue:

Tabla 5: Plan de aplicaciones de *Lysobacter enzymogenes* cepa MR B25 en un ensayo *in vivo* frente a *M. javanica*

Día 0	Día 3	Día 4	Día 11	Día 21
Tratamiento preventivo	Trasplante	Inoculación de nematodos	1ª Aplicación	2ª Aplicación

Las plantas se colocaron en macetas de 1.000 cm<sup>3</sup> y se trataron con 10 ml de una disolución acuosa que contenía *L. enzymogenes* cepa MR B25 en el tratamiento preventivo y con 15 ml en la 1ª y 2ª aplicación después del trasplante.

Las concentraciones de microorganismo usadas para el tratamiento fueron:

Tabla 6.- Concentración de la disolución acuosa que contenía *L. enzymogenes* cepa MR B25 en cada aplicación.

Concentración	Tratamiento preventivo	1ª Aplicación	2ª Aplicación
UFC/ml	5,5E+08	4,8E+08	4,8E+08

El producto químico de referencia fue Namacur® (fenamifos) al 1,2 %. También se incluyó un control con agua destilada estéril.

La duración del ensayo fue de 2 meses. Después de dicho tiempo, se evaluaron los diferentes parámetros para verificar la actividad nematocida del microorganismo:

- Reproducción: N.º de huevos/g de raíz
- Fertilidad: N.º de huevos/masa
- Infectividad: N.º de masas/planta
- Altura
- Peso fresco aéreo
- Peso fresco radicular

La evaluación de los 3 últimos parámetros también ayuda a determinar la capacidad promotora del crecimiento vegetal del microorganismo, si es que existe.

#### Resultados y discusión

Tabla 7.- Eficacia ( %) en reproducción, fertilidad e infectividad obtenida por *L. enzymogenes* MR B25 y el control químico corregido respecto al control.

TRATAMIENTOS	Eficacia de reproducción (%)	Eficacia de infectividad (%)	Eficacia de fertilidad (%)
Namacur® (Fenamifos)	91,94	80,52	-41,06
<i>L. enzymogenes</i> MR B25	73,81	64,95	69,54

Los resultados obtenidos en este ensayo muestran que *L. enzymogenes* cepa MR B25 tiene actividad nematocida frente a *M. javanica* comparable a la del control químico usado como referencia, con una eficacia del 73,81 % (figura 9). Ambos tratamientos tienen diferencias estadísticamente significativas respecto al control.

Además los datos de fertilidad e infección, que se usan para determinar la acción del microorganismo en adultos de *M. javanica*, también muestran diferencias estadísticamente significativas respecto al control. *L. enzymogenes* MR B25 reduce el número de masas formadas por hembras adultas en la raíz además del número de huevos en cada masa, disminuyendo de ese modo también la capacidad del parásito para provocar infección (figuras 10 y 11).

Además, se demuestra una importante actividad promotora del crecimiento, tanto en altura como en biomasa aérea, con diferencias estadísticamente significativas con el control absoluto y el producto químico de referencia para todos los parámetros evaluados (figura 12).

**Ejemplo 7**Actividad nematocida *in vivo* de diferentes dosis de *Lysobacter enzymogenes* cepa MR B25 frente a *Meloidogyne javanica*

5 Materiales y métodos

La capacidad nematocida de la bacteria *L. enzymogenes* cepa MR B25 a diferentes dosis se evaluó *in vivo* en plantas de tomate de la variedad “Marmande” frente a juveniles de *M. javanica* población “Murcia”. Cada tratamiento consistió en 10 repeticiones y cada una de ellas se inoculó con 900 juveniles. El calendario del ensayo fue tal como sigue:

Tabla 8.- Plan de aplicaciones de *L. enzymogenes* cepa MR B25 en un ensayo *in vivo* frente a *M. javanica*

Día 0	Día 3	Día 4	Día 11	Día 21
Tratamiento preventivo	Trasplante	Inoculación de nematodos	1 <sup>er</sup> Tratamiento	2 <sup>o</sup> Tratamiento

Las plantas se colocaron en macetas de 1.000 cm<sup>3</sup> y se trataron con 10 ml de una disolución con *L. enzymogenes* cepa MR B25 en el tratamiento preventivo y con 15 ml en el 1<sup>er</sup> y 2<sup>o</sup> tratamiento después del trasplante.

20 Los tratamientos se detallan a continuación:

Tabla 9.- Resumen de los tratamientos aplicados en el ensayo.

Tratamiento	Tipo	Dosis		
		1 <sup>a</sup> Aplicación	2 <sup>a</sup> Aplicación	3 <sup>a</sup> Aplicación
Control	Agua destilada estéril	-	-	-
BIOSTAT® 0,2 g/planta	Formulación de referencia	0,2 g/planta 1x10 <sup>7</sup>	0,2 g/planta 1x10 <sup>7</sup>	0,2 g/planta 1x10 <sup>7</sup>
<i>L. enzymogenes</i> MR B25 1x10 <sup>8</sup> UFC/ml	Principio activo de grado técnico	7,1x10 <sup>8</sup> (7,10E+08)	5,50x10 <sup>8</sup> (5,50E+08)	3,10x10 <sup>8</sup> (3,10E+08)
<i>L. enzymogenes</i> MR B25 1x10 <sup>7</sup> UFC/ml	Principio activo de grado técnico	8,40x10 <sup>7</sup> (8,40E+07)	7,40x10 <sup>7</sup> (7,40E+07)	2,40x10 <sup>7</sup> (2,40E+07)
<i>L. enzymogenes</i> MR B25 1x10 <sup>6</sup> UFC/ml	Principio activo de grado técnico	7,90x10 <sup>6</sup> (7,90E+06)	6,10x10 <sup>6</sup> (6,10E+06)	2,40x10 <sup>6</sup> (2,40E+06)

25 El producto de referencia aplicado fue BIOSTAT® WP a 0,2 g/planta, un producto biopesticida formulado a partir de esporas del hongo *Purpureocillium lilacinum* cepa PL11, y se incluyó un control con agua destilada estéril.

30 2 meses después de la primera aplicación, se evaluaron los diferentes parámetros para verificar la actividad nematocida y promotora del crecimiento, si es que existe:

- Reproducción: N.º de huevos/g de raíz
- Altura
- Peso fresco aéreo

## Resultados y discusión

40 Tabla 10.- Tabla que muestra los resultados de la eficacia nematocida de *L. enzymogenes* B25 a diferentes dosis corregida respecto al control.

Tratamientos	% de eficacia
Biostat® WP 0,2 g/planta	41,26%
<i>L. enzymogenes</i> MR B25 7,10E+08	43,49%
<i>L. enzymogenes</i> MR B25 8,40E+07	25,87%
<i>L. enzymogenes</i> MR B25 7,90+E06	-5,17%

La actividad nematocida de *L. enzymogenes* MR B25 es dependiente de dosis tal como se muestra en la figura 13, donde puede concluirse que la dosis eficaz de *L. enzymogenes* MR B25 es  $1 \times 10^8$  UFC/ml. No existen diferencias estadísticamente significativas entre el tratamiento con *L. enzymogenes* MR B25 y el producto biológico usado como referencia (figura 13).

Los resultados obtenidos en este ensayo demuestran nuevamente la capacidad promotora del crecimiento de la bacteria *L. enzymogenes* MR B25. En la evaluación de los pesos fresco y seco aéreos, se observa un aumento de la biomasa en las plantas tratadas con la bacteria a las diferentes dosis evaluadas (figura 14).

### Ejemplo 8

Comparación de la actividad nematocida *in vivo* de *Lysobacter enzymogenes* cepa MR B25 y cepa B322 frente a juveniles de *Meloidogyne javanica*. La cepa B322 es una cepa de referencia.

Materiales y métodos

La capacidad nematocida de la bacteria *L. enzymogenes* cepa MR B25 y cepa B322 se evaluó *in vivo* en plantas de tomate de la variedad "Marmande" frente a juveniles de *M. javanica* población "Sevilla". Cada tratamiento consistió en 10 repeticiones y cada una de ellas se inoculó con 1.600 juveniles. El calendario del ensayo fue tal como sigue:

Tabla 11.- Plan de aplicaciones de *L. enzymogenes* cepa MR B25 en un ensayo *in vivo* frente a *M. javanica*

Día 0	Día 3	Día 4	Día 11	Día 21
Tratamiento preventivo	Trasplante	Inoculación de nematodos	1 <sup>er</sup> Tratamiento	2 <sup>o</sup> Tratamiento

Las plantas se colocaron en macetas de 1.000 cm<sup>3</sup> y se trataron con 10 ml de una disolución con *L. enzymogenes* cepa MR B25 y con *L. enzymogenes* cepa B322 en el tratamiento preventivo y con 15 ml en el 1<sup>er</sup> y 2<sup>o</sup> tratamiento después del trasplante.

Los tratamientos se detallan a continuación:

Tabla 12.- Resumen de los tratamientos aplicados en el ensayo

Tratamiento	Tipo	Dosis		
		1 <sup>o</sup> Aplicación	2 <sup>o</sup> Aplicación	3 <sup>o</sup> Aplicación
CONTROL	Agua destilada estéril	-	-	-
BIOSTAT®	Formulación de referencia	0,2 g/planta $1 \times 10^7$	0,2 g/planta $1 \times 10^7$	0,2 g/planta $1 \times 10^7$
<i>L. enzymogenes</i> MR B25 $1 \times 10^8$	SEDIMENTO	$3,20 \times 10^8$ (3,20E+08)	$2,10 \times 10^8$ (2,10E+08)	$3,30 \times 10^8$ (3,30E+08)
<i>L. enzymogenes</i> B322 $1 \times 10^8$	SEDIMENTO	$2,36 \times 10^8$ (2,36E+08)	$2,70 \times 10^8$ (2,70E+08)	$3,80 \times 10^8$ (3,80E+08)

El producto de referencia aplicado fue BIOSTAT® WP a 0,2 g/planta, un producto biopesticida formulado a partir de esporas de *Purpureocillium lilacinum* PL11, y se incluyó un control con agua destilada estéril.

La duración del ensayo fue de 2 meses, tiempo tras el cual se evaluaron los siguientes parámetros:

- Reproducción: N.º de huevos/g de raíz
- Fertilidad: N.º de huevos/masa

- Infectividad: N.º de masas/planta

## Resultados y discusión

Tabla 13.- Resultados de la actividad nematocida de *L. enzymogenes* cepa MR B25 en comparación con la cepa B322

Tratamientos	Eficacia
BIOSTAT® ( <i>P. lilacinum</i> PL11)	38,20%
<i>L. enzymogenes</i> MR B25	37,41%
<i>L. enzymogenes</i> B322	4,24%

*L. enzymogenes* cepa B25 tiene una eficacia de casi el 40 % (figura 15) con respecto al control del nematodo fitopatógeno *M. javanica* en este ensayo, mostrando diferencias estadísticamente significativas frente a la otra cepa de *L. enzymogenes* (B322) evaluada, lo que demuestra que la actividad nematocida de *L. enzymogenes* MR B25 es característica de la cepa y no de la especie. Además, no muestra diferencias estadísticamente significativas con respecto al producto biológico usado como referencia. Los porcentajes de eficacia obtenidos en este ensayo son ligeramente inferiores a los obtenidos en ensayos anteriores debido a la mayor presión de patógenos usada (1.600 juveniles en comparación con los 900 juveniles inoculados en otros ensayos).

El análisis de los datos de infectividad y fertilidad muestran que *L. enzymogenes* MR B25 reduce considerablemente el número de masas/planta y el número de huevos/masa, reduciendo de ese modo la capacidad de *M. javanica* de provocar infección. Los datos muestran que existen diferencias estadísticamente significativas respecto a la otra cepa de *L. enzymogenes* usada (B322) y respecto a *P. lilacinum* PL11 (figuras 16 y 17).

## Ejemplo 9

Actividad promotora del crecimiento *in vivo* de *Lysobacter enzymogenes* cepa MR B25 en plantas de tomate

### Materiales y métodos

Para evaluar la capacidad promotora del crecimiento, se plantaron 25 semillas de tomate de la variedad "Marmande" en bandejas con celdas que tenían 20 ml de capacidad, con sustrato empobrecido (turba al 10 % y vermiculita:perlita (3:1)). Se depositaron en una cámara climática en condiciones controladas de luz, temperatura y humedad hasta completar el estadio de cotiledón, momento en el cual se aplicó principio activo de grado técnico de *L. enzymogenes* MR B25 a una concentración de  $2,83 \times 10^7$  UFC/ml ( $2,83 \text{ E}+07$ UFC/ml) en un volumen total de 5 ml/celda (=semilla). Se incluyó además un control absoluto de agua destilada estéril. El ensayo tuvo una duración de 2 meses. Después de este periodo de tiempo, las plantas del tratamiento y el control se procesaron para evaluar los siguientes parámetros:

- Altura
- Peso fresco aéreo
- Peso fresco radicular
- Peso seco aéreo
- Peso seco radicular

### Resultados y discusión

*L. enzymogenes* cepa MR B25 promueve el crecimiento vegetal con diferencias estadísticamente significativas respecto al control tanto para el parámetro de altura (figura 18) como para el parámetro de peso aéreo y radicular (figuras 19 y 20).

## Ejemplo 10 (Ejemplo comparativo)

Comparación de la actividad nematocida *in vitro* e *in vivo* de *Pseudomonas grimontii* cepa B949 frente a *Meloydogine javanica*.

Materiales y métodos

Ensayo sobre huevos:

5 La capacidad nematocida *in vitro* de la bacteria *P. grimontii* cepa MR B949 sobre huevos de *M. javanica* se evaluó en cámaras de eclosión (placas de múltiples pocillos Nunclon® Surface, Nunc, Dinamarca) en las que se habían añadido 2 g de suelo previamente esterilizado. Entonces se inoculó el sustrato con una suspensión acuosa que contenía 350 huevos de *M. javanica*. Se aplicó *P. grimontii* cepa MR B949 a  $1 \times 10^8$  UFC/ml. Se incubó la cámara de eclosión a 26°C durante 3 semanas y se tomaron lecturas periódicas 24 horas después de aplicar el agente de control biológico y 1, 2 y 3 semanas más tarde para determinar el porcentaje de eclosión. Se incluyeron ocho repeticiones de cada tratamiento, un control negativo con un producto químico de referencia a la dosis comercialmente recomendada (Nemacur® al 0,0125 %; principio activo: 25 fenamifos) y un control con agua destilada estéril para establecer una referencia para los resultados con respecto al porcentaje de eclosión normal.

15 Ensayo sobre juveniles:

La capacidad nematocida de la bacteria *P. grimontii* cepa MR B949 se evaluó *in vitro* frente a juveniles de *M. javanica* en cámaras de eclosión (placas de múltiples pocillos Nunclon® Surface, Nunc, Dinamarca), en las que se añadieron 2 g de suelo previamente esterilizado. Entonces se añadió una suspensión acuosa que contenía 200 formas juveniles de *M. javanica*, y el agente de control biológico, *P. grimontii* cepa MR B949, se aplicó a  $1 \times 10^{10}$  UFC/ml. Se incubó la cámara de eclosión a 26°C durante 7 días y se realizaron recuentos por medio de la cámara Hawksley® después de 24 horas (1 día) y después de 7 días para determinar el número de juveniles vivos ( % de mortalidad). Se incluyeron un control con agua destilada estéril y otro control con un producto químico de referencia (Nemacur® al 0,0125 %: principio activo = fenamifos). Se realizaron ocho repeticiones de cada tratamiento.

25 Ensayo *in vivo*:

La capacidad nematocida *in vivo* de la bacteria *Pseudomonas grimontii* cepa B949 se evaluó en la variedad de tomate "Marmande" frente a juveniles de *M. javanica*. Cada tratamiento consistió en 12 repeticiones y cada una se inoculó con 1.000 juveniles.

El calendario de ensayo es tal como sigue:

35 Tabla 14.- Plan de aplicaciones de *Pseudomonas grimantii* cepa B949 en un ensayo *in vivo* frente a *M. javanica*.

Día 0	Día 3	Día 4	Día 11	Día 21
Tratamiento preventivo	Trasplante	Inoculación de nematodos	1 <sup>er</sup> tratamiento	2 <sup>o</sup> tratamiento

40 Las plantas se colocaron en macetas de 1.000 cm<sup>3</sup> y se trataron con 10 ml de una disolución acuosa que contenía *P. grimontii* cepa B949 en el tratamiento preventivo y con 15 ml en la 1<sup>a</sup> y 2<sup>a</sup> aplicación después del trasplante. Las concentraciones de microorganismo usadas para el tratamiento fueron:

Tabla 15.- Concentración de la disolución acuosa que contiene *P. grimontii* cepa B949 en cada aplicación.

Tratamiento	Tipo	Dosis		
		1 <sup>a</sup> Aplicación	2 <sup>a</sup> Aplicación	3 <sup>a</sup> Aplicación
Control	Agua destilada estéril	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O
Nemacur	Formulación de referencia	1%	1%	1%
B949	IAGT	1,32E+08	2,09E+08	1,71E+08

45 El producto químico de referencia fue Nemacur® al 1 % (fenamifos). También se incluyó un control con agua destilada estéril.

50 El ensayo tuvo una duración de 2 meses. Después de dicho tiempo, se evaluaron los diferentes parámetros para verificar la actividad nematocida del microorganismo:

- Reproducción: N.º de huevos/g de raíz
- Fertilidad: N.º de huevos/masa
- Infectividad: N.º de masas/planta

55

La evaluación de los últimos 2 parámetros también ayuda a determinar los efectos del microorganismo en el ciclo de vida del patógeno (efectos sobre nematodos adultos).

5 Resultados y discusión

Ensayo sobre huevos

10 Tabla 16.- Eficacia ( %) corregida respecto al control del producto químico usado como referencia y *P. grimontii* cepa MR B949 frente a huevos de *M. javanica*.

Tratamientos	Eficacia (%)
Fenamifos	63,60
B949	0

15 En el seguimiento de la eclosión de los huevos de *M. javanica* durante los 21 días de duración del ensayo, el tratamiento con *P. grimontii* cepa MR B949 no mostró reducción respecto al control (figura 21). Tres semanas después de aplicar los diferentes tratamientos, el 100 % de los huevos no tratados (control) y el 100 % de los huevos tratados con *P. grimontii* cepa MR B949 habían eclosionado, mientras que solo el 36,4 % de los huevos tratados con Nema-cur® (producto químico de referencia) habían eclosionado. Por tanto, *P. grimontii* cepa MR B949 tenía el 0 % de eficacia en la reducción de la eclosión respecto al control en condiciones *in vitro*, mientras que en el producto químico de referencia, la eficacia de reducción de la eclosión era del 63,60 % (tabla 16) (figura 22).

Ensayo sobre juveniles

25 Tabla 17.- Eficacia ( %) corregida con respecto al control del producto químico usado como referencia y *P. grimontii* cepa MR B949 frente a juveniles de *M. javanica*.

Tratamientos	Eficacia (%)
Fenamifos	80,80
B949	98,20

30 *P. grimontii* cepa MR B949 muestra porcentajes de mortalidad de juveniles corregidos respecto al control del orden del 98,2 % 7 días después de la aplicación (tabla 17). No hay diferencias significativas respecto al producto químico de referencia usado (figura 23).

Ensayo *in vivo*

35 Tabla 18.- Resultados de eficacia nematicida de *P. grimontii* B949 y la referencia química corregida respecto al control.

Tratamientos	Eficacia corregida respecto al control (%)
Fenamifos	86,43
B949	10,76

40 Los resultados obtenidos en este ensayo mostraron que *P. grimontii* cepa B949 no tenía actividad nematicida frente a *M. javanica* sin diferencias estadísticamente significativas con el control con nematodos. El control químico usado como referencia obtuvo una eficacia del 86,43 % (tabla 18) (figura 24).

45 Además, los datos de fertilidad e infectividad, que se usan para evaluar la actividad del microorganismo en adultos de *M. javanica*, no mostraron diferencias estadísticamente significativas con el control. *P. grimontii* cepa B949 no redujo el número de masas por planta ni el número de huevos en cada masa formada por hembras adultas en la raíz. En conclusión, *P. grimontii* cepa B949 no reduce la capacidad del parásito para provocar infección (figura 25 y 26).

**Ejemplo 11 (ejemplo comparativo)**

Comparación de la actividad nematicida *in vitro* e *in vivo* de *Bacillus simplex* cepa B1169 frente a *Meloydogine javanica*.

Materiales y métodos

Ensayo sobre huevos:

La capacidad nematicida *in vitro* de la bacteria *B. simplex* cepa MR B1169 sobre huevos de *M. javanica* se evaluó en cámaras de eclosión (placas de múltiples pocillos Nunclon® Surface, Nunc, Dinamarca) en las que se habían añadido 2 g de suelo previamente esterilizado. Entonces se inoculó el sustrato con una suspensión acuosa que contenía 350 huevos de *M. javanica*. Se aplicó *B. simplex* cepa B1169 a  $1 \times 10^8$  UFC/ml. Se incubó la cámara de eclosión a 26°C durante 3 semanas y se tomaron lecturas periódicas 24 horas después de aplicar el agente de control biológico y 1, 2 y 3 semanas más tarde para determinar el porcentaje de eclosión. Se incluyeron ocho repeticiones de cada tratamiento, un control negativo con un producto químico de referencia a la dosis comercialmente recomendada (Nemacur® al 0,0125 %; principio activo: fenamifos) y un control con agua destilada estéril para establecer una referencia para los resultados respecto al porcentaje de eclosión normal.

Ensayo sobre juveniles:

La capacidad nematicida de la bacteria *B. simplex* cepa B1169 se evaluó *in vitro* frente a juveniles de *M. javanica* en cámaras de eclosión (placas de múltiples pocillos Nunclon®, Nunc, Dinamarca), en las que se añadieron 2 g de suelo previamente esterilizado. Entonces se añadió una suspensión acuosa que contenía 200 formas juveniles de *M. javanica*, y el agente de control biológico, *B. simplex* cepa B1169, se aplicó a  $1 \times 10^{10}$  UFC/ml. Se incubó la cámara de eclosión a 26°C durante 7 días y se realizaron recuentos por medio de la cámara Hawksley® después de 24 horas (1 día) y después de 7 días para determinar el número de juveniles vivos (% de mortalidad). Se incluyeron un control con agua destilada estéril y otro control con un producto químico de referencia (Nemacur® al 0,0125 %; principio activo = fenamifos). Se realizaron ocho repeticiones de cada tratamiento.

Ensayo *in vivo*

La capacidad nematicida *in vivo* de la bacteria *Bacillus simplex* cepa B1169 se evaluó en la variedad de tomate "Marmande" frente a juveniles de *M. javanica*. Cada tratamiento consistió en 12 repeticiones y cada una se inoculó con 1.000 juveniles.

El calendario de ensayo fue tal como sigue:

Tabla 19.- Plan de aplicaciones de *Bacillus simplex* cepa B1169 en un ensayo *in vivo* frente a *M. javanica*.

Día 0	Día 3	Día 4	Día 11	Día 21
Tratamiento preventivo	Trasplante	Inoculación de nematodos	1 <sup>er</sup> tratamiento	2 <sup>o</sup> tratamiento

Las plantas se colocaron en macetas de 1.000 cm<sup>3</sup> y se trataron con 10 ml de una disolución acuosa que contenía *B. simplex* cepa B1169 en el tratamiento preventivo y con 15 ml en la 1<sup>a</sup> y 2<sup>a</sup> aplicación después del trasplante. Las concentraciones de microorganismos usadas para el tratamiento fueron:

Tabla 20.- Concentración de la disolución acuosa que contiene *B. simplex* cepa B1169 en cada aplicación.

Tratamiento	Tipo	Dosis		
		1 <sup>a</sup> Aplicación	2 <sup>a</sup> Aplicación	3 <sup>a</sup> Aplicación
Control	Agua destilada estéril	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O
Nemacur	Formulación de referencia	1%	1%	1%
<b>B1169</b>	IAGT	7,60E+07	7,40E+07	7,90E+07

El producto químico de referencia era Nemacur® al 1 % (fenamifos). También se incluyó un control con agua destilada estéril.

El ensayo tuvo una duración de 2 meses. Después de dicho tiempo, se evaluaron los diferentes parámetros para verificar la actividad nematicida del microorganismo:

- Reproducción: N.º de huevos/g de raíz
- Fertilidad: N.º de huevos/masa
- Infectividad: N.º de masas/planta

Resultados y discusión

Ensayo sobre huevos

Tabla 21.- Eficacia ( %) corregida con respecto al control del producto químico usado como referencia y *B. simplex* cepa MR B1169 frente a huevos de *M. javanica*.

Tratamientos	Eficacia (%)
Fenamifos	63,60
B1169	0

En el seguimiento de la eclosión de huevos de *M. javanica* durante la duración del ensayo de 21 días, el tratamiento con *B. simplex* cepa B1169 no mostró una reducción respecto al control (figura 27). Tres semanas después de aplicar los diferentes tratamientos, el 100 % de los huevos no tratados (control) y el 100 % de los huevos tratados con *B. simplex* cepa MR B1169 habían eclosionado, mientras que solo el 36,40 % de los huevos tratados con Nematicur® (producto químico de referencia) habían eclosionado. Por tanto, *B. simplex* cepa B1169 tenía el 0 % de eficacia en la reducción de la eclosión respecto al control en condiciones *in vitro*, mientras que en el producto químico de referencia, la eficacia en la reducción de la eclosión era del 63,60 % (tabla 21) (figura 28).

Ensayo sobre juveniles

Tabla 22.- Eficacia ( %) corregida respecto al control del producto químico usado como referencia y *B. simplex* cepa B1169 frente a juveniles de *M. javanica*.

Tratamientos	Eficacia (%)
Fenamifos	80,80
B1169	76,90

*B. simplex* cepa B1169 mostró porcentajes de mortalidad de juveniles corregidos respecto al control del orden del 76,80 % 7 días después de la aplicación (tabla 22). No hubo diferencias significativas respecto al producto químico de referencia usado (figura 29).

Ensayo *in vivo*

Tabla 23.- Resultados de eficacia nematocida de *B. simplex* cepa B1169 y referencia química corregida respecto al control

Tratamientos	Eficacia corregida respecto al control (%)
Fenamifos	86,43
B1169	17,85

Los resultados obtenidos en este ensayo mostraron que *B. simplex* cepa B1169 no tenía actividad nematocida frente a *M. javanica* sin diferencias estadísticamente significativas respecto al control con nematodos. El control químico usado como referencia obtuvo una eficacia del 86,43 % (tabla 23) (figura 30).

Además, los datos de fertilidad e infectividad, que se usaron para evaluar la actividad del microorganismo en adultos de *M. javanica*, no mostraron diferencias estadísticamente significativas con el control. *Bacillus simplex* cepa B1169 no redujo el número de masas por planta ni el número de huevos en cada masa formada por hembras adultas en la raíz. En conclusión, *B. simplex* cepa B1169 no redujo la capacidad del parásito para provocar infección (figuras 31 y

32).

En conclusión, la existencia de actividad nematocida en un ensayo *in vitro* no puede extrapolarse a la existencia de actividad nematocida *in vivo*, donde hay muchos factores implicados en el proceso de biocontrol. Los ejemplos 10 y 11 también muestran que es más fácil reducir la población de nematodos de un organismo cuando están en un estadio juvenil que cuando están en el estadio de huevo, que tiene más resistencia dadas sus características.

**Ejemplo 12**

10 Comparación de la actividad promotora del crecimiento *in vivo* de *Lysobacter enzymogenes* cepa MR B25 y B322 en plantas de tomate. La cepa B322 es una cepa de referencia.

Materiales y métodos

15 Para comparar la capacidad promotora del crecimiento con *Lysobacter enzymogenes* MR B25 y *Lysobacter enzymogenes* B322, se plantaron 25 semillas de tomate de la variedad “Marmande” en bandejas con celdas que tenían una capacidad de 20 ml, con sustrato empobrecido (turba al 10 % y vermiculita:perlita (3:1)). Se depositaron en una cámara climática en condiciones controladas de luz, temperatura y humedad hasta completar el estadio de cotiledón, momento en el cual se aplicó principio activo de grado técnico de *L. enzymogenes* MR B25 y B322 a una concentración de  $4 \times 10^7$  UFC/ml en un volumen total de 5 ml/celda (=semilla). También se incluyó un control absoluto de agua destilada estéril. El ensayo tuvo una duración de 2 meses. Después de este periodo de tiempo, las plantas del tratamiento y el control se procesaron para evaluar los siguientes parámetros:

- 25 • Altura
- Peso fresco aéreo
- Peso fresco radicular
- 30 • Peso seco aéreo
- Peso seco radicular
- Peso fresco de la planta
- 35 • Peso seco de la planta

Resultados y discusión

40 Tabla 24.- Resultados de los parámetros de promotor del crecimiento vegetal y análisis estadístico. Letras diferentes son una diferencia estadísticamente significativa.

	Altura	Peso fresco aéreo	Peso fresco radicular	Peso seco aéreo	Peso seco radicular	Peso fresco de la planta	Peso seco de la planta
<b>Control</b>	5,43	127,00	67,61	17,35	5,78	194,61	23,13
<b>B322</b>	5,73	135,83	72,04	19,29	6,21	207,88	25,50
<b>B25</b>	7,73	470,77	201,50	47,31	13,74	672,27	61,05
	<b>Altura</b>	<b>Peso fresco aéreo</b>	<b>Peso fresco radicular</b>	<b>Peso seco aéreo</b>	<b>Peso seco radicular</b>	<b>Peso fresco de la planta</b>	<b>Peso seco de la planta</b>
<b>Valor de P</b>	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
	<b>Prueba de LSD</b>						
<b>Control</b>	a	a	a	a	a	a	a
<b>B322</b>	a	a	a	a	a	a	a
<b>B25</b>	b	b	b	b	b	b	b

45 *L. enzymogenes* cepa MR B25 promovió el crecimiento vegetal con diferencias estadísticamente significativas respecto al control y el tratamiento con *L. enzymogenes* cepa B322 tanto para los parámetros de altura (figura 33)

como de peso aéreo y radicular (figuras 34, 35, 36 y 37). *L. enzymogenes* B322 no mostró promoción del crecimiento para ningún parámetro evaluado, sin diferencia estadísticamente significativa con el control (tabla 24).

Tabla 25.- Promoción de la actividad de crecimiento basándose en el peso seco de la planta respecto al control.

5

Tratamientos	Promoción de la actividad de crecimiento (veces)
B322	0,10
<b>B25</b>	<b>1,64</b>

10

Los resultados de este estudio concluyeron que *L. enzymogenes* cepa MR B25 promueve el crecimiento vegetal sin la necesidad de la presencia del patógeno (figura 38 y 39). Otros estudios presentados anteriormente demostraron que este microorganismo es capaz de ayudar al desarrollo de crecimiento con y sin patógeno. Esta característica no es específica de especie sino que es una propiedad de la cepa.

Depósito de material biológico

15

La cepa de *Lysobacter enzymogenes* MR B25 ha sido depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) (Edificio 3 CUE, Universidad de Valencia, Parc Científic Universitat de València, Catedrático Agustín Escardino, 9; 46980 Paterna, Valencia) bajo las condiciones estipuladas en el Tratado de Budapest. El depósito tuvo lugar el 7 de marzo de 2014 y el número asignado a dicho depósito fue CECT 8565.

20

Lista de secuencias

<110> FUTURECO BIOSCIENCE, S.A.

25

<120> Bacterias con actividad nematocida y la capacidad de promover el crecimiento vegetal

<130> P11070PC00

<150> EP14382416

<151> 23-10-2014

30

<160> 3

<170> PatentIn versión 3.5

35

<210> 1

<211> 18

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

40

<220>

<223> cebador directo 8-f

<400> 1

**agtttgatcc tggctcag**

18

45

<210> 2

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

50

<220>

<223> cebador inverso 1492-r

<400> 2

**acggttacct tgttacgact t**

21

55

<210> 3

<211> 946

<212> ADN

60

<213> *Lysobacter enzymogenes*

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (12)..(12)  
5 <223> n e s a , c , g o t

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (819)..(819)  
10 <223> n e s a , c , g o t

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (848)..(849)  
15 <223> n e s a , c , g o t

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (866)..(866)  
20 <223> n e s a , c , g o t

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (897)..(897)  
25 <223> n e s a , c , g o t

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (903)..(903)  
30 <223> n e s a , c , g o t

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (930)..(930)  
35 <223> n e s a , c , g o t

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (944)..(944)  
40 <223> n e s a , c , g o t

<400> 3

# ES 2 819 255 T3

cggcagcaca gnggagcttg ctccttgggt ggcgagtggc ggacgggtga ggaatacgtc	60
ggaatctgcc ttttgtggg ggataacgta gggaaactta cgctaatacc gcatacgacc	120
tacgggtgaa agtgggggac cgcaaggcct cacgcagata gatgagccga cgtcggatta	180
gctagtggc ggggtaaagg cccaccaagg cgacgatccg tagctggtct gagaggatga	240
tcagccacac tggaaactgag acacggtcca gactcctacg ggaggcagca gtggggaata	300
ttggacaatg ggcgcaagcc tgatccagcc atgccgctg tgtgaagaag gccttcgggt	360
tgtaaagcac ttttgtccgg aaagaaaagc ttagggtaa taacctgag tcatgacggt	420
accggaagaa taagcaccgg ctaacttcgt gccagcagcc gcggaatac gaagggtgca	480
agcgttactc ggaattactg ggcgtaaagc gtgcgtaggt ggtttgtaa gtctgatgtg	540
aaagccctgg gctcaacctg ggaatggcat tgaaactgg cttagtagag tgcgtagag	600
ggtagcggaa ttcccgggtg agcagtgaaa tgcgtagata tcgggaggaa catctgtggc	660
gaaggcggct acctggacca gcactgacac tgaggcacga aagcgtgggg agcaaacagg	720
attagatacc ctggtagtcc acgccctaaa cgatcggaac tggatggttg gggcaacttg	780
gccctcagta tcgaagctaa cgcgttaagt tcgccgccng ggaagtacgg tcgcaagact	840
gaaactcnng gaattgacgg gggccngcac aagcgtgga gtatgtggt taattcnatg	900
cancgcaag aaccttacct ggcctgacn tgctgagaac ttnca	946

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Microorganismo de la especie *Lysobacter enzymogenes*, identificado como *L. enzymogenes* cepa MR B25, depositado en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con el número de registro CECT 8565 o un mutante del mismo en el que dicho mutante tiene un genoma que tiene una identidad de secuencia de al menos el 99 % con el genoma de la cepa MR B25 de *L. enzymogenes*, en el que el microorganismo y el mutante tienen actividad nematocida sobre un nematodo de la especie *Meloidogyne javanica* y la capacidad de promover el crecimiento vegetal en una planta de la familia *Solanaceae*.
- 10 2. Cultivo biológicamente puro de un microorganismo según la reivindicación 1, en el que el cultivo biológicamente puro comprende dicho microorganismo en una proporción del 95 % o superior en comparación con otros organismos presentes en dicho cultivo.
- 15 3. Método para obtener una biomasa del microorganismo según la reivindicación 1 que comprende cultivar dicho microorganismo en el medio de cultivo en condiciones de temperatura, pH y oxigenación constantes, en el que la temperatura está comprendida entre 25°C y 35°C, el pH está comprendido entre 5,0 y 9,0 y la oxigenación se logra por medio de agitación a velocidades de entre 200 y 500 rpm y/o suministrando aire estéril a un caudal fijo de entre 0,5 y 1,5 vvm.
- 20 4. Biomasa del microorganismo según la reivindicación 1, obtenible por medio del método de la reivindicación 3.
- 25 5. Producto fitosanitario que comprende un microorganismo según la reivindicación 1, un cultivo biológicamente puro según la reivindicación 2 o una biomasa según la reivindicación 4, y un excipiente agrícola aceptable.
- 30 6. Semilla suplementada que comprende:
  - (i) una semilla, y además
  - (ii) un segundo componente seleccionado del grupo que consiste en:
    - 35 (a) un microorganismo según la reivindicación 1,
    - (b) un cultivo biológicamente puro según la reivindicación 2,
    - (c) una biomasa según la reivindicación 4, y
    - 40 (d) un producto fitosanitario según la reivindicación 5.
- 45 7. Semilla suplementada según la reivindicación 6, en la que la semilla es una semilla de una planta de la familia *Solanaceae*.
- 50 8. Método para controlar biológicamente un nematodo que comprende aplicar a dicho nematodo un microorganismo según la reivindicación 1, un cultivo biológicamente puro según la reivindicación 2, una biomasa según la reivindicación 4, o un producto fitosanitario según la reivindicación 5, en el que el método no es un método de tratamiento del cuerpo humano o animal.
- 55 9. Método para prevenir la infección de una planta provocada por un nematodo que comprende aplicar una cantidad eficaz de un producto seleccionado del grupo que consiste en:
  - (a) un microorganismo según la reivindicación 1,
  - (b) un cultivo biológicamente puro según la reivindicación 2,
  - (c) una biomasa según la reivindicación 4, y
  - (d) un producto fitosanitario según la reivindicación 5,

60 aplicándose dicho producto sobre dicha planta, sobre la semilla de dicha planta, en el suelo que rodea a dicha planta,

o alternativamente plantando una semilla de dicha planta, dicha semilla suplementada con un producto seleccionado del grupo que consiste en:

  - 65 (a) un microorganismo según la reivindicación 1,

- (b) un cultivo biológicamente puro según la reivindicación 2,  
(c) una biomasa según la reivindicación 4, y  
(d) un producto fitosanitario según la reivindicación 5.
- 5
10. Método para tratar una planta infectada por un nematodo que comprende aplicar una cantidad eficaz de un producto seleccionado del grupo que consiste en:
- 10
- (a) un microorganismo según la reivindicación 1,  
(b) un cultivo biológicamente puro según la reivindicación 2,  
(c) una biomasa según la reivindicación 4, y  
(d) un producto fitosanitario según la reivindicación 5,
- 15
- aplicándose dicho producto sobre dicha planta o en el suelo que rodea a dicha planta.
- 20
11. Método para estimular el crecimiento vegetal que comprende aplicar una cantidad eficaz de un producto seleccionado del grupo que consiste en:
- 25
- (a) un microorganismo según la reivindicación 1,  
(b) un cultivo biológicamente puro según la reivindicación 2,  
(c) una biomasa según la reivindicación 4, y  
(d) un producto fitosanitario según la reivindicación 5,
- 30
- aplicándose dicho producto sobre dicha planta, sobre la semilla de dicha planta o en el suelo que rodea a dicha planta,
- 35
- o alternativamente plantando una semilla de dicha planta, dicha semilla suplementada con un producto seleccionado del grupo que consiste en:
- 40
- (a) un microorganismo según la reivindicación 1,  
(b) un cultivo biológicamente puro según la reivindicación 2,  
(c) una biomasa según la reivindicación 4, y  
(d) un producto fitosanitario según la reivindicación 5.
- 45
12. Método según cualquiera de las reivindicaciones 9 u 11, en el que la planta pertenece a la familia *Solanaceae*.
- 50
13. Método según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12, en el que la cantidad eficaz de un producto seleccionado del grupo que consiste en:
- 55
- (a) un microorganismo según la reivindicación 1,  
(b) un cultivo biológicamente puro según la reivindicación 2,  
(c) una biomasa según la reivindicación 4, y  
(d) un producto fitosanitario según la reivindicación 5
- 60
- se aplica en una primera aplicación antes del trasplante de la planta, en una segunda aplicación después del trasplante de la planta y, al menos, un número "n" de aplicaciones, en el que "n" es un número entero comprendido entre 1 y 10, en el que cada una de dichas "n" aplicaciones se aplica entre 10 y 20 días después de la aplicación precedente.

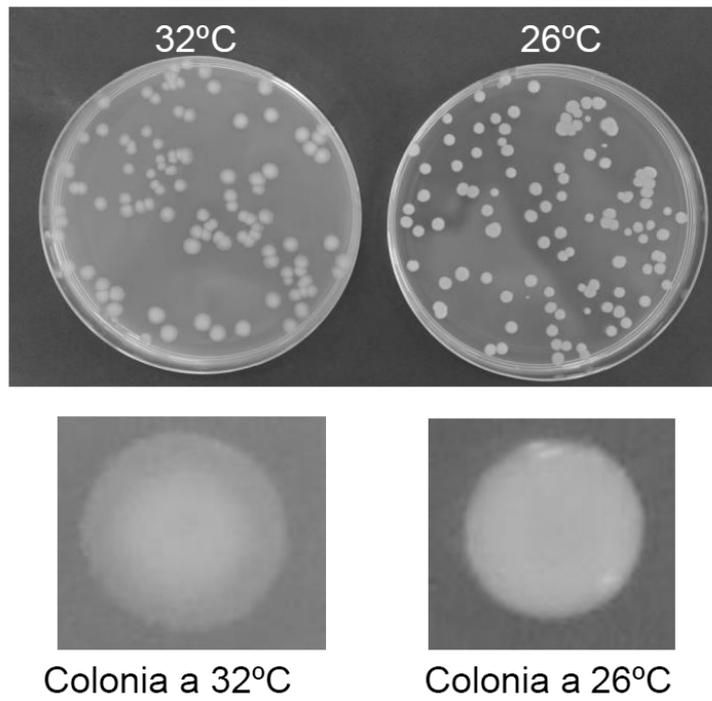


FIG. 1

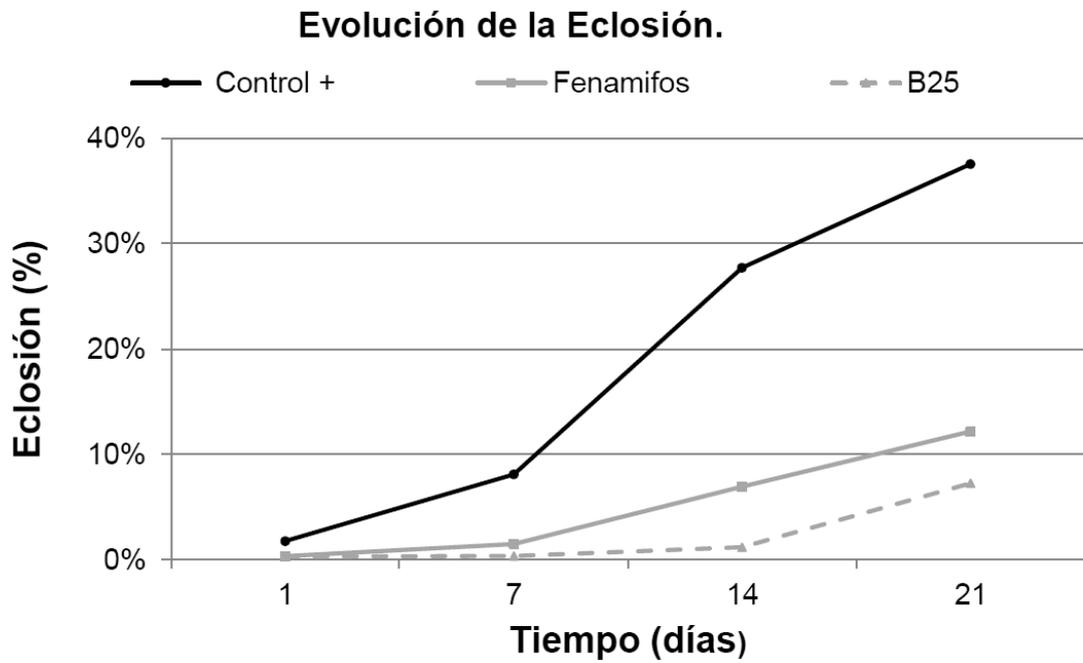


FIG. 2

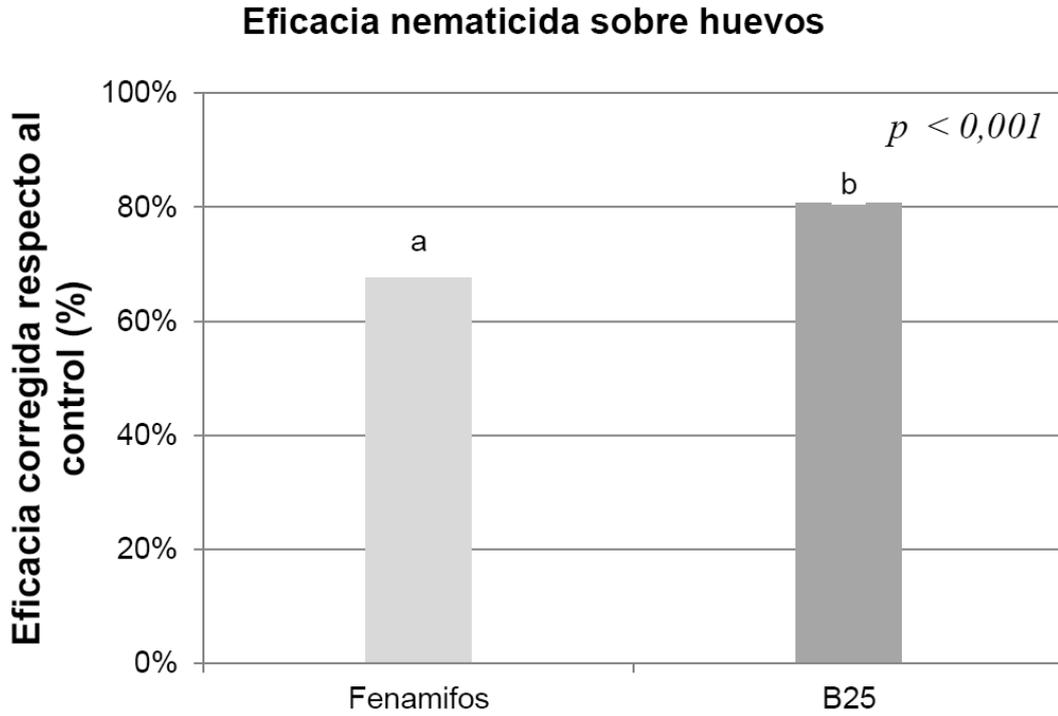


FIG. 3

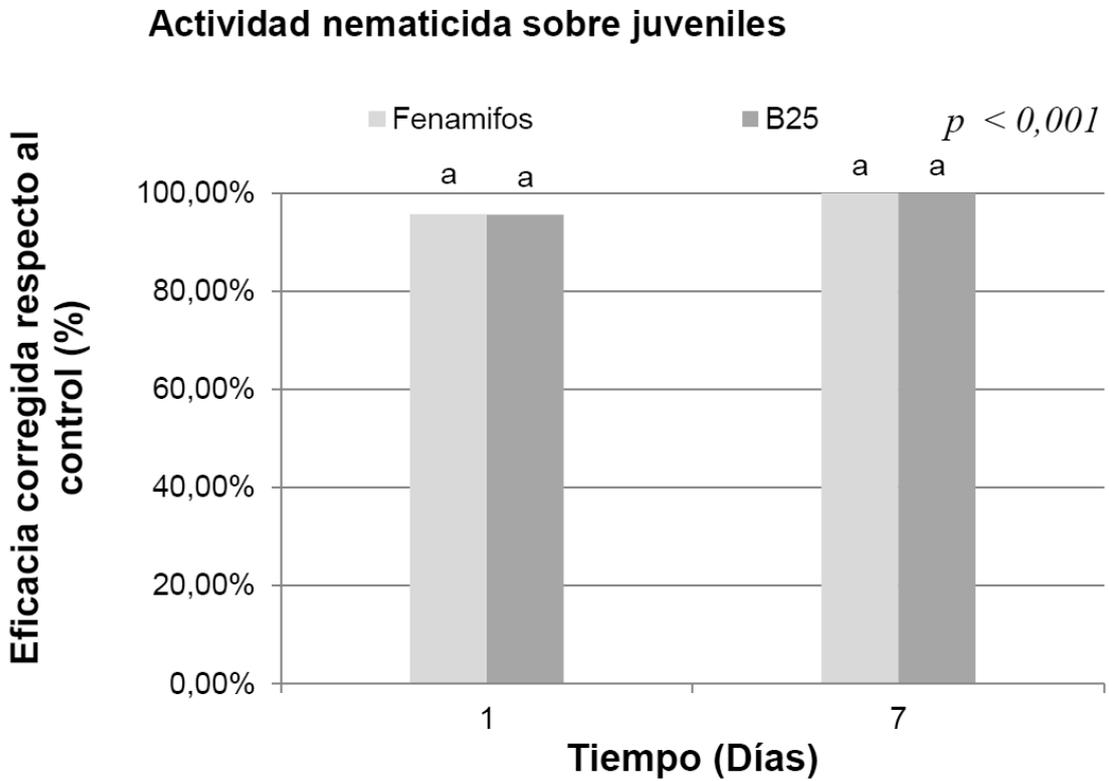


FIG. 4

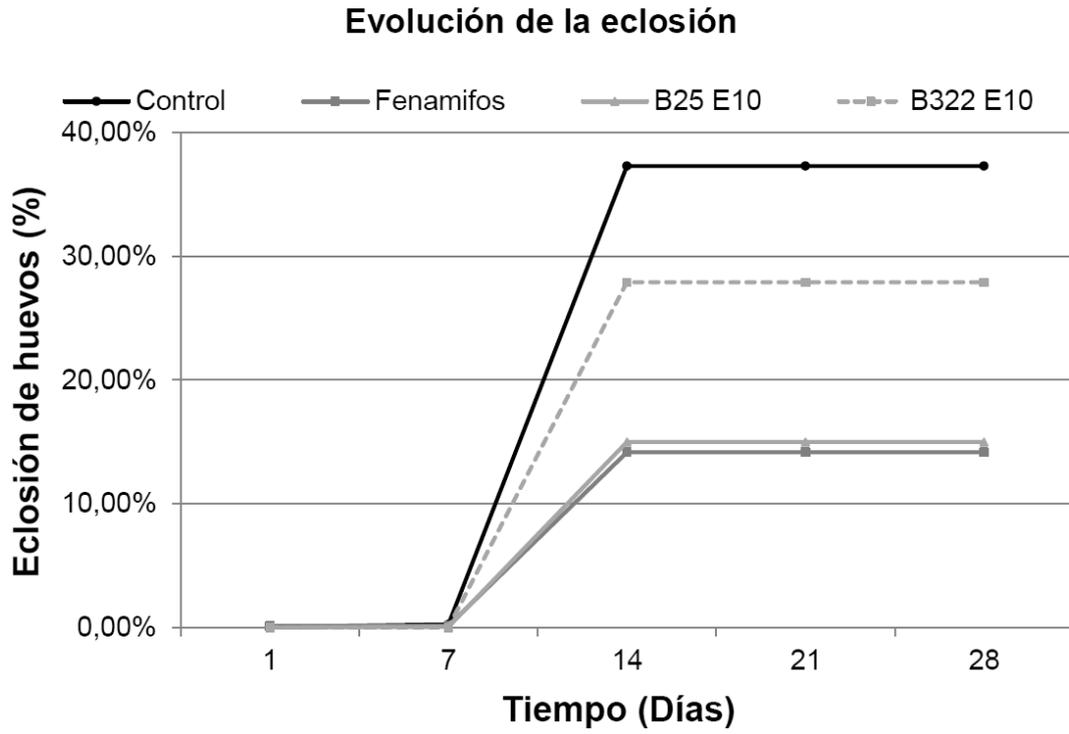


FIG. 5

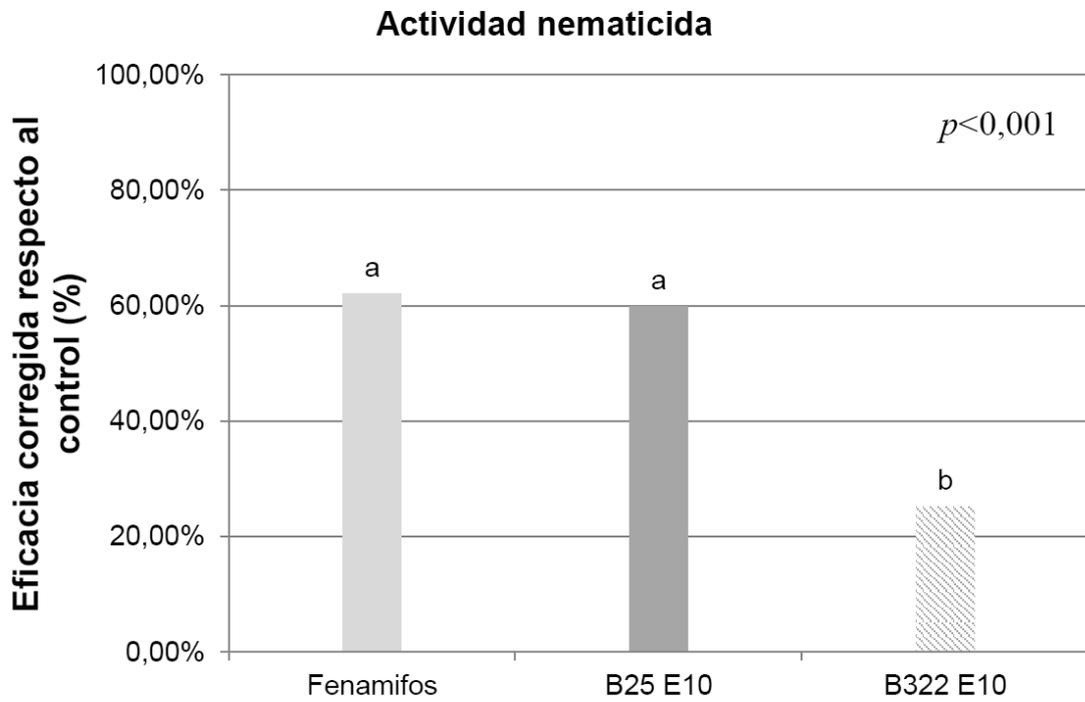


FIG. 6

### Evolución de la eclosión

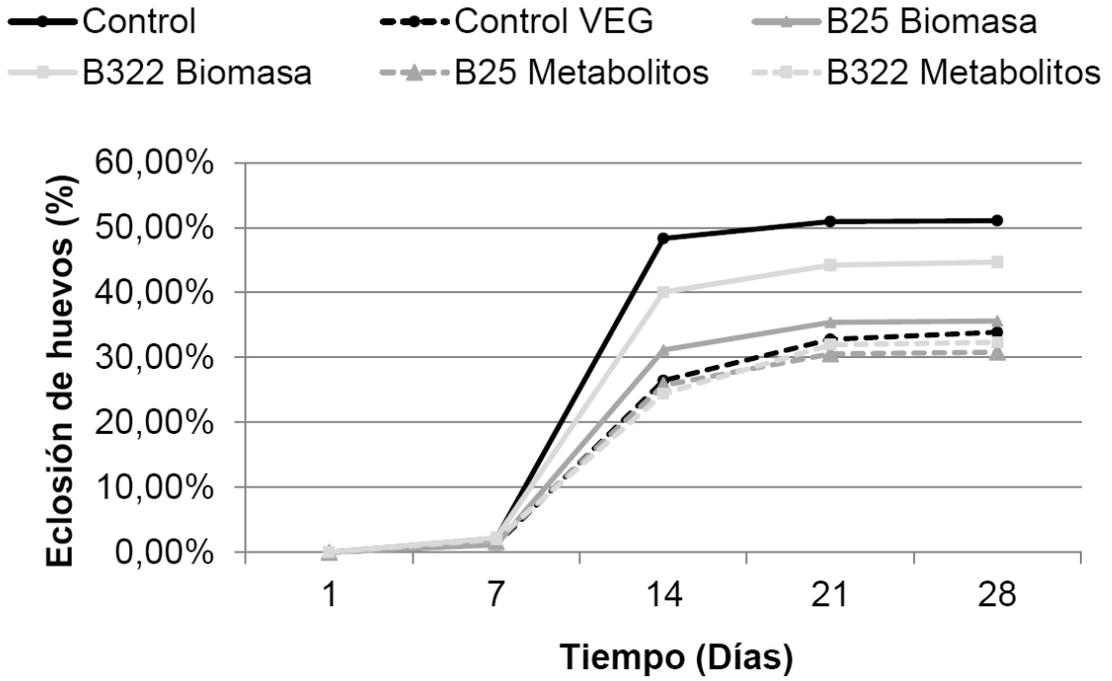


FIG. 7

### Eficacia nematicida

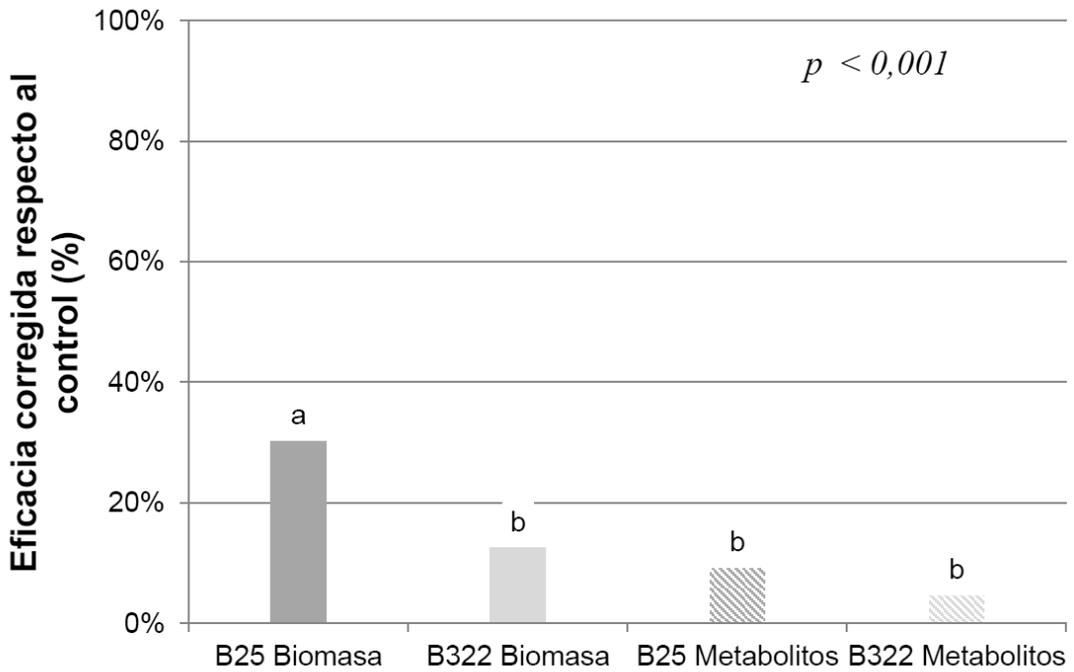


FIG. 8

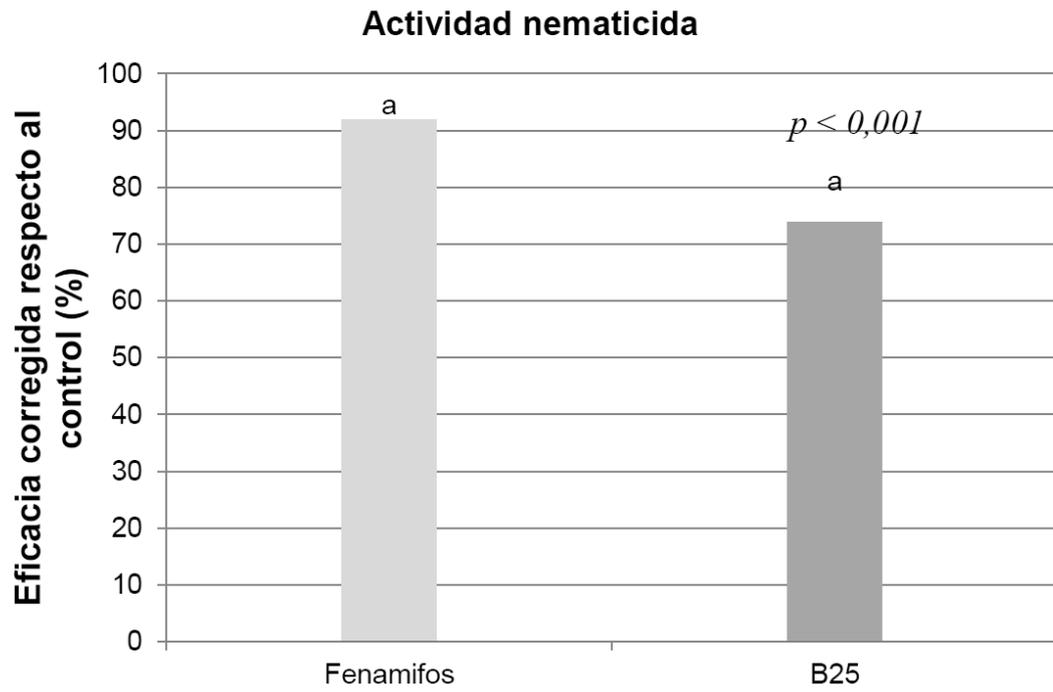


FIG. 9

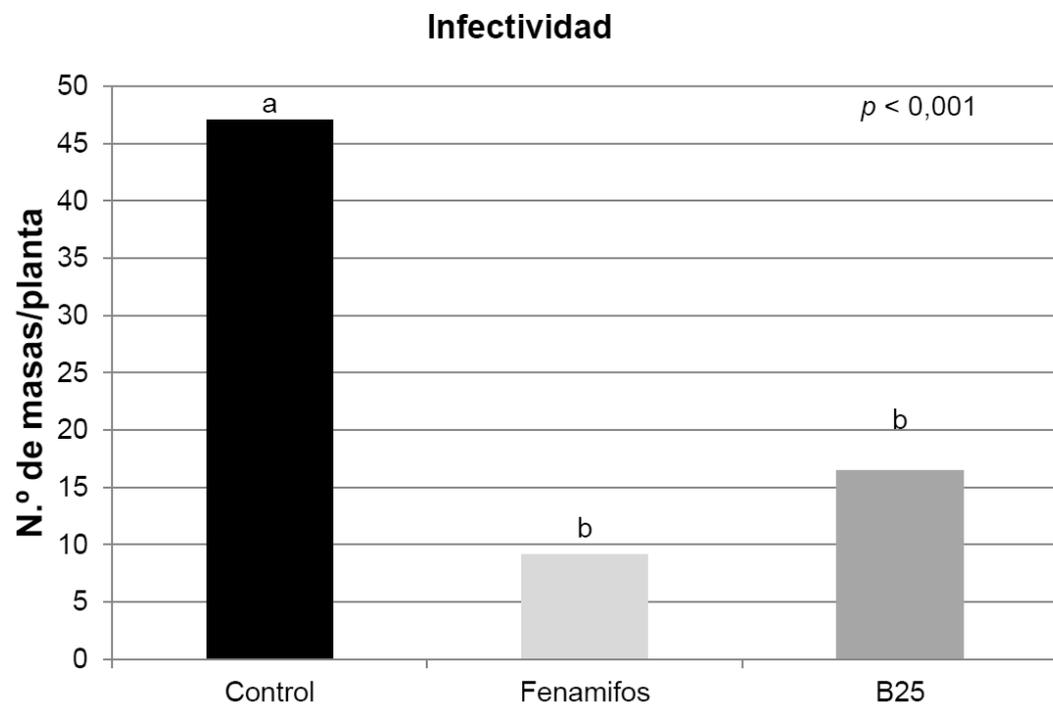


FIG. 10

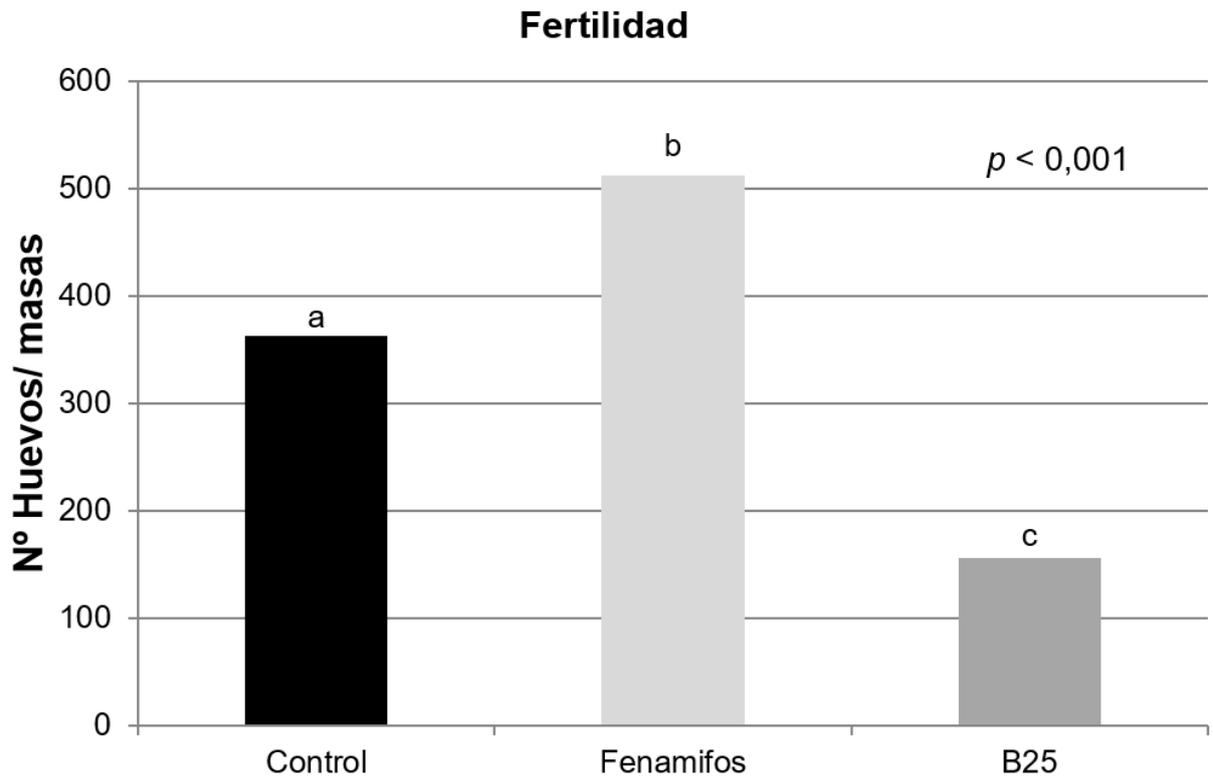


FIG. 11

### Actividad promotora del crecimiento

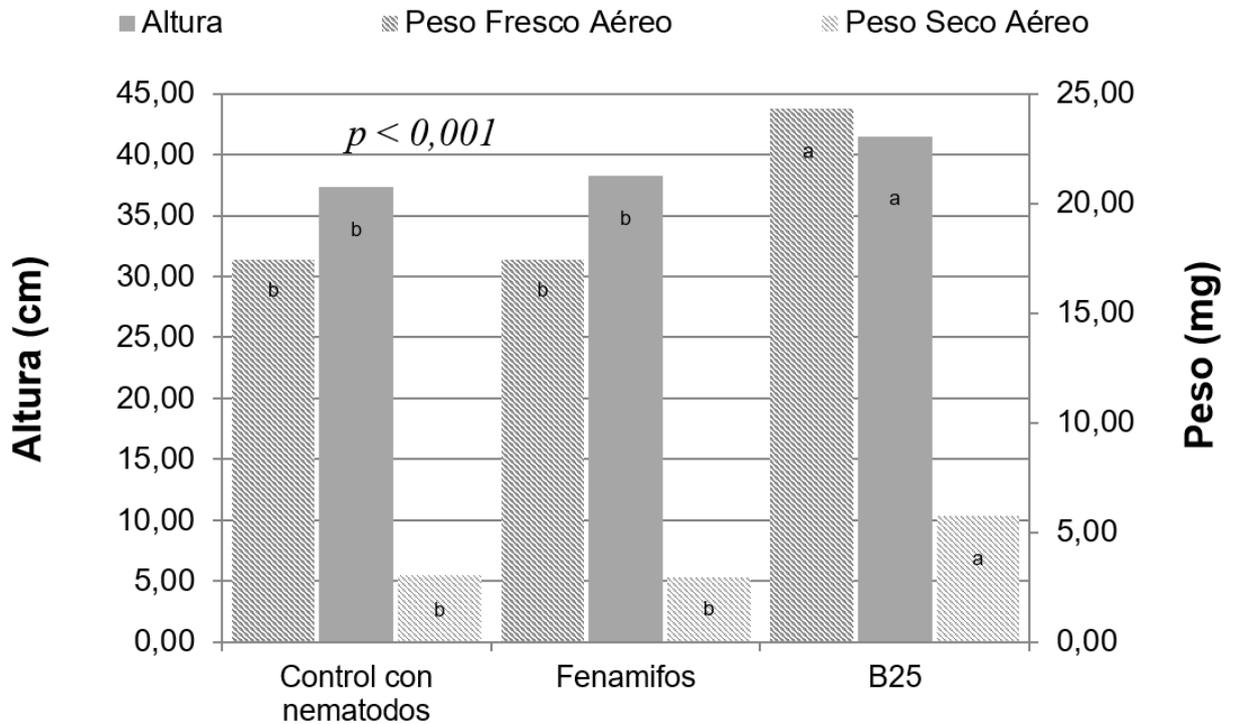
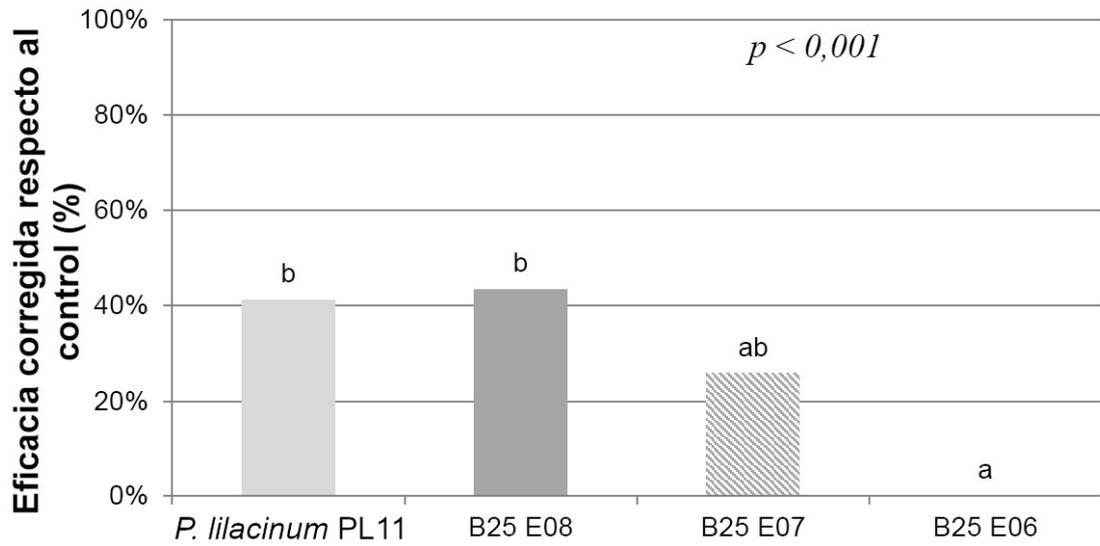


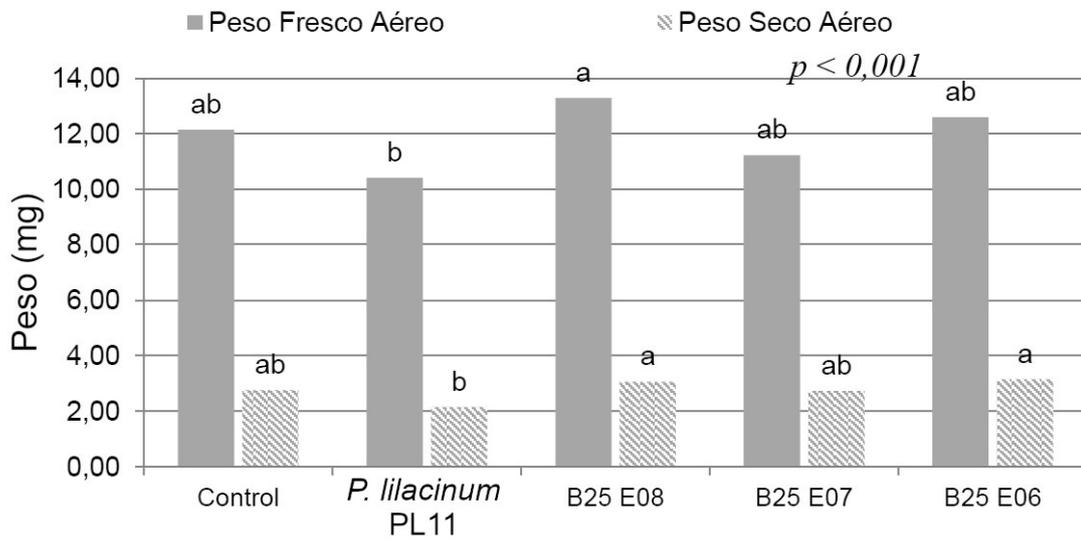
FIG. 12

**Actividad nematocida**



**FIG. 13**

**Actividad promotora del crecimiento**



**FIG. 14**

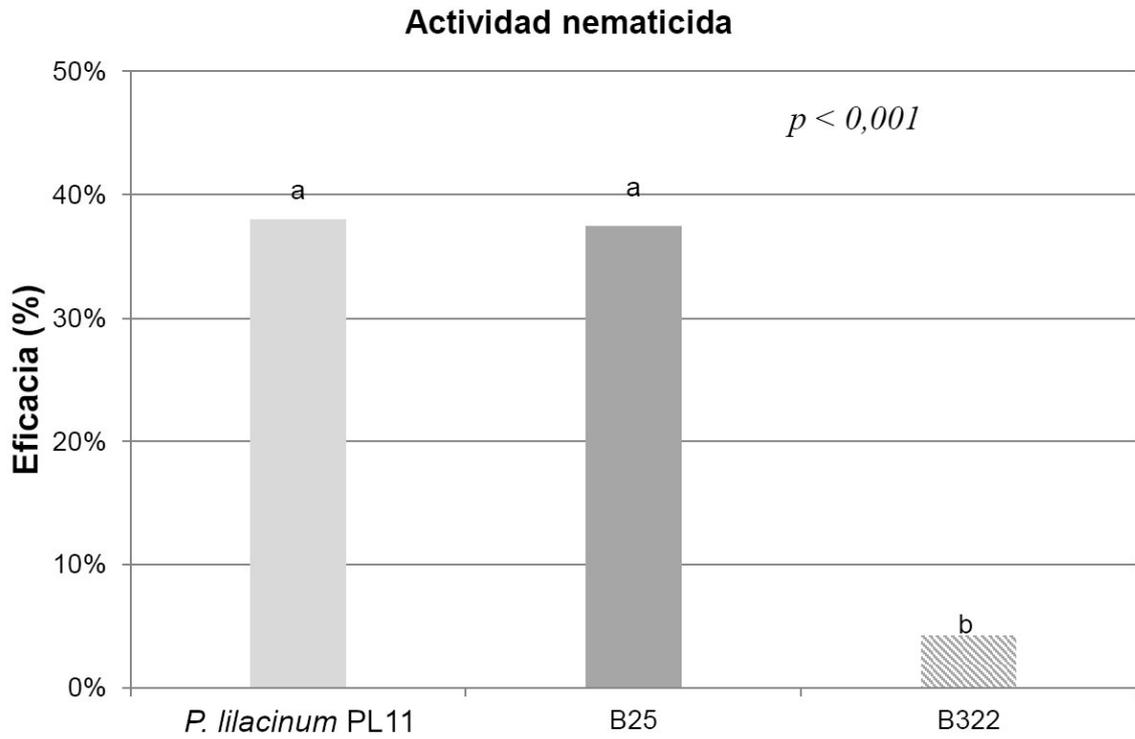


FIG. 15

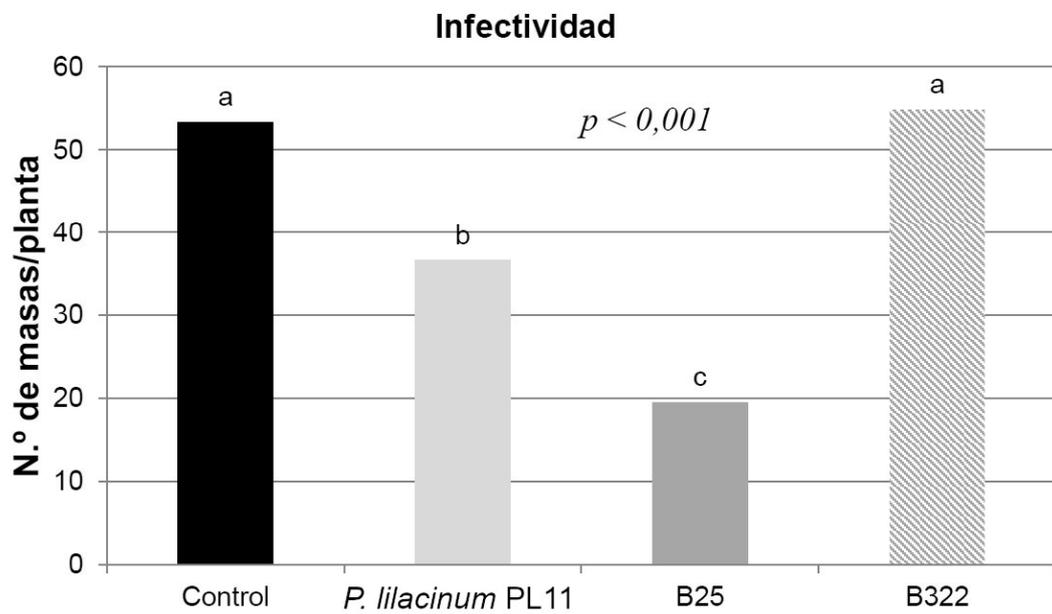


FIG. 16

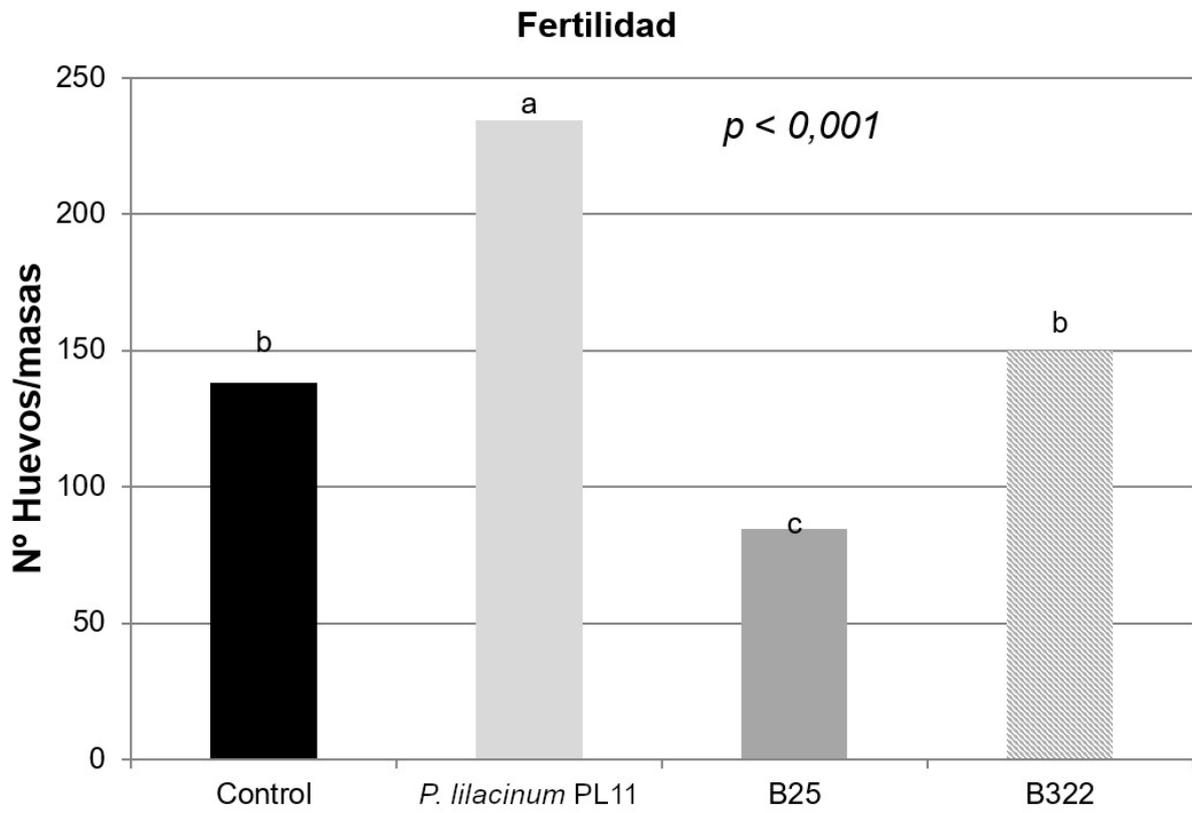


FIG. 17

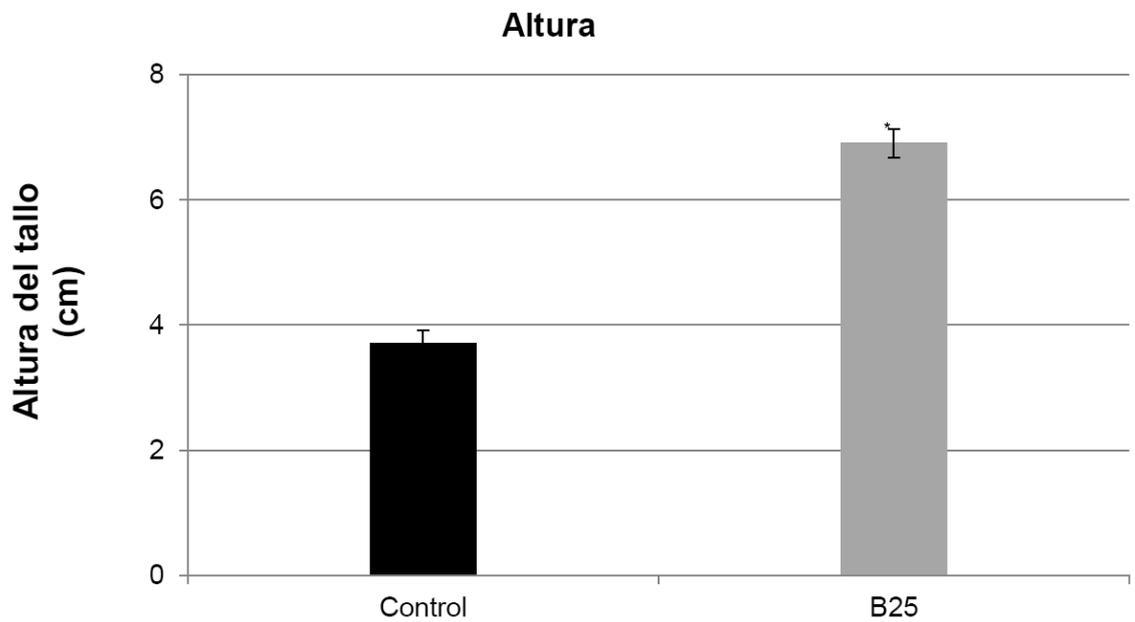


FIG. 18

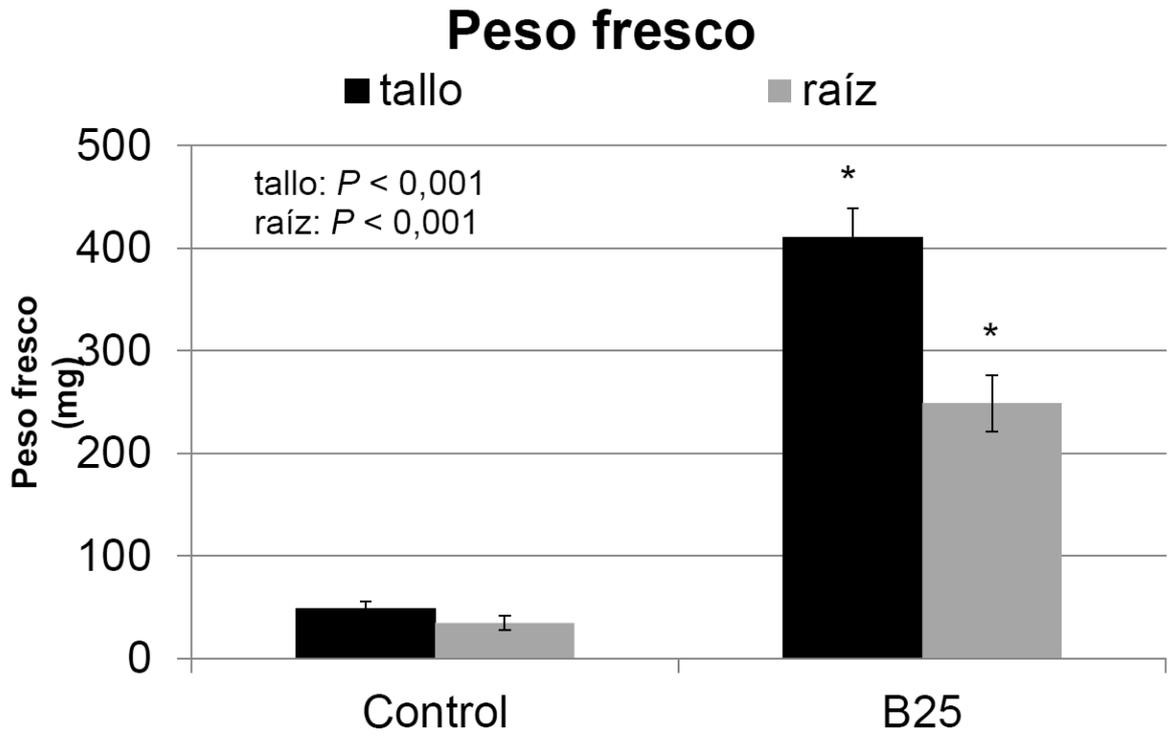


FIG. 19

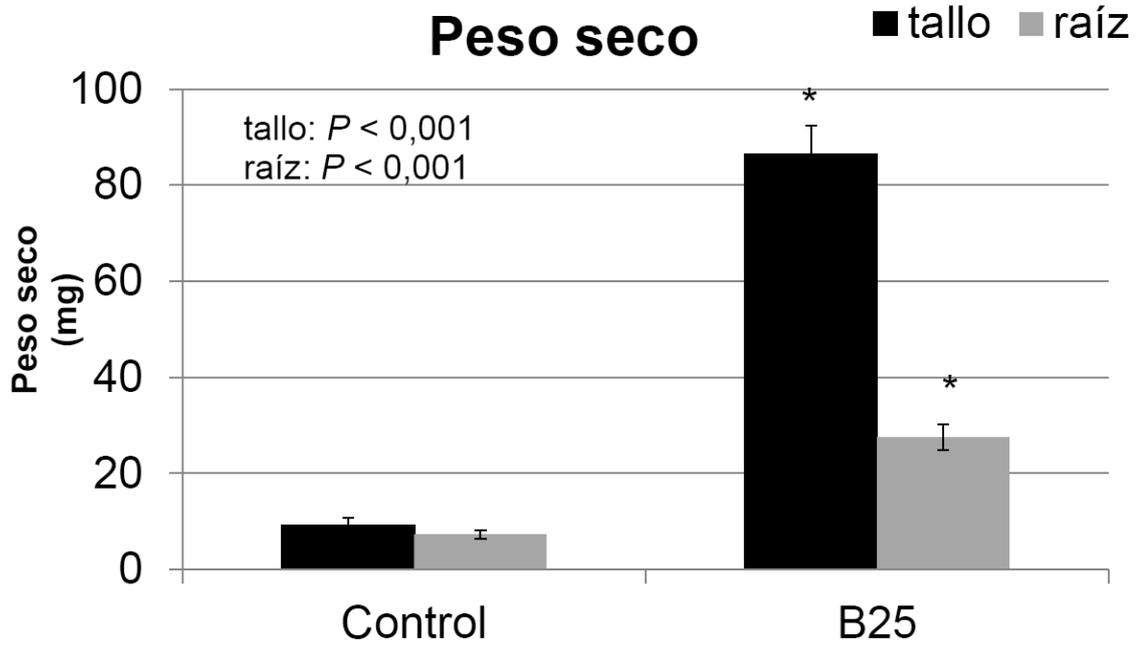


FIG. 20

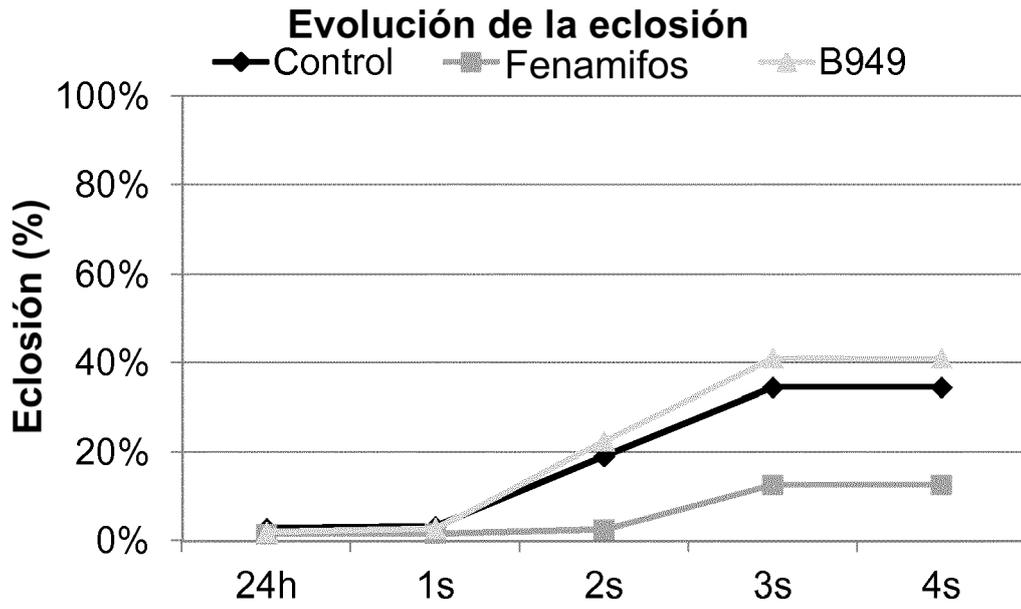


FIG. 21

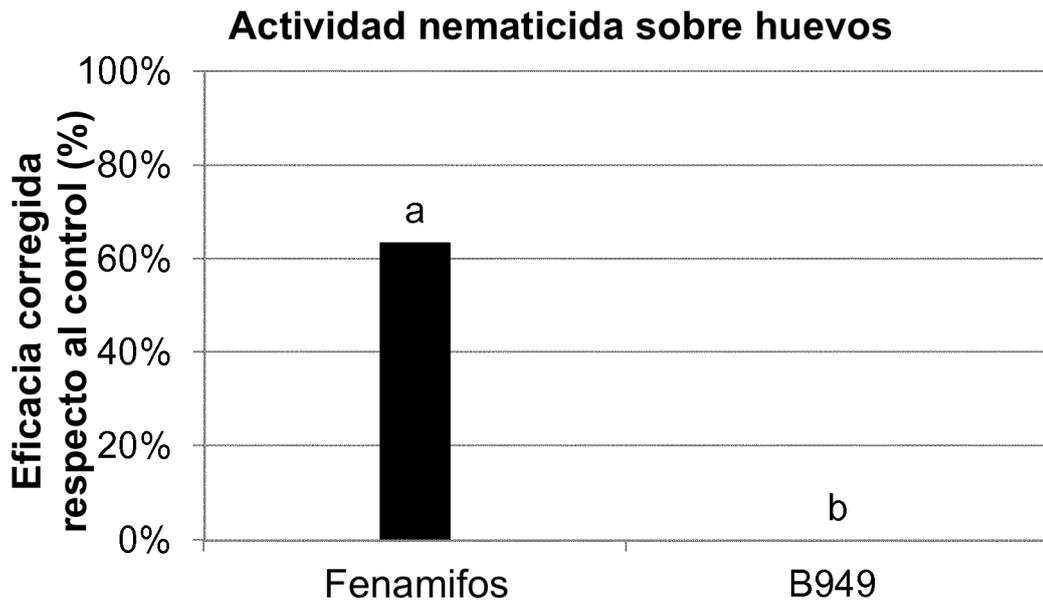


FIG. 22

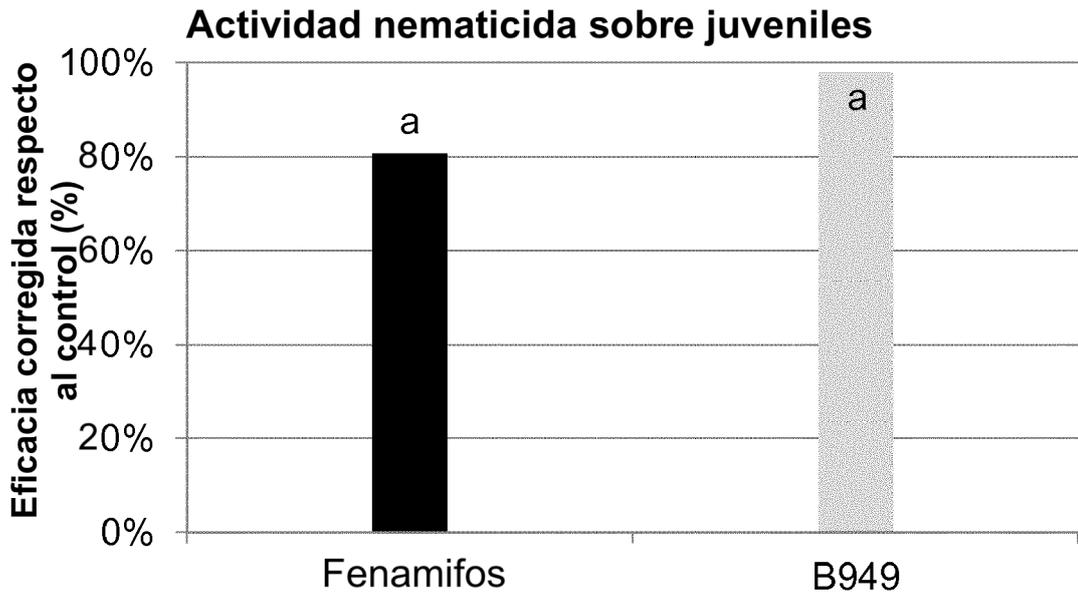


FIG. 23

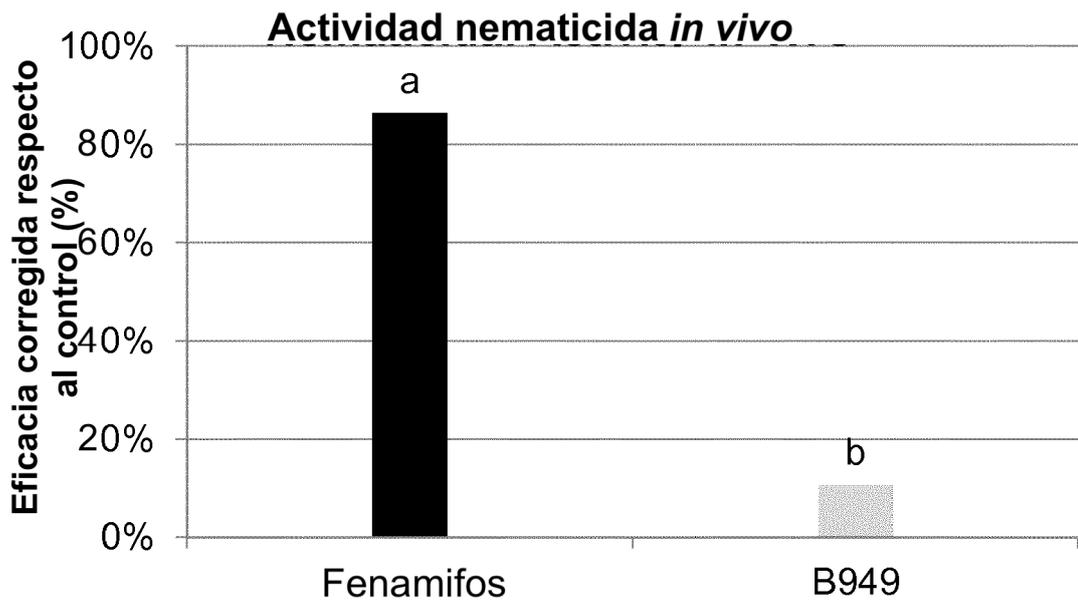


FIG. 24

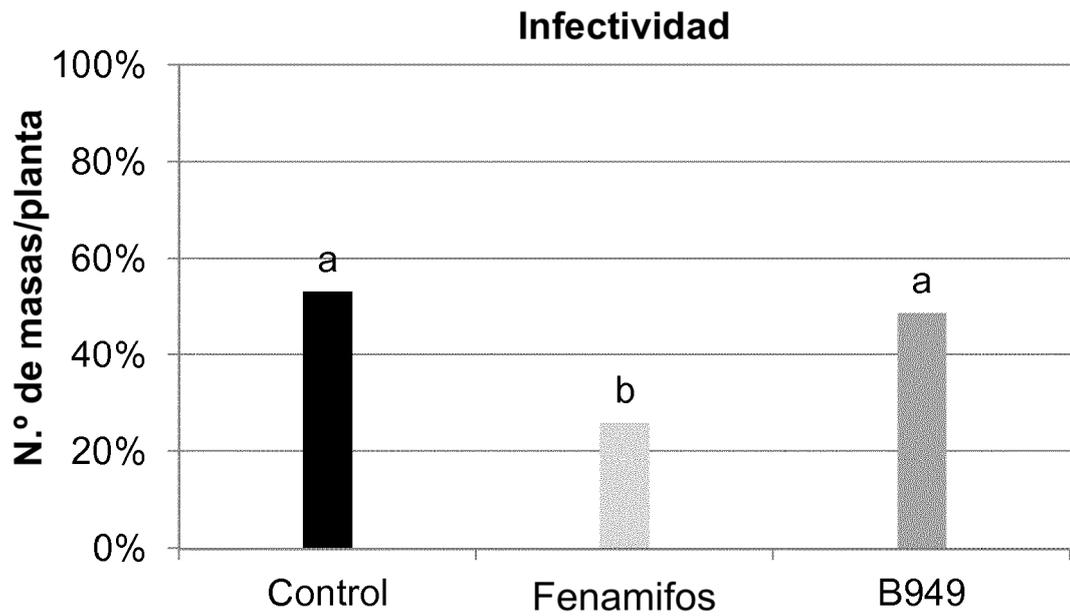


FIG. 25

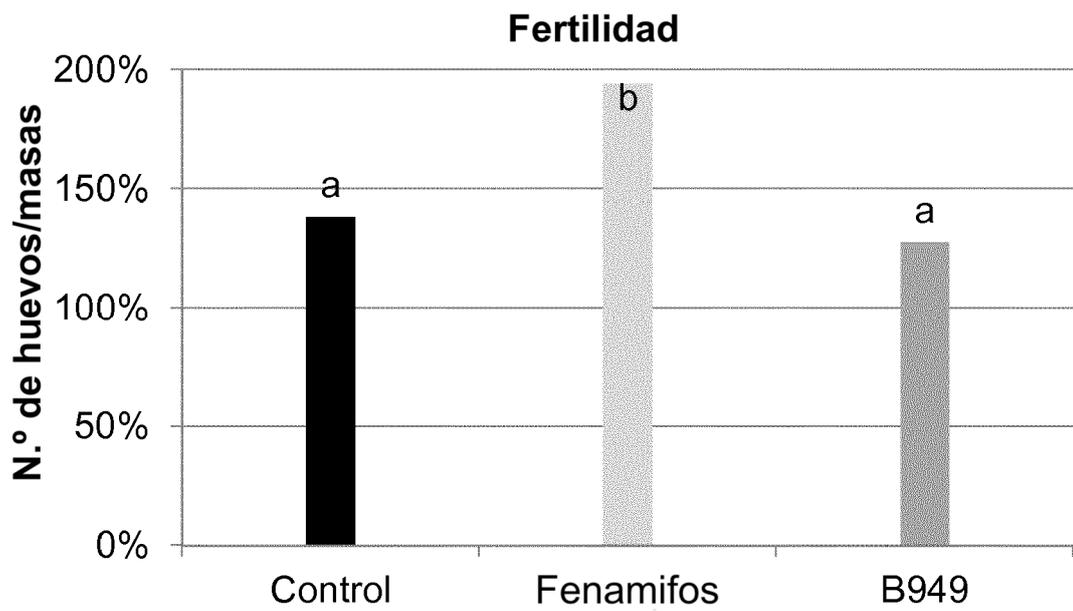


FIG. 26

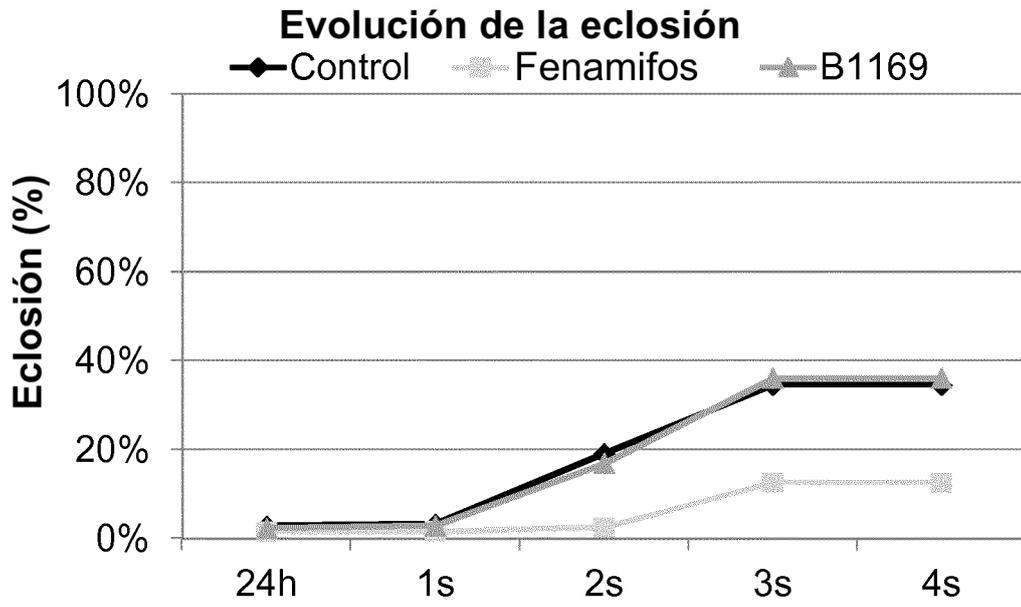


FIG. 27

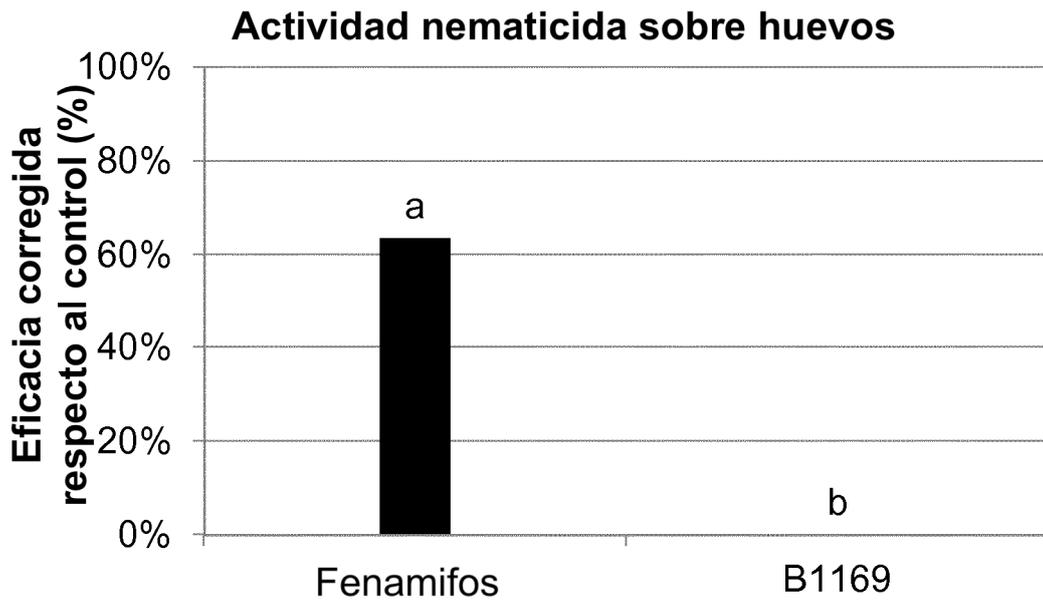


FIG. 28

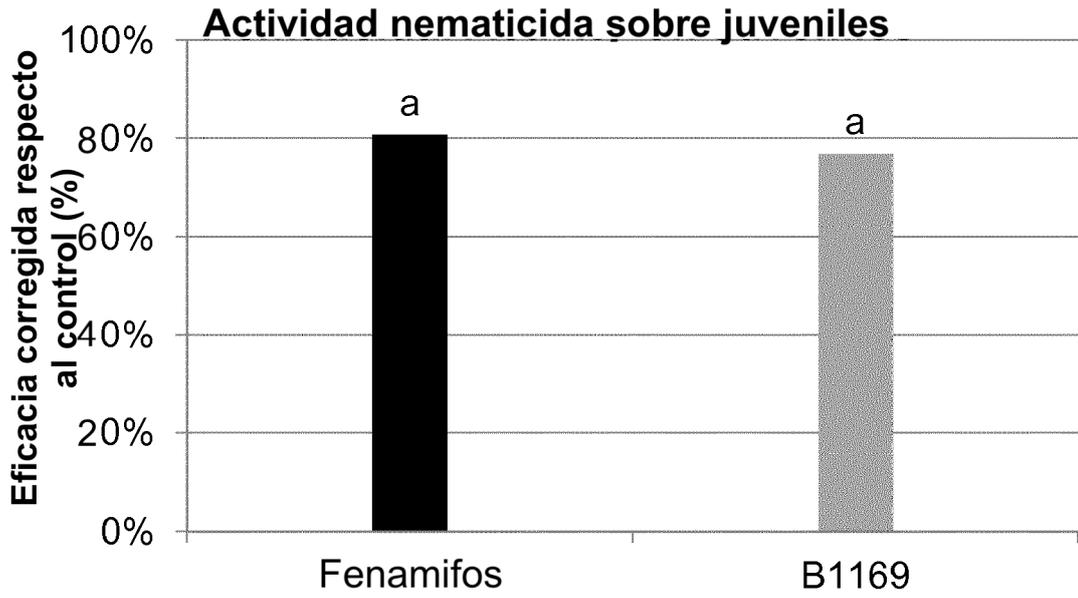


FIG. 29

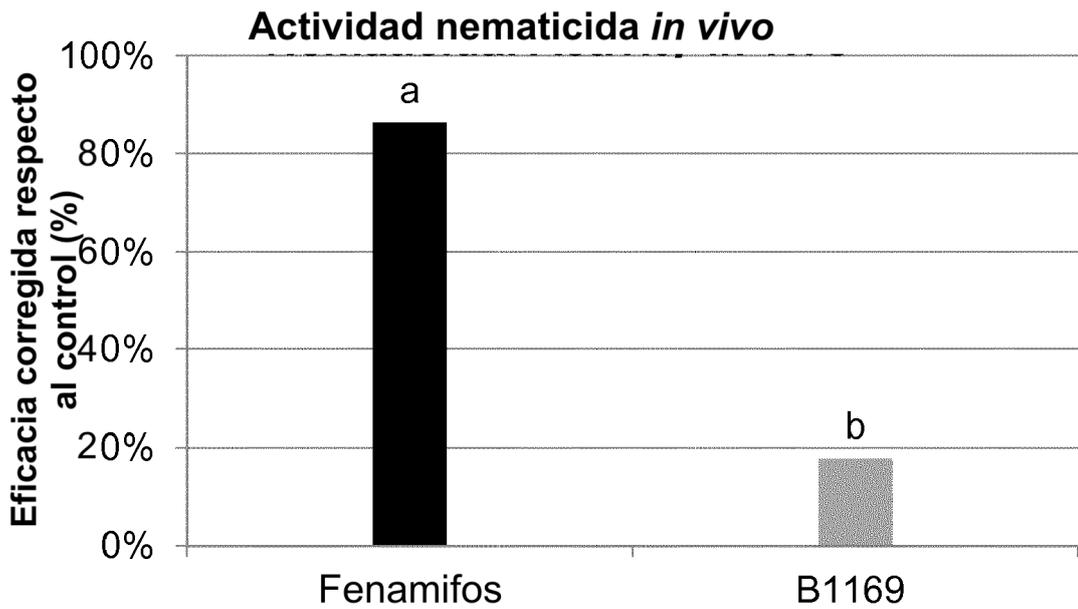


FIG. 30

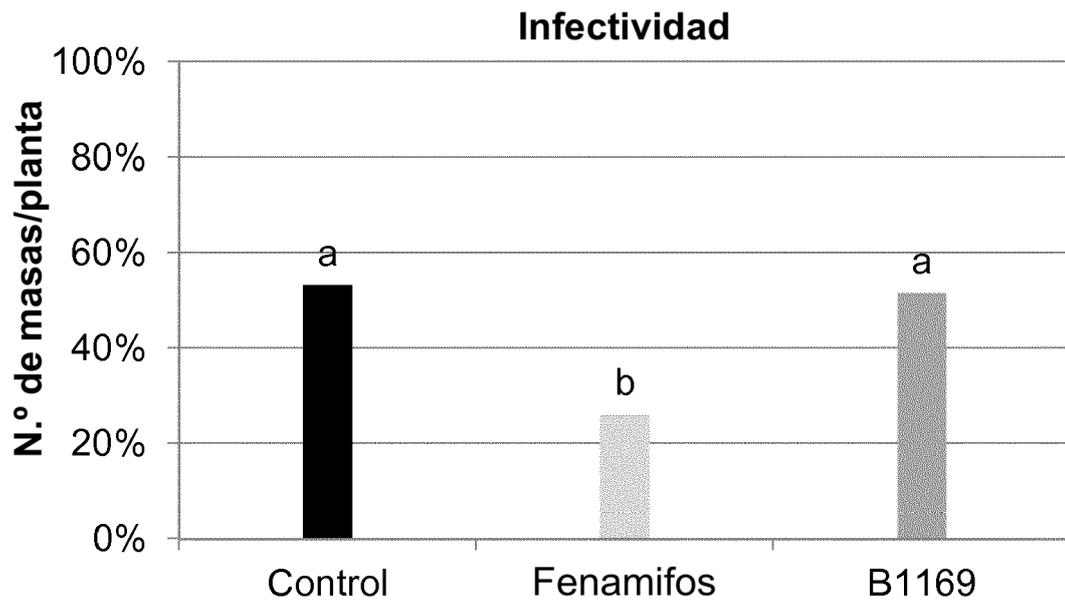


FIG. 31

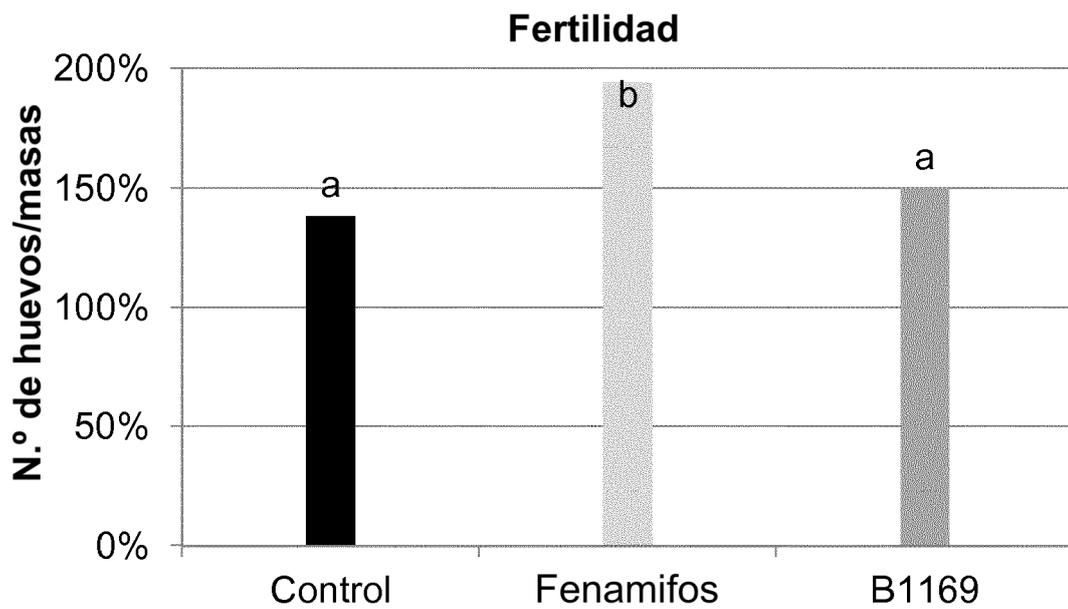


FIG. 32

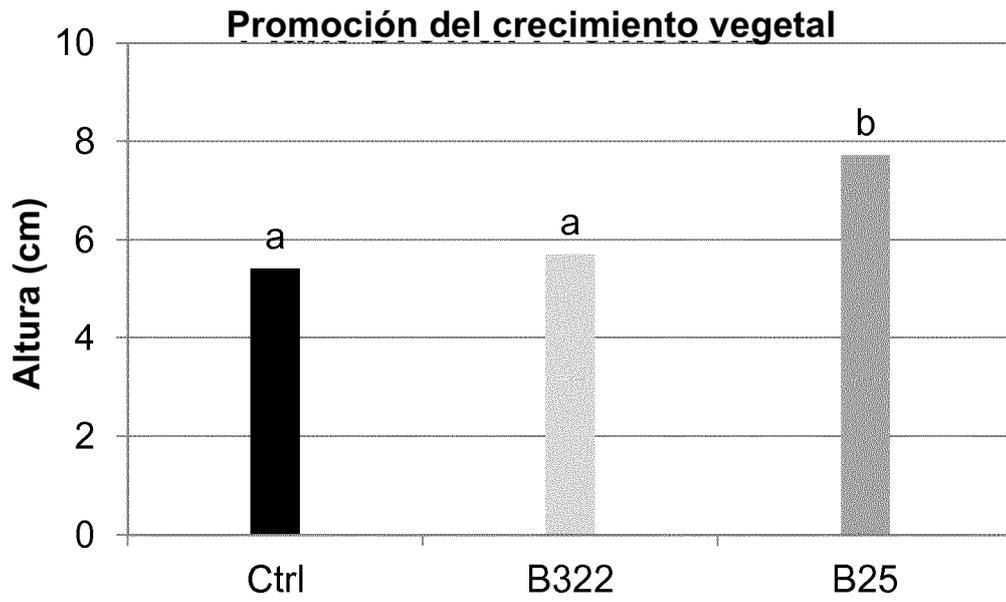


FIG. 33

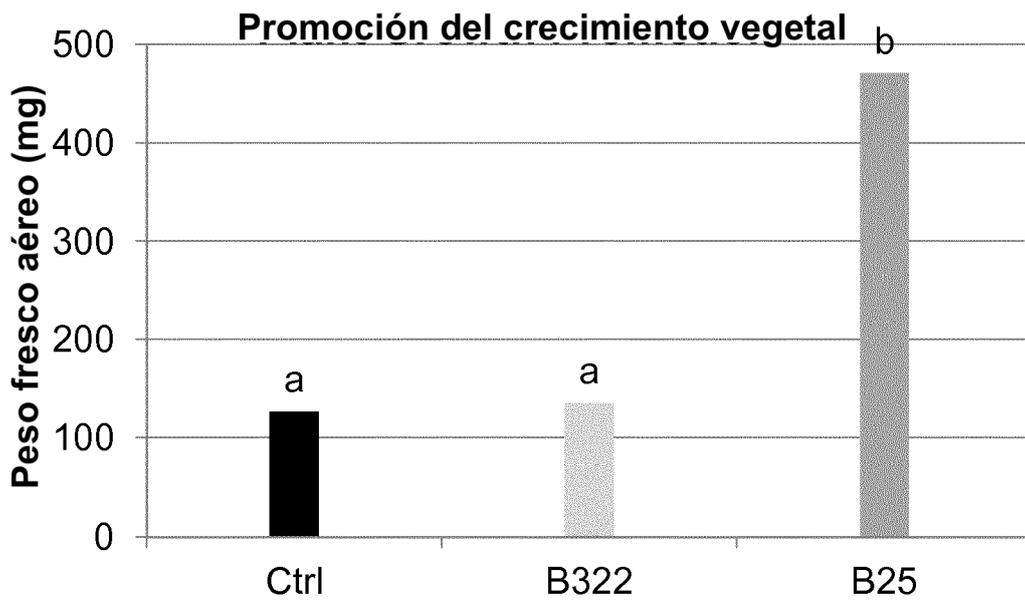


FIG. 34

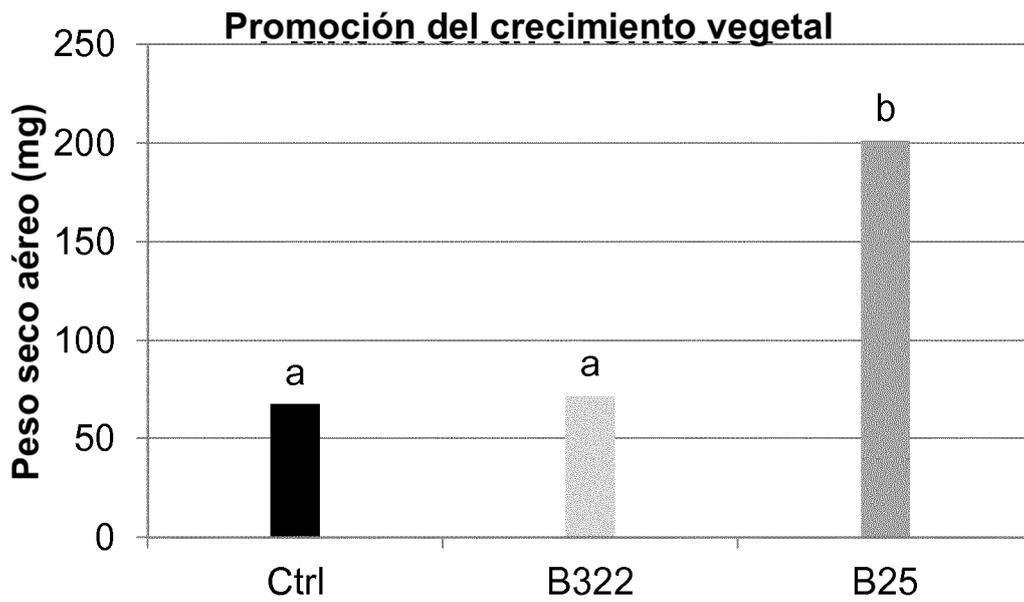


FIG. 35

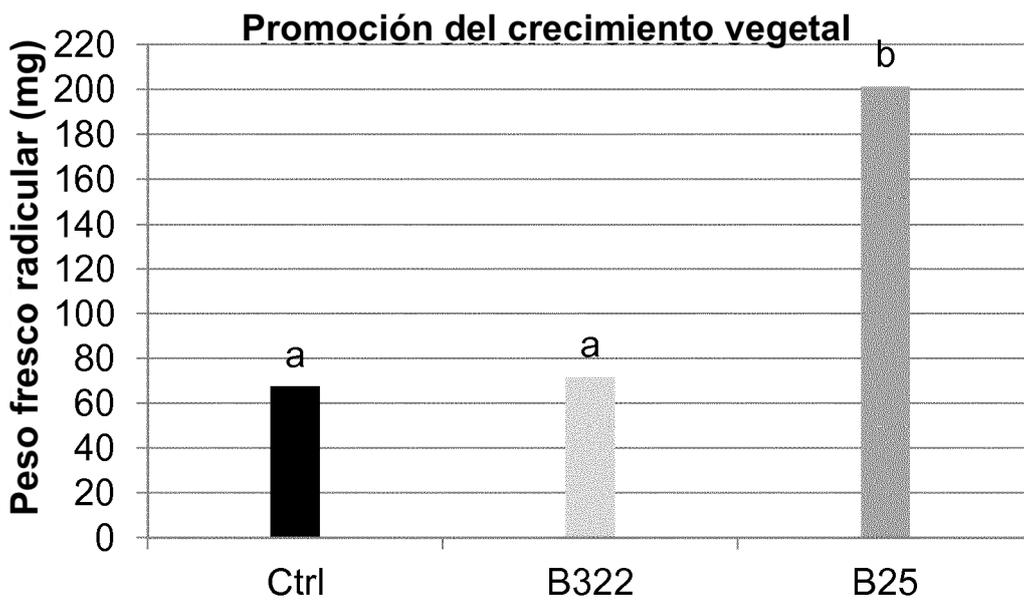


FIG. 36

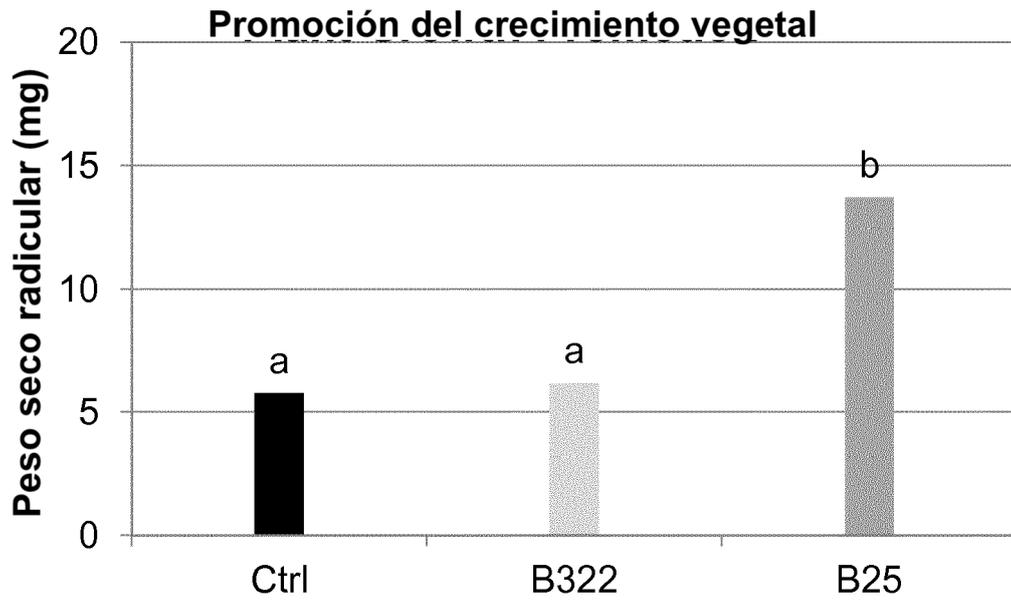


FIG. 37

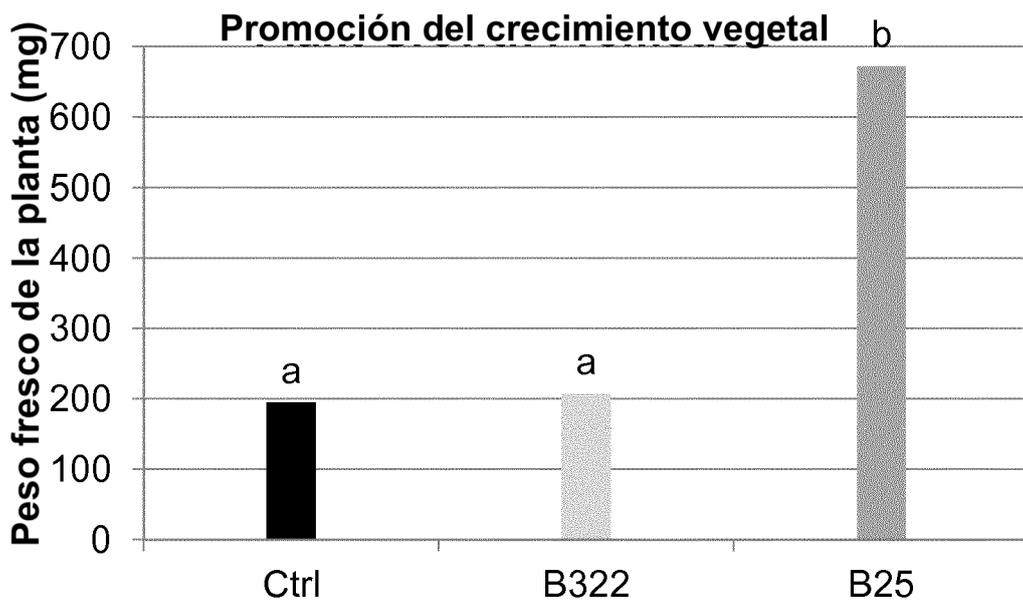


FIG. 38

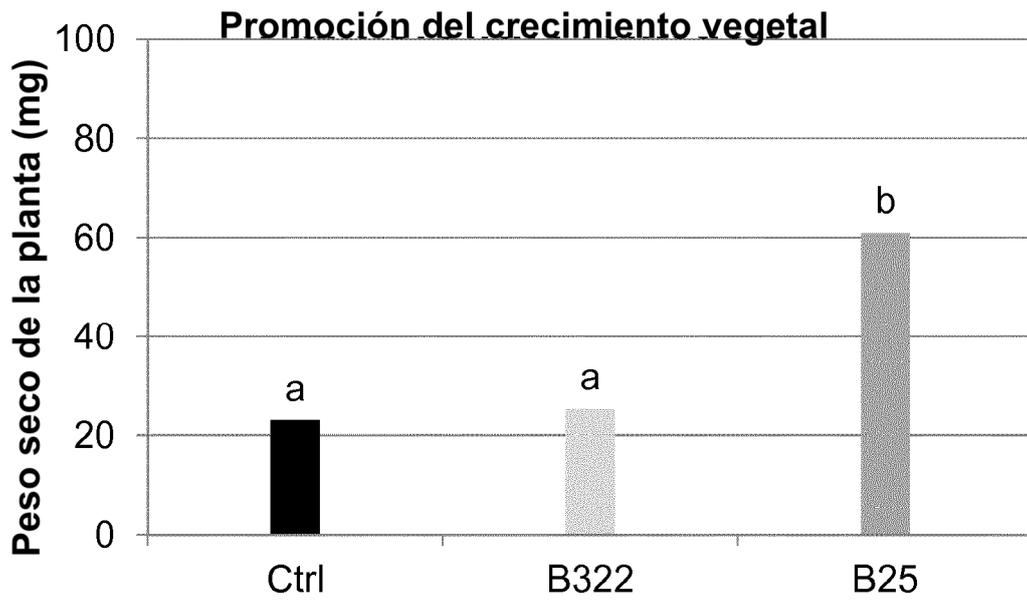


FIG. 39