

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 819 425**

51 Int. Cl.:

A01N 63/00 (2010.01)

C12R 1/41 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.02.2016 PCT/EP2016/053551**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.08.2016 WO16131953**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.02.2016 E 16705519 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.06.2020 EP 3258785**

54 Título: **Ensifer adhaerens con actividad nematocida**

30 Prioridad:

19.02.2015 EP 15382067

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

16.04.2021

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**LARA SÁNCHEZ, JOSE MANUEL y
FERNÁNDEZ CASTILLO, CAROLINA**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 819 425 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

Ensifer adhaerens con actividad nematocida

5 **Campo de la invención**

La presente invención se encuadra dentro del campo del control biológico de nematodos que son capaces de infectar plantas. En concreto, la invención se refiere a bacterias de la especie *Ensifer adhaerens* con actividad nematocida así como al uso de dichas bacterias en procedimientos para el control biológico de nematodos.

10

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 cultivos de leguminosas, cereales, banano, yuca, cocotero, remolacha azucarera, caña de azúcar, patata, hortalizas, cultivos ornamentales y frutales.

15

20

25

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.

30

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.

35

Con la aplicación de la nueva directiva europea 2009/128/EC 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.

40

45

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 bacterianas pertenecientes a la especie *Sinorhizobium meliloti*. En particular, Shahid Shaukat *et al.* (Shahid Shaukat S. *et al.* 2002. Pakistan Journal of Biol. Sci., 5(6): 669-671) da a conocer la actividad nematocida *in vitro* de *Sinorhizobium meliloti* frente a juveniles de *Meloidogyne incognita*. Sin embargo, dicha actividad nematocida no está presente en otras especies pertenecientes al género *Sinorhizobium* como evidenciaron Duponnois *et al.* (Duponnois R. *et al.* 1999. Eur. J. Soil. Biol., 35(2):99-105) quienes describieron que cepas de la especie *Sinorhizobium teranga* no tienen efecto sobre la multiplicación de *Meloidogyne javanica* en la planta de *Acacia holosericea*.

50

Sumario de la invención

En un primer aspecto, la invención se refiere a un microorganismo de la especie *Ensifer adhaerens*, que tiene actividad nematocida sobre un nematodo del género *Meloidogyne*, en el que el microorganismo se selecciona del grupo que consiste en:

55

(i) *E. adhaerens* cepa B742, depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con el número de registro CECT 8809,

60

(ii) *E. adhaerens* cepa B758, depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con el número de registro CECT 8810 y,

(iii) *E. adhaerens* cepa B760, depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con el número de registro CECT 8808,

65

o un mutante de dicho microorganismo que mantiene dicha actividad nematocida, en el que el mutante tiene un genoma que tiene una identidad de secuencia de al menos el 95% con el genoma de una de las cepas B742, B758 o B760 de

E. adhaerens.

En un segundo aspecto, la invención se refiere a un cultivo biológicamente puro de un microorganismo según el primer aspecto.

5 En un tercer aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para obtener una biomasa del microorganismo vivo según el primer aspecto que comprende cultivar dicho microorganismo bajo condiciones adecuadas para su crecimiento.

10 En un cuarto aspecto, la invención se refiere a una biomasa del microorganismo vivo según el primer aspecto obtenible mediante el procedimiento del tercer aspecto.

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

20 En un sexto aspecto, la invención se refiere a una semilla suplementada que comprende una semilla, y además el microorganismo del primer aspecto o el cultivo biológicamente puro del segundo aspecto o la biomasa del cuarto aspecto, o el producto fitosanitario del quinto aspecto.

25 En un séptimo aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para controlar biológicamente un nematodo del género *Meloidogyne* que comprende aplicar a dicho nematodo el microorganismo del primer aspecto, el cultivo biológicamente puro del segundo aspecto, la biomasa del cuarto aspecto, o un producto fitosanitario tal como se define en el quinto aspecto de la invención.

30 En un octavo aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para prevenir la infección de una planta por un nematodo del género *Meloidogyne* que comprende aplicar una cantidad efectiva del microorganismo del primer aspecto, el cultivo biológicamente puro del segundo aspecto, la biomasa del cuarto aspecto, o el producto fitosanitario tal como se define en el quinto aspecto de la invención, sobre dicha planta, sobre la semilla de dicha planta, sobre el suelo que rodea dicha planta o sobre un nematodo susceptible de infectar a dicha planta o alternativamente, plantar una semilla de dicha planta suplementada con dicho microorganismo, dicho cultivo biológicamente puro, dicha biomasa o dicho producto fitosanitario tal como se define en el quinto aspecto de la invención.

35 En un noveno aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para tratar una planta infectada por un nematodo del género *Meloidogyne* que comprende aplicar una cantidad eficaz del microorganismo del primer aspecto, el cultivo biológicamente puro del segundo aspecto, o el producto fitosanitario tal como se define en el quinto aspecto, sobre dicha planta o en el suelo que rodea dicha planta.

Breve descripción de las figuras

40 Figura 1. Características morfológicas de *E. adhaerens* cepas B742, B758 y B760 crecidas a 26°C en placas de agar nutritivo.

45 Figura 2. Características morfológicas de *E. adhaerens* cepas B742, B758 y B760 crecidas a 37°C en placas de agar nutritivo.

Figura 3. Diferenciación a nivel de cepa de *E. adhaerens* B742, B758, B760 y DSMZ 23677. Neg, control negativo.

50 Figura 4. Eclosión acumulada de huevos de *M. javanica* incubados con *E. adhaerens* cepa B758 durante 21 días comparada respecto al control sin tratar (control) y al control químico (fenamifos). Los valores son la media de 8 repeticiones por tratamiento.

55 Figura 5. Eficacia *In vitro* de *E. adhaerens* cepa B758 y el control químico de referencia (fenamifos) frente a huevos de *M. javanica* corregida respecto al control. Valores son la media de 8 repeticiones por tratamiento. Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas.

60 Figura 6. Factor de reproducción de los tratamientos con *E. adhaerens* cepa B758 y el control químico de referencia (fenamifos) en comparación con el control en plantas de tomate. Los valores son la media de 10 repeticiones por tratamiento. Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas.

Figura 7. Actividad nematicida *in vivo* de *E. adhaerens* cepa B758 y el control químico de referencia (fenamifos) frente a huevos y juveniles de *M. javanica* en plantas de tomate corregida respecto al control. Los valores son la media de 10 repeticiones por tratamiento. Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas.

65 Figura 8. Eclosión de huevos acumulada de *M. javanica* incubados con *E. adhaerens* cepas B742, B758, B760 y DSMZ 23677 durante 21 días en comparación con el control sin tratar (control) y el control químico (fenamifos).

Figura 9. Eficacia *in vitro* de *E. adhaerens* cepas B742, B758, B760 y DSMZ 23677 y el control químico de referencia (fenamifos) frente a huevos de *M. javanica* corregida respecto al control.

5 Figura 10. Eclosión de huevos acumulada de *M. incognita* incubados con *E. adhaerens* cepas B742, B758 o B760 durante 21 días en comparación con el control sin tratar (control) y el control químico (Vydate).

Figura 11. Eficacia *in vitro* de *E. adhaerens* cepas B742, B758, B760 y el control químico de referencia (Vydate) frente a huevos de *M. incognita* corregida respecto al control.

10

Descripción detallada de la invención

Los inventores de la presente invención sorprendentemente han descubierto que las bacterias de la especie *Ensifer adhaerens* tienen actividad nematocida. Específicamente, los inventores han aislado 3 cepas bacterianas de *Ensifer adhaerens* (*E. adhaerens* cepa B742, B758 y B760) (ejemplo 1) y han observado que dichas cepas son capaces de inhibir la eclosión de huevos de nematodos de la especie *Meloidogyne javanica* y *Meloidogyne incognita* en ensayos *in vitro* (ejemplos 4 y 5). Dicha actividad nematocida también se confirmó *in vivo* sobre plantas de tomate de la variedad "Marmande" para *E. adhaerens* cepa B758 (ejemplo 3). Los inventores también han descubrieron que otros miembros de la especie *E. adhaerens* tales como la cepa con el número de depósito DSMZ 23677 tiene actividad nematocida (ejemplo 4).

20

Con base en estos descubrimientos se han desarrollado los siguientes aspectos inventivos.

Microorganismos y cultivo

25

En un primer aspecto, la invención relaciona a un microorganismo de la especie *Ensifer adhaerens* que tiene actividad nematocida sobre un nematodo del género *Meloidogyne*, en el que el microorganismo se selecciona del grupo que consiste en:

30 (i) *E. adhaerens* cepa B742, depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con el número de registro CECT 8809,

(ii) *E. adhaerens* cepa B758, depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con el número de registro CECT 8810, y

35

(iii) *E. adhaerens* cepa B760, depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con el número de registro CECT 8808,

40 o un mutante de dicho microorganismo que mantiene dicha actividad nematocida, en el que el mutante tiene un genoma que tiene una identidad de secuencia de al menos el 95% con el genoma de las cepas B742, B758 o B760 de *E. adhaerens*.

45 Dichas cepas fueron depositadas 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 de 28 de Abril de 1977, sobre el reconocimiento internacional del depósito de microorganismos a los fines de patente.

50 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 dichas cepas se muestran en el ejemplo 1, y las condiciones de cultivos se describen más adelante en el contexto del procedimiento para la obtención de la biomasa de la invención.

55 Los microorganismos de la invención pertenecen a la especie identificada en la base de datos de NCBI por el Taxonomy ID: 106592. La especie de *Ensifer adhaerens* fue descrita por Casida, 1982 (Casida Jr., L.E. (1982). *Ensifer adhaerens* gen. nov., sp. nov.: a bacterial predator of bacteria in soil. Int. J. Syst. Bacteriol., 32:339-345). *Sinorhizobium morelense* y *Sinorhizobium adhaerens* son sinónimos de *Ensifer adhaerens*.

60 El término de "microorganismos de la invención" incluye *E. adhaerens* cepa B742 (CECT 8809), B758 (CECT 8810), B760 (CECT 8808) con actividad nematocida y también sus mutantes que mantienen dicha actividad nematocida, en el que el mutante tiene un genoma que tiene una identidad de secuencia de al menos el 95% con el genoma de una de las cepas B742, B758 o B760 de *E. adhaerens*. En una realización particular, el microorganismo de la invención es *E. adhaerens* cepa B742, depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con el número de registro CECT 8809 o un mutante del mismo que mantiene su actividad nematocida, en el que el mutante tiene un genoma que tiene una identidad de secuencia de al menos el 95% con el genoma de la cepa B742 de *E. adhaerens*. En otra realización particular, el microorganismo de la invención es *E. adhaerens* cepa B760, depositada en la Colección Española de

65

Cultivos Tipo (CECT) con el número de registro CECT 8808 o un mutante del mismo que mantiene su actividad nematocida, en el que el mutante tiene un genoma que tiene una identidad de secuencia de al menos el 95% con el genoma de la cepa B760 de *E. adhaerens*. En una realización preferida, el microorganismo de la realización es *E. adhaerens* cepa B758, depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con el número de registro CECT 8810 o un mutante del mismo que mantiene su actividad nematocida, en el que el mutante tiene un genoma que tiene una identidad de secuencia de al menos el 95% con el genoma de la cepa B758 de *E. adhaerens*.

Tal como se usa en el primer aspecto de la invención, el término “mutante” se refiere a cualquier microorganismo resultante de una mutación o cambio en el ADN de uno o varios genes de *E. adhaerens* cepa B742, B758 o B760 (CECT 8809, CECT 8810 o CECT 8808, respectivamente) que mantiene esencialmente las mismas características que la cepa parental, y específicamente, que mantiene esencialmente la actividad nematocida, en el que el mutante tiene un genoma que tiene una identidad de secuencia de al menos el 95% con el genoma de una de las cepas B742, B758 o B760 de *E. adhaerens*.

El mutante puede producirse de manera natural o intencionada por procedimientos de mutagénesis conocidos en el estado de la técnica, tal como, por ejemplo pero sin limitarse a, hacer crecer el microorganismo original en presencia de agentes causantes de estrés o mutagénicos, o por medio de ingeniería genética dirigida a modificar genes específicos.

En una realización particular, el mutante de *E. adhaerens* cepa B742, B758 o B760 tiene un genoma que tiene una identidad de secuencia de al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98%, al menos el 99% o mayor con el genoma de una de las cepas B742, B758 o B760 de *E. adhaerens*. La identidad de secuencia entre los genomas de dos microorganismos puede determinarse usando algoritmos implementados en un ordenador y procedimientos que se conocen ampliamente por un experto 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).

La expresión “actividad nematocida” tal como se usa en el presente documento, se refiere a la capacidad de inhibir la eclosión de huevos y/o paralizar las formas larvales de un nematodo en cualquiera de sus etapas o prevenir el desarrollo o crecimiento de un nematodo.

El término “nematodo”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a un filo de organismos pluricelulares pseudocelomados del grupo *Ecdysozoa*. El término “nematodo” tal como se usa en el presente documento incluye cualquier nematodo. Aunque los microorganismos de la invención pueden tener actividad nematocida sobre cualquier nematodo, preferiblemente tienen actividad nematocida sobre un nematodo fitoparásito o fitopatógeno.

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

- *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. zaeae*, *P. thornei*, *P. neglectus*), *Radopholus* (*R. similis*, *R. citrophilus*), *Scutellonema bradys*, *Hirschmanniella*.
- *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*).
- *Ectoparásitos*: nematodos fitófagos de vida libre. Solo 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.

Los microorganismos de la invención tienen actividad nematocida sobre nematodos que pertenecen al género *Meloidogyne*. Los microorganismos de la invención pueden tener actividad nematocida sobre cualquier nematodo parásito o patógeno de plantas de los mencionados anteriormente. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de nematodos parásitos o patógenos de plantas sobre los que los microorganismos de la invención pueden tener actividad nematocida incluyen nematodos pertenecientes a los géneros, *Heterodera*, *Globodera*, *Pratylenchus*, *Paratylenchus*, *Rotylenchus*, *Xiphinema*, *Trichodorus*, *Ditylenchus*, *Criconemella* (*Mesocriconema*), *Helicotylechus*, *Longidorus*, *Paratrichodorus*, *Belonolaimus* y *Radopholus*.

Los microorganismos de la invención tienen actividad nematocida sobre un nematodo del género *Meloidogyne*. En una realización particular, los microorganismos de la invención tienen actividad nematocida sobre *Meloidogyne javanica*. En otra realización particular, los microorganismos de la invención tienen actividad nematocida sobre un *Meloidogyne incognita*. El término "*Meloidogyne*", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un género de nematodos identificados en la base de datos de NCBI por el Taxonomy ID: 189290.

El término "*Meloidogyne javanica*" o "*M. javanica*", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una especie de los denominados nematodos del nódulo de la raíz identificada en la base de datos de NCBI por el Taxonomy ID: 6303.

Como se usa en el presente documento, el término "*Meloidogyne incognita*" o "*M. incognita*" se refiere a una especie de los denominados nematodos del nódulo de la raíz del sur identificada en la base de datos de NCBI por el Taxonomy ID: 6306.

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 raíz que drenan los nutrientes de la planta.

El término "*Globodera*", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un género de nematodos identificados en la base de datos de NCBI por el Taxonomy ID: 31242 y también denominado "nematodos formadores de quistes".

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

Los microorganismos de la invención pueden tener actividad nematocida sobre cualquiera de los estadios de un nematodo, incluyendo huevos, formas juveniles y formas adultas. En una realización particular, los microorganismos de la invención tienen actividad nematocida sobre huevos de nematodos. En otra realización particular, los microorganismos de la invención tienen actividad nematocida sobre formas juveniles de nematodos. En una realización particular, los microorganismos de la invención tienen actividad nematocida sobre huevos de nematodos y sobre formas juveniles de nematodos. En otra realización particular, los microorganismos de la invención tienen actividad nematocida sobre la forma adulta de nematodos. En otra realización particular, los microorganismos de la invención tienen actividad nematocida sobre huevos de nematodos y sobre la forma adulta de nematodos. En otra realización particular, los microorganismos de la invención tienen actividad nematocida sobre formas juveniles de nematodos y sobre la forma adulta de nematodos. En otra realización particular, los microorganismos de la invención tienen actividad nematocida sobre huevos de nematodos, sobre formas juveniles de nematodos y sobre la forma adulta de nematodos.

La actividad nematocida de un microorganismo puede determinarse por el experto en la técnica mediante 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 han eclosionado en presencia del agente de control, en este caso el microorganismo cuya eventual actividad nematocida se desea conocer, en comparación con una muestra de control (por ejemplo, la misma cantidad de huevos de nematodos en ausencia del agente de control). Mediante este tipo de ensayo puede determinarse el parámetro "eficacia nematocida" como la diferencia en el porcentaje de huevos eclosionados en presencia del microorganismo con respecto al control en un periodo de tiempo determinado. Cualquier disminución significativa en el porcentaje de huevos que ha eclosionado en presencia del microorganismo con respecto al control indica que dicho microorganismo tiene actividad nematocida.

- Un ensayo *in vitro* sobre juveniles en el que, tras un periodo de tiempo de incubación de las 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 eventual actividad nematocida se desea conocer, en comparación con una muestra de control (por ejemplo, la misma cantidad de juveniles en ausencia del agente de control). La "eficacia nematocida" determinada mediante este tipo de ensayo se define como el porcentaje de mortalidad de juveniles corregidos respecto al control en un periodo de tiempo determinado. Cualquier disminución significativa en el porcentaje de juveniles vivos en presencia del microorganismo con respecto al control indica que dicho microorganismo tiene actividad nematocida.

- 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 después de ser tratada con el microorganismo cuya eventual actividad nematocida se desea conocer, 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 nematocida" determinada mediante este tipo de 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 determinado. Cualquier disminución 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 nematocida.

5 - Un ensayo *in vivo* en el que se inocula una planta con formas juveniles del nematodo, y después de un periodo de tiempo en condiciones adecuadas para el crecimiento de la planta y después de ser tratada con el microorganismo cuya eventual actividad nematocida se desea conocer, se evalúa el número de huevos de nematodos presente en la planta tratada con el microorganismo en comparación con el número inicial de huevos antes del tratamiento. El “factor de reproducción” (RF) determinado mediante este tipo de ensayo se define como la densidad de la población final de nematodo (Pf) en relación con el nivel de inóculo inicial y se calcula como número final de huevos/número inicial de huevos. Este parámetro se ha usado ampliamente en estudios nematológicos para definir la resistencia y susceptibilidad de las plantas a los nematodos fitoparásitos. Cualquier disminución significativa en el factor de reproducción en presencia del microorganismo indica que dicho microorganismo tiene actividad nematocida. Otros parámetros tales como fertilidad e infectividad también son parámetros comúnmente utilizados para evaluar la actividad nematocida. La fertilidad se calcula como huevos totales/masa de huevos y la infectividad como masa de huevos totales/planta.

En una realización particular, la actividad nematocida de los microorganismos de la invención se determina mediante los ensayos usados en los ejemplos 2 a 5 de la presente memoria descriptiva.

Los microorganismos de la invención tienen una eficacia nematocida 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 del 100% respecto a un control.

En una realización particular, los microorganismos de la invención tienen una eficacia nematocida, medida como eficacia corregida en la reducción de la eclosión de huevos de *M. javanica*, determinada mediante un ensayo *in vitro* sobre huevos de *M. javanica* usando las condiciones descritas en el ejemplo 1 de la memoria descriptiva de, al menos un 60% respecto a un control; o de al menos un 30% respecto a un control, usando las condiciones descritas en el ejemplo 4 de la memoria descriptiva.

En otra realización particular, los microorganismos de la invención tienen una eficacia nematocida medida como eficacia corregida en la reducción de eclosión de huevos de *M. incognita*, determinada por medio de un ensayo *in vitro* en huevos de *M. incognita* usando las condiciones descritas en el ejemplo 5 de la memoria descriptiva de al menos el 19% con respecto a un control.

En un segundo aspecto, la invención se refiere a un cultivo biológicamente puro de un microorganismo de la invención.

La expresión “cultivo biológicamente puro”, tal y como se utiliza en el contexto del primer aspecto de la invención, se refiere a un cultivo en el que el microorganismo de la invención puede encontrarse en una proporción de 95% o más, por ejemplo 96% o más, 97% o más, 98% o más, 99% o más o 100%, en comparación con otros organismos presentes en el cultivo. En una realización particular, el cultivo biológicamente puro es un cultivo biológicamente puro de *E. adhaerens* cepa B742 o un mutante del mismo que mantiene su actividad nematocida, en el que el mutante tiene un genoma que tiene una identidad de secuencia de al menos el 95% con el genoma de la cepa B742 de *E. adhaerens*. En otra realización particular, el cultivo biológicamente puro es un cultivo biológicamente puro de *E. adhaerens* cepa B760 o un mutante del mismo que mantiene su actividad nematocida, en el que el mutante tiene un genoma que tiene una identidad de secuencia de al menos el 95% con el genoma de la cepa B760 de *E. adhaerens*. En una realización preferida, el cultivo biológicamente puro es un cultivo biológicamente puro de *E. adhaerens* cepa B758 o un mutante del mismo que mantiene su actividad nematocida, en el que el mutante tiene un genoma que tiene una identidad de secuencia de al menos el 95% con el genoma de la cepa B758 de *E. adhaerens*.

El término “cultivo”, como se utiliza en el contexto del primer aspecto de la invención, se refiere a una población del microorganismo 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 ser añadida al medio de cultivo que es beneficioso para el crecimiento del cultivo o mantenimiento. El término “medio de cultivo” o “medio” es reconocido en la técnica, y se refiere en general a cualquier sustancia o preparado que se utiliza para el cultivo de células vivas. El término “medio”, tal como se utiliza en referencia a un cultivo celular, incluye los componentes del medio ambiente que rodea a las células. El medio puede ser medio sólido, medio líquido, medio gaseoso o una mezcla de las fases y materiales. Los medios de crecimiento incluyen medios de cultivo líquidos, así como medios líquidos que no sostienen el crecimiento celular. El medio también incluye medios gelatinosos tales como agar, agarosa, gelatina y matrices de colágeno. Medios gaseosos ejemplares 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 un material que se ha de usar en un cultivo de células, 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. Del mismo modo, una mezcla en polvo que cuando se mezcla con agua o con otro líquido se convierte en adecuada para el cultivo celular puede ser denominada un “medio en polvo”. “Medio definido” se refiere a los medios que están hechos de componentes que tienen una

constitución química definida (generalmente purificado). Los medios definidos no contienen extractos biológicos no completamente caracterizados como el extracto de levadura y caldo de carne. “Medio rico” incluye los medios que están diseñados para apoyar el crecimiento de la mayoría o todas las formas viables de una especie en particular. Los medios enriquecidos a menudo incluyen extractos biológicos complejos. Cualquier medio de cultivo convencional apropiado para *E. adhaerens* conocido en la técnica puede usarse en la presente invención, tales como, por ejemplo, caldo nutritivo compuesto por extracto de carne (3 g/l) y peptona de soja (5 g/l); o medio LB compuesto por extracto de levadura (5 g/l), triptona (10 g/l) y cloruro de sodio (10 g/l). En una realización particular, el medio de cultivo que puede formar parte del cultivo biológicamente puro de la invención está compuesto por: peptona de soja (3 g/l), triptona (17 g/l), glucosa (2,5 g/l), cloruro de sodio (5 g/l) y fosfato dipotásico (2,5 g/l).

Biomasa y procedimiento para la obtención de biomasa

Los microorganismos de la invención pueden usarse en forma de biomasa de dicho microorganismo multiplicado en cultivo en procedimientos para el control biológico de nematodos, o para prevenir o tratar la infección de planta provocada por nematodos.

Por tanto, en un tercer aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para obtener una biomasa de uno de los microorganismos vivos de la invención, que comprende cultivar dichos microorganismos en condiciones adecuadas para su crecimiento.

El término “biomasa” tal y como se utiliza en el contexto del tercer aspecto de la invención, se refiere al material biológico de organismos vivos, en particular de los microorganismos de la invención. En una realización particular, el microorganismo cultivado es *E. adhaerens* cepa B742 o un mutante del mismo que mantiene su actividad nematocida, en el que el mutante tiene un genoma que tiene una identidad de secuencia de al menos el 95% con el genoma de una de las cepas B742, B758 o B760 de *E. adhaerens*. En otra realización particular, el microorganismo cultivado es *E. adhaerens* cepa B760 o un mutante del mismo que mantiene su actividad nematocida, en el que el mutante tiene un genoma que tiene una identidad de secuencia de al menos el 95% con el genoma de una de las cepas B742, B758 o B760 de *E. adhaerens*. En una realización preferida, el microorganismo cultivado es *E. adhaerens* cepa B758 o un mutante del mismo que mantiene su actividad nematocida, en el que el mutante tiene un genoma que tiene una identidad de secuencia de al menos el 95% con el genoma de una de las cepas B742, B758 o B760 de *E. adhaerens*.

Las condiciones adecuadas para el crecimiento de los microorganismos de la invención serán aquellas condiciones que permitan el mantenimiento y 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 en concentraciones apropiadas para obtener máximos rendimientos de biomasa. 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 como Na, Ca, Mg, Fe o 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.

En una realización particular, las condiciones adecuadas para el crecimiento de los microorganismos de la invención comprenden cultivar el microorganismo en el medio de cultivo bajo condiciones constantes de temperatura, pH y oxigenación. En una realización particular, la temperatura está comprendida entre 25°C y 35°C, preferiblemente es 30°C. En una realización particular, el pH está comprendido entre 5,0 y 9,0, preferiblemente entre 6,0 y 8,0, más preferiblemente es 7,0. En una realización particular, la oxigenación se consigue mediante agitación a velocidades entre 200 y 500 rpm y/o suministro de aire estéril con un caudal fijo entre 0,5 y 1,5 v.v.m; preferiblemente a una velocidad entre 200 y 300 rpm y/o suministro de aire estéril a un caudal fijo entre 0,8 y 1,2 vvm; más preferiblemente, la oxigenación es alcanzada mediante una agitación variable para mantener una concentración mínima de oxígeno disuelto del 80% durante 48 horas.

El tiempo durante el cual se debe mantener el microorganismo bajo las condiciones adecuadas para su crecimiento es el tiempo que sea necesario para que el microorganismo alcance una concentración correspondiente a una transformación de sustrato en biomasa de mínimo un 80%. En una realización particular, dicho tiempo de crecimiento para alcanzar estos rendimientos está entre 1 y 10 días.

Una vez finalizada la etapa de crecimiento de 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 procedimiento para obtener la biomasa de los microorganismos de la invención comprende adicionalmente una etapa de separación de la biomasa del sustrato. En una realización aún más particular, dicha biomasa se separa del sustrato mediante 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 es posible llevar a cabo un secado de la biomasa usando condiciones de bajas temperaturas y/o presiones para retirar la humedad de la biomasa. En una realización más particular, dichas condiciones son entre 18 y 25°C y entre 266.644731 y 799.934192 Pa (2 y 6 mm de

Hg).

Mediante el procedimiento del tercer aspecto se obtiene una biomasa de uno de los microorganismos de la invención. Por tanto, en un cuarto aspecto, la invención se refiere a una biomasa del microorganismo vivo de la invención obtenible mediante el procedimiento según el tercer aspecto.

Producto fitosanitario y semilla suplementada

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

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

El término “excipiente agrícolamente aceptable”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier sustancia o combinación de sustancias que pueden ser utilizadas en el sector agrícola, e incluye cualquier material líquido o sólido agrícolamente aceptable que pueda añadirse y/o mezclarse con el microorganismo de la especie *Ensifer adhaerens* que tiene actividad nematocida sobre un nematodo del género *Meloidogyne*, cultivo biológicamente puro o biomasa de dicho microorganismo, para tenerlo en una forma de aplicación más sencilla o mejorada, o bien con una intensidad de activación aplicable o deseable. Debido a la naturaleza del ingrediente activo de la composición agrícola (microorganismo de la especie *Ensifer adhaerens* que tiene actividad nematocida), dicho vehículo agrícolamente aceptable tiene que permitir, o no perjudicar ni comprometer, la viabilidad y capacidad controladora de dicho microorganismo.

En una realización preferida el microorganismo es *E. adhaerens* cepa B742. En otra realización preferida el microorganismo es *E. adhaerens* cepa B760. En una realización más preferida, el microorganismo es *E. adhaerens* cepa B758. En otra realización el producto fitosanitario de la invención comprende una combinación de dos o más de *E. adhaerens* cepa B742, *E. adhaerens* cepa B760 y *E. adhaerens* cepa B758.

Todas las realizaciones descritas en el primer, segundo, tercer y cuarto aspecto de la invención son aplicables al quinto aspecto 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 mojables (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 en una cantidad adecuada de biomasa de *Ensifer adhaerens* para asegurar una concentración entre 10^3 - 10^{15} UFC/g 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 y similares. 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 y similares.

El producto fitosanitario de la invención puede contener, si se desea, además, otros ingredientes o constituyentes empleados habitualmente en los productos fitosanitarios, tales como, pero no limitados a, solventes, agentes activos o reguladores de pH, fertilizantes, etc., siempre y cuando todos ellos permitan o no perjudiquen ni comprometan la viabilidad del microorganismo presente en el producto fitosanitario. Dichos ingredientes o constituyentes empleados habitualmente en los productos fitosanitarios son, en general, conocidos por los expertos en la técnica.

El producto fitosanitario de la invención puede obtenerse por procedimientos convencionales basados, generalmente, en la mezcla de los distintos componentes de la composición agrícola en las cantidades apropiadas.

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:

(i) una semilla, y además,

(ii) un producto seleccionado del grupo que consiste en:

- 5 (a) el microorganismo del primer aspecto;
- (b) el cultivo biológicamente puro del segundo aspecto;
- 10 (c) la biomasa del cuarto aspecto; y
- (d) el producto fitosanitario del quinto aspecto.

Dicha semilla puede ser una semilla de cualquier planta con interés agronómico, forestal, alimenticio (para alimentación humana o animal), aplicaciones ornamentales, energéticas, etc.

15 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*.

20 El término "*Solanaceae*", tal y como se usa en el presente documento, se refiere a una familia de plantas identificada en la base de datos de NCBI por el 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 no limitativos de plantas de la familia *Solanaceae* incluyen los géneros *Solanum*, *Lycianthes*, *Cestrum*, *Nolana*, *Lycium*, *Nicotiana* y *Brunfelsia*.

25 En una realización más particular, la semilla suplementada de la invención comprende una semilla de la planta de la familia *Solanaceae*, preferiblemente del género *Solanum*.

30 El término "*Solanum*", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un género de plantas identificado en la base de datos de NCBI por el Taxonomy ID: 4107. Ejemplos ilustrativos no limitativos de plantas del género *Solanum* incluyen *S. lycopersicum* (tomate), *S. tuberosum* (patata) y *S. melongena* (berenjena).

En una realización aún más particular, la semilla suplementada de la invención comprende una semilla de una planta de la especie *Solanum lycopersicum*.

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

40 En una realización aún más particular, la semilla suplementada de la invención comprende una semilla de una planta de la especie *Solanum lycopersicum* variedad "Marmande".

45 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 de 5 a 10; siendo dichos frutos de tamaño grande, aplanados y estriados, y tienen un color rojo brillante.

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

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

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

60 El término "*Cucurbitaceae*", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una familia de plantas identificada en la base de datos de NCBI por el Taxonomy ID: 3650. Ejemplos ilustrativos no limitativos de plantas de la familia *Cucurbitaceae* cuyas semillas se pueden emplear para obtener la semilla suplementada de la invención incluyen los géneros *Cucurbita* (plantas productoras de la calabaza y el 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*.

65

Los autores de la presente invención han demostrado que la actividad nematocida no es exclusiva de las cepas de *Ensifer adhaerens* de la invención y que esta actividad nematocida está presente en otras cepas de la especie *Ensifer adhaerens*.

5 Por tanto, en un aspecto, la semilla suplementada dada a conocer comprende cualquier microorganismo que pertenece a la especie *Ensifer adhaerens* que tiene actividad nematocida o un mutante de dicho microorganismo que mantiene dicha actividad nematocida como ingrediente activo de grado técnico (IAGT) con actividad nematocida.

10 En otro aspecto, la semilla suplementada dada a conocer comprende un cultivo biológicamente puro de cualquier microorganismo que pertenece a la especie *Ensifer adhaerens* que tiene actividad nematocida o un mutante de dicho microorganismo que mantiene dicha actividad nematocida como ingrediente activo de grado técnico (IAGT) con actividad nematocida.

15 En otro aspecto, la semilla suplementada dada a conocer comprende una biomasa de cualquier microorganismo que pertenece a la especie *Ensifer adhaerens* que tiene actividad nematocida o un mutante de dicho microorganismo que mantiene dicha actividad nematocida como ingrediente activo de grado técnico (IAGT) con actividad nematocida.

20 En otro aspecto, la semilla suplementada dada a conocer comprende un producto fitosanitario que comprende cualquier microorganismo que pertenece a la especie *Ensifer adhaerens* que tiene actividad nematocida o un mutante de dicho microorganismo que mantiene dicha actividad nematocida o un cultivo biológicamente puro de dicho microorganismo o mutante del mismo, o una biomasa de dicho microorganismo o mutante de la misma como ingrediente activo de grado técnico (IAGT) con actividad nematocida y también un excipiente agrícolamente aceptable.

25 En una realización preferida el microorganismo es *E. adhaerens* cepa B742. En otra realización preferida el microorganismo es *E. adhaerens* cepa B760. En una realización más preferida el microorganismo es *E. adhaerens* cepa B758. En otro aspecto, el microorganismo dado a conocer es *E. adhaerens* cepa TA12-B, depositado en la Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares (DSMZ) con el número de registro DSMZ 23677. En otra realización el producto fitosanitario de la invención comprende una combinación de dos o más de *E. adhaerens* cepa B742, *E. adhaerens* cepa B760, *E. adhaerens* cepa B758 y *E. adhaerens* cepa TA12-B.

30 Tal como se usa en el sexto aspecto de la invención, el término “mutante” se refiere a cualquier microorganismo que resulta de una mutación o cambio en el ADN de uno o varios genes de *E. adhaerens* que mantienen esencialmente las mismas características que la cepa parental, y específicamente que mantiene esencialmente la actividad nematocida, en el que el mutante tiene un genoma que tiene una identidad de secuencia de al menos el 95% con el genoma de una de las cepas B742, B758 o B760 de *E. adhaerens*.

35 Los términos “actividad nematocida” y “nematodo” se han definido en el contexto del primer aspecto de la invención. Todas las realizaciones dadas a conocer en el primer aspecto de la invención son aplicables al sexto aspecto de la invención.

40 Tal como se usa en el contexto del sexto aspecto de la invención, la expresión “cultivo biológicamente puro” se refiere a un cultivo en el que el microorganismo del primer aspecto puede encontrarse en una proporción de 95% o más, por ejemplo de 96% o más, de 97% o más, de 98% o más, de 99% o más, o de 100%, en comparación con otros organismos presentes en el cultivo. En una realización particular, el cultivo biológicamente puro es un cultivo biológicamente puro de *E. adhaerens* cepa B742 o un mutante que mantiene su actividad nematocida, en el que el mutante tiene un genoma que tiene una identidad de secuencia de al menos el 95% con el genoma de la cepa B742. En otra realización particular, el cultivo biológicamente puro es un cultivo biológicamente puro de *E. adhaerens* cepa B760 o un mutante del mismo que mantiene su actividad nematocida, en el que el mutante tiene un genoma que tiene una identidad de secuencia de al menos el 95% con el genoma de la cepa B760 de *E. adhaerens*. En otro aspecto particular, el cultivo biológicamente puro dado a conocer es un cultivo biológicamente puro de *E. adhaerens* cepa TA12-B, depositado en la Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares (DSMZ) con el número de registro DSMZ 23677 o un mutante del mismo. En una realización particular, el cultivo biológicamente puro es un cultivo biológicamente puro de *E. adhaerens* cepa B758 o un mutante del mismo que mantiene su actividad nematocida, en el que el mutante tiene un genoma que tiene una identidad de secuencia de al menos el 95% con el genoma de la cepa B758 de *E. adhaerens*.

55 Tal como se usa en el contexto del sexto aspecto de la invención, el término “cultivo” se refiere a una población del microorganismo del primer aspecto de la invención. Un cultivo puede comprender otros elementos además de dicho microorganismo. El término “medio de cultivo” se ha definido en el contexto del segundo aspecto de la invención. Todas las realizaciones dadas a conocer en el contexto del segundo aspecto de la invención son aplicables al sexto aspecto de la invención.

60 Tal como se usa en el contexto del sexto aspecto de la invención, el término “biomasa” se refiere al material biológico de organismos vivos, particularmente del microorganismo del primer aspecto de la invención. En una realización particular, el microorganismo cultivado es *E. adhaerens* cepa B742 o un mutante del mismo que mantiene su actividad nematocida, en el que el mutante tiene un genoma que tiene una identidad de secuencia de al menos el 95% con el

- genoma de la cepa B742 de *E. adhaerens*. En otra realización particular, el microorganismo cultivado es *E. adhaerens* cepa B760 o un mutante del mismo que mantiene su actividad nematocida, en el que el mutante tiene un genoma que tiene una identidad de secuencia de al menos el 95% con el genoma de la cepa B760 de *E. adhaerens*. En otro aspecto particular, el microorganismo cultivado dado a conocer es *E. adhaerens* cepa TA12-B, depositado en la Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares (DSMZ) con el número de registro DSMZ 23677 o un mutante del mismo. En una realización preferida, el microorganismo cultivado es *E. adhaerens* cepa B758 o un mutante del mismo que mantiene su actividad nematocida, en el que el mutante tiene un genoma que tiene una identidad de secuencia de al menos el 95% con el genoma de la cepa B758 de *E. adhaerens*.
- 5
- 10 Condiciones adecuadas para el crecimiento de *Ensifer adhaerens* y para la obtención de biomasa de la misma se han descrito en el contexto del tercer aspecto de la invención. Todas las realizaciones dadas a conocer en el contexto del tercer aspecto de la invención son aplicables al sexto aspecto de la invención.
- 15 El producto fitosanitario del sexto aspecto 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 mojables (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).
- 20 La formulación consiste en una cantidad adecuada de biomasa de *Ensifer adhaerens* 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 y similares. 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 y similares.
- 25
- 30
- 35 El producto fitosanitario del sexto aspecto de la invención puede contener, si se desea, además, otros ingredientes o constituyentes usados habitualmente en los productos fitosanitarios, tales como, pero no limitados a, disolventes, agentes activos o reguladores de pH, fertilizantes, etc., siempre y cuando todos ellos permitan o no perjudiquen ni comprometan la viabilidad del microorganismo presente en el producto fitosanitario. Dichos ingredientes o constituyentes usados habitualmente en los productos fitosanitarios son, en general, conocidos por los expertos en la técnica.
- 40
- 45 El producto fitosanitario del sexto aspecto de la invención puede obtenerse por procedimientos convencionales basados, generalmente, en la mezcla de los distintos componentes de la composición agrícola en las cantidades apropiadas.
- 50 En una realización preferida, la semilla suplementada de la invención comprende el microorganismos del primer aspecto de la invención, el cultivo biológicamente puro del segundo aspecto de la invención, la biomasa del cuarto aspecto de la invención o el producto fitosanitario del quinto aspecto de la invención.
- 55 Todas las realizaciones previamente descritas en el contexto del primer, segundo, tercer, cuarto y quinto aspecto de la invención son aplicables al sexto aspecto de la invención.
- 60 El microorganismo *Ensifer adhaerens* puede recubrir total o parcialmente la semilla.
- 65 Dicha semilla suplementada de la invención puede obtenerse por procedimientos convencionales; a modo ilustrativo, puede obtenerse sumergiendo la semilla en una suspensión o cultivo puro del microorganismo, o, alternativamente, pulverizando dicha suspensión o cultivo sobre la semilla. Otros procedimientos comprenden la mezcla de la semilla y el microorganismo previamente incorporado a un soporte sólido inerte que facilite la adhesión del microorganismo de la invención a dicha semilla.
- Además, para mejorar la adhesión del microorganismo a la semilla puede utilizarse un adhesivo de tipo agrícola que contenga una concentración adecuada de dicho microorganismo, como un gel o polímero de tipo orgánico, como goma arábica, polímeros de alginato, metil celulosa, etc. 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 inerte para el microorganismo (por ejemplo, goma arábica, alginato, metil celulosa, etc.).

Procedimiento para controlar biológicamente un nematodo

5 En un séptimo aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para controlar biológicamente un nematodo del género *Meloidogyne* que comprende aplicar a dicho nematodo el microorganismo del primer aspecto, el cultivo biológicamente puro del segundo aspecto, la biomasa del cuarto aspecto, o el producto fitosanitario del quinto aspecto.

10 En una realización particular, 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.

15 El término “controlar biológicamente un nematodo”, tal como se usa en el presente documento, se refiere al empleo de organismos vivos con objeto de controlar la población de nematodos, es decir, controlar su desarrollo, reproducción, número de individuos, etc., bien de forma directa (por acción de los organismos utilizados como agentes de control biológico) o indirecta (como resultado de los compuestos producidos por dichos organismos). El control biológico de los nematodos puede implicar destruir nematodos o impedir que los nematodos se desarrollen. Controlar biológicamente nematodos tal como se usa en el presente documento también abarca controlar la progenie de los nematodos (desarrollo de quistes viables y/o masas de huevos).

20 El procedimiento según el séptimo aspecto comprende aplicar al nematodo que va a controlarse biológicamente con el microorganismo del primer aspecto, el cultivo biológicamente puro del segundo aspecto, el biomasa del cuarto aspecto, o el producto fitosanitario como se define en el quinto aspecto de la invención.

25 El término “nematodo” ha sido previamente definido, así como realizaciones particulares y preferidas del mismo. En una realización particular, el nematodo es *Meloidogyne javanica*. En otra realización particular, el nematodo es *Meloidogyne incognita*.

30 La puesta en contacto del nematodo que va a controlarse biológicamente con el microorganismo, cultivo, biomasa o producto fitosanitario puede llevarse a cabo por cualquier técnica o procedimiento adecuado, utilizando los aparatos, equipos y dispositivos apropiados. El experto en la técnica conoce las técnicas y procedimientos, así como los aparatos, equipos y dispositivos apropiados para la aplicación de agentes de control biológico. El procedimiento 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 en el que se va a cultivar 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. Asimismo, el microorganismo, cultivo, biomasa o producto fitosanitario puede aplicarse mediante sistemas de riego manual o automatizado.

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

40 El término “fungicida”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a los agentes con capacidad de aumentar la mortalidad o inhibir la tasa de crecimiento de los hongos, y también la capacidad de inhibir la germinación de las esporas de los hongos. Ejemplos ilustrativos no limitativos de fungicidas incluyen:

45 • 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 mercuríco, lactato de mercurio, mercuram (acetato fenilmercuríco), MEMC (cloruro metoxietilmercuríco), PMA (acetato fenilmercuríco).

50 • Compuestos de estaño: acetato de fentina (acetato de estaño trifenilo), cloruro de fentina (cloruro de estaño trifenilo), óxido de estaño de butilo, Plictran (hidróxido de estaño tricloro hexilo).

• Compuestos de zinc: cloruro, cromato, naftenato y oleato de zinc.

55 • Compuestos metálicos: permanganato potásico, cloruro de cadmio, sulfato ferroso, neo-asozin (arseniato férrico monometilo), rizocotol (sulfito de metilarsénico), urbacid, naftaleno de cromo.

• Compuestos de azufre: sofril, cal de azufre.

60 • Compuestos organofosforados: pirazofos, IBP/kitazin, edifenfos, ditalinfos.

• Ditiocarbamatos: zineb, maneb, mancoceb, nabam, tiram, ferbam, bunema, vapam, metiram, metilmetiram.

• Carbamatos: tiofanato, metiltiofanato.

65 • Hidrocarburos halogenados: 1,1-diclorometano, dibromometano, bromometano, cloropicrina, tetracloruro de

carbono, p-diclorobenceno, hexaclorobenceno, cloroneb, bromuro dodecilamónico, hexaclorofeno, pentaclorofenol, isobac (sal monosódica del hexaclorofeno), etc.

- 5 • Nitrocompuestos aromáticos: dinitrofenol, nitrodifenilo, DNOC (4,6-dinitro-o-cresol), dinobuton, tecnaceno, binapacril, dinocap, nirit, brassicol (pentacloronitrobenceno), etc.
- Quininas: cloranil, diclona, benzoquinona, ditianona, etc.
- 10 • Anilidas: benodanil, pirocarbolid, carboxina, oxicarboxina, salicilanilida, etc.
- Compuestos de guanidina: donina (acetato de dodecilguanidina), guzatina, etc.
- Ftalimidas: folpet, captan, captafol, clorotanolino, dimetakion, etc.
- 15 • Pirimidinas: dimetirimol, etirimol, bupirimato, etc.
- Tiodiazoles: dazomet, terazol, milneb, etc.
- Triazinas: anilazina, triadimefon, etc.
- 20 • Isoxazolonas: himexazol, drazoxolon, etc.
- Imidazoles: gliodina, bencmil, tiabendazol, triforina, carbendazin, etc.
- 25 • Otros compuestos heterocíclicos: tridemorf, quinometionato, etc.
- Antibióticos: blasticidina, gliotoxina, griseofulvina, pilioxina, fitobacteriomicina, kasugamicina, validamicina, etc.
- 30 • Aceites: antraceno, naftenato amónico, etc.
- Aldehídos, cetonas, óxidos: formaldehído, p-formaldehído, alcohol alílico, óxido de etileno, óxido de propileno, etc.
- 35 • Otros: rodamina, Trapex® (metilisocianato), diclofuanid, fenaminosulf, etc.
- Productos biológicos: *Trichoderma* (Tusal®), *Streptomyces* (Actinovate®), etc.

40 El término “nematicida”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a los agentes con la capacidad de inhibir la eclosión de huevos y/o paralizar las formas larvarias en cualquiera de sus estadios y/o formas adultas o bien impedir que los nematodos se desarrollen. Ejemplos ilustrativos no limitativos de nematicidas que pueden emplearse en el procedimiento para controlar biológicamente un nematodo incluyen:

- 45 • 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.
- 50 • 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-oxoetanimidotioato de oxamilo).
- 55 • 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-ilfosforotioato 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).
- 60 • 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*).
- 65 • 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. Ejemplos ilustrativos no limitativos 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®) y similares.

Todas las realizaciones definidas para el primer, segundo, tercer, cuarto, quinto y sexto aspecto de la invención son aplicables al séptimo aspecto de la invención.

Particularmente, en una realización el microorganismo de la especie *Ensifer adhaerens* es *E. adhaerens* cepa B742, depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con el número de registro CECT 8809. En otra realización el microorganismo de la especie *Ensifer adhaerens* es *E. adhaerens* cepa B758, depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con el número de registro CECT 8810. En otra realización el microorganismo de la especie *Ensifer adhaerens* es *E. adhaerens* cepa B760, depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con el número de registro CECT 8808. En otro aspecto, el microorganismo dado a conocer de la especie *Ensifer adhaerens* es *E. adhaerens* cepa TA12-B, depositada en la Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares (DSMZ) con el número de registro DSMZ 23677. En otra realización, el microorganismo de la especie *Ensifer adhaerens* es una combinación de dos o más de *E. adhaerens* cepa B742, *E. adhaerens* cepa B758, *E. adhaerens* cepa B760 y *E. adhaerens* cepa TA12-B.

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

En un octavo aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para prevenir la infección de una planta por un nematodo del género *Meloidogyne*, que comprende aplicar una cantidad eficaz del microorganismo del primer aspecto, el cultivo biológicamente puro del segundo aspecto, la biomasa del cuarto aspecto, o el producto fitosanitario como se define en el quinto aspecto, sobre dicha planta, sobre la semilla de dicha planta, en el suelo que rodea a dicha planta o sobre un nematodo susceptible de infectar a dicha planta, o alternativamente, sembrar una semilla de dicha planta suplementada con dicho microorganismo, dicho cultivo biológicamente puro, dicha biomasa, o dicho producto fitosanitario como se define en el quinto aspecto.

La expresión “prevenir la infección de una planta por un nematodo”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier actividad dirigida a evitar, impedir, retardar o retrasar la infección de la planta por un nematodo.

El término “nematodo” ha sido previamente definido. En una realización particular, el nematodo parásito de plantas es *Meloidogyne javanica*. En otra realización particular, el nematodo parásito de plantas es *Meloidogyne incognita*.

El término “planta”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier ser vivo que pertenece al reino *Plantae* (*sensu strictissimo*) que incluye seres vivos eucariotas con capacidad fotosintética, sin capacidad locomotora, y cuyas paredes celulares se componen principalmente de celulosa. En *sensu strictissimo*, 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.

Los términos “*Solanaceae*”, “*Fabaceae*”, “*Malvaceae*”, “*Amaranthaceae*”, “*Cucurbitaceae*”, así como realizaciones preferidas y particulares de los mismos, han sido previamente definidos.

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 aún 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”” han sido previamente descritos.

El término “*Musaceae*”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a una familia de plantas identificada en la base de datos de NCBI por el Taxonomy ID: 4637. Ejemplos ilustrativos no limitativos 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.

El término "*Vitaceae*", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una familia de plantas identificada en la base de datos de NCBI por el 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) productora de uvas.

5 El término "*Rutaceae*", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una familia de plantas identificada en la base de datos de NCBI por el 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 como la naranja, el limón, el pomelo y la lima.

10 El término "*Poaceae*", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una familia de plantas identificada en la base de datos de NCBI por el Taxonomy ID: 4479. Ejemplos ilustrativos no limitativos de plantas de esta familia son plantas productoras de trigo, cebada, arroz o maíz.

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

20 El término, "ornamentales", tal como se usa en el presente documento, se refiere a plantas que se cultivan y comercializan con propósitos decorativos por sus características estéticas, como las flores, hojas, perfume, la textura de su follaje, frutos o tallos en jardines, planta de interior o flor cortada. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, 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 como el narciso), *Rosaceae* (que incluye especies de rosas) o *Geraniae* (que incluye especies de geranios).

25 El término "árbol frutal", tal como se usa en el presente documento, 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. Ejemplos ilustrativos de árboles frutales cuyas semillas se pueden emplear para obtener la semilla suplementada de la invención incluyen aguacate, almendro, banano o platanera, cerezo, ciruelo, cítricos, albaricoque, melocotonero, durián, naranjo, guindo, mango, manzano, membrillo, níspero, nogal y peral.

30 La prevención de la infección de una planta por un nematodo puede llevarse a cabo sobre la planta ya sembrada o sobre la semilla de dicha planta antes de que haya sido sembrada. Así, el procedimiento según el octavo aspecto comprende las siguientes alternativas:

35 (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, en el suelo que rodea dicha planta o sobre un nematodo susceptible de infectar a dicha planta.

40 El término "cantidad eficaz", tal como se usa en el presente documento, 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 este modo, unos resultados beneficiosos o deseados. El término "cantidad eficaz" se refiere a la cantidad mínima de microorganismo en UFC totales (unidades formadoras de colonias), independientemente de que se encuentre en forma de un cultivo, una biomasa o de una formulación de producto fitosanitario. La cantidad eficaz del microorganismo, cultivo biológicamente puro, biomasa o producto fitosanitario que puede aplicarse sobre la planta para evitar, retrasar o reducir la infección por un nematodo del género *Meloidogyne* puede variar dentro de un amplio intervalo y puede determinarse por 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 una planta de la familia *Solanaceae*, preferiblemente una planta del género *Solanum*, aún 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* o *Meloidogyne incognita*, en cuyo caso la cantidad eficaz del microorganismo de la invención está comprendida entre 1×10^5 UFC y 1×10^{12} UFC, preferiblemente entre 1×10^7 UFC y 1×10^{11} UFC.

55 La cantidad eficaz puede aplicarse en una única administración o en varias administraciones. Cuando se aplica en varias administraciones, dichas administraciones pueden ser 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aplicaciones en donde la aplicación 4 se aplica los 10-20 días después de la aplicación 3, y más preferiblemente los 15-20 días después de la aplicación 3. En una realización particular, la cantidad efectiva del microorganismo, cultivo biológicamente puro, biomasa o producto fitosanitario se lleva a cabo 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, donde "n" es un número entero comprendido entre 1 y 10, en donde cada una de las dichas "n" aplicaciones son aplicadas entre 10 y 20 días después de la aplicación precedente, preferiblemente entre 15-20 días después de la aplicación precedente.

65 En una realización aún más particular, la cantidad efectiva del microorganismo, cultivo biológicamente puro, biomasa o producto fitosanitario se realiza en 3 aplicaciones: una primera aplicación antes del trasplante de la planta, una

segunda aplicación después del trasplante y la tercera aplicación después de la segunda aplicación. En una realización más particular, la segunda aplicación se realiza entre 10 y 20 días después del trasplante, preferiblemente 8 días después del trasplante. En una realización más particular, la tercera aplicación se realiza entre 10 y 20 días después de la segunda aplicación, más preferiblemente 15 días después de la segunda aplicación.

En una realización aún más particular, la cantidad efectiva del microorganismo, cultivo biológicamente puro, biomasa o producto fitosanitario 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 aún 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, en el suelo que rodea la planta o sobre un nematodo susceptible de infectar a la planta.

Si se aplica sobre la planta, la aplicación puede hacerse sobre la totalidad de la planta o bien 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 puede aplicarse sobre la planta por cualquier técnica o procedimiento adecuado, utilizando aparatos, equipos y dispositivos apropiados. El experto en la técnica conoce las técnicas y procedimientos, así como aparatos, equipos y dispositivos apropiados para la aplicación de agentes de control biológico sobre plantas. En una realización particular, el microorganismo, cultivo o biomasa se formula en forma de un producto fitosanitario adecuado para su administración a una planta por cualquier técnica o procedimiento convencional y utilizando cualquier dispositivo convencional, por ejemplo, por pulverización, espolvoreo, o por cualquier otro procedimiento de administración agrícola apropiado, por ejemplo mediante 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. El término “semilla”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier etapa 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 volver a crecer otra planta individual de la misma especie. 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 como el microorganismo, cultivo, biomasa o producto fitosanitario a una semilla de una planta.

La aplicación también puede tener lugar en el suelo que rodea 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 como el microorganismo, cultivo, biomasa o producto fitosanitario al suelo que rodea una planta.

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 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 mediante cualquiera de las técnicas o procedimientos descritos en relación con el procedimiento para controlar biológicamente un nematodo según el séptimo aspecto.

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

La semilla suplementada con un microorganismo, cultivo biológicamente puro, biomasa o producto fitosanitario se ha descrito previamente.

El término “sembrar”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a disponer una semilla en un terreno preparado para que germine, dando lugar al desarrollo de una planta. La semilla suplementada de la invención puede sembrarse mediante cualquier técnica adecuada para sembrar semillas de una planta. Dichas técnicas son conocidas por el experto en la técnica.

Todas las realizaciones definidas para los aspectos anteriores de la invención son aplicables al octavo aspecto.

Particularmente, en una realización el microorganismo de la especie *Ensifer adhaerens* es *E. adhaerens* cepa B742, depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con el número de registro CECT 8809. En otra realización el microorganismo de la especie *Ensifer adhaerens* es *E. adhaerens* cepa B758, depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con el número de registro CECT 8810. En otra realización el microorganismo de la especie *Ensifer adhaerens* es *E. adhaerens* cepa B760, depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con el número de registro CECT 8808. En otro aspecto, el microorganismo dado a conocer de la especie *Ensifer*

adhaerens es *E. adhaerens* cepa TA12-B, depositada en la Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares (DSMZ) con el número de registro DSMZ 23677. En otra realización, el microorganismo de la especie *Ensifer adhaerens* es una combinación de dos o más *E. adhaerens* cepa B742, *E. adhaerens* cepa B758, *E. adhaerens* cepa B760 y *E. adhaerens* cepa TA12-B.

En un noveno aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para tratar una planta infectada por un nematodo del género *Meloidogyne* que comprende aplicar una cantidad eficaz del microorganismo del primer aspecto, el cultivo biológicamente puro del segundo aspecto, la biomasa del cuarto aspecto, o el producto fitosanitario como se define en el quinto aspecto, sobre dicha planta o en el suelo que rodea a dicha planta.

La expresión “tratar una planta infectada por un nematodo”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a realizar cualquier actividad dirigida a retardar, detener o disminuir 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 que incluyen, pero no están limitados a, reducción de los síntomas, reducción de la duración de la enfermedad, estabilización de estados patológicos (específicamente para evitar deterioro adicional), retraso de la evolución de la enfermedad, mejora del estado patológico y remisión (tanto parcial como total). El control de la evolución de la enfermedad también implica una extensión 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 previamente. Los procedimientos para aplicar el microorganismo, cultivo, biomasa o producto fitosanitario sobre la planta o en el suelo que rodea la planta se han descrito previamente.

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

En una realización particular, la planta tratada mediante el procedimiento del noveno aspecto pertenece a la familia *Solanaceae*.

En una realización particular del procedimiento del noveno aspecto, la cantidad eficaz de un microorganismo, un cultivo biológicamente puro, una biomasa o un producto fitosanitario 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 procedimiento según el octavo o el noveno aspecto comprende adicionalmente el uso de un fungicida, un nematocida o un insecticida de suelo. Los términos “fungicida”, “nematicida” e “insecticida de suelo”, así como realizaciones particulares de los mismos, se han descrito previamente.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos ilustran la invención y deben considerarse en sentido ilustrativo y no limitante de la misma.

Ejemplo 1

Producción y caracterización de *Ensifer adhaerens* cepa B742, B758 y B760

Producción

Ensifer adhaerens cepa B742, B758 y B760 se aislaron a partir de suelo de un campo gestionado según prácticas de agricultura ecológica ubicado en Barcelona, en febrero de 2011.

Las muestras de suelo se homogenizaron usando un tamiz de 2 mm de tamaño de poro. Las muestras se secaron levemente. Para el aislamiento de bacterias, 20 g de suelo se suspendieron en 100 ml de tampón fosfato salino (KH_2PO_4 2,72 g/l + K_2HPO_4 3,48 g/l). La mezcla se mantuvo en agitación a 300 rpm durante 30 minutos y después se dejó decantar. A continuación, se realizaron diluciones seriadas desde 10^0 hasta 10^{-5} a partir del sobrenadante y 100 μl de cada dilución se sembraron en placas medio de cultivo de patata dextrosa agar (PDA: extracto de patata, 4 g/l; dextrosa, 20 g/l; agar 15 g/l), agar nutritivo (AN: 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) y CZAPEK (sucrosa (30 g/l), 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), K_2HPO_4 (1 g/l) y agar (13,5 g/l)). Estas placas se incubaron en estufa a 26°C y se observaron a diario. Cada una de las colonias que creció (bacterias u hongos) se volvió a sembrar 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 con un raspado de placa en peptona de soja con glicerol al 10% dando lugar a la generación 0 de cada microorganismo, que se conservó a -80°C.

Caracterización

Las cepas se han caracterizado a nivel morfológico y molecular. Para la caracterización morfológica, la bacteria se incubaron en medio general [agar nutritivo (AN)] a 2 temperaturas (26°C y 37°C) y se observaron las características

de las colonias.

Caracterización morfológica:

5 *Ensifer adhaerens* cepa B758, B742 y B760 son bacterias gram-negativas. Tienen colonias con un diámetro de 10 mm después de 96 horas de crecimiento en placas Petri con medio AN en una estufa bacteriológica a temperatura constante de 26°C. Las colonias resultantes son blancas, medianas y circulares con una ligera elevación y márgenes enteros. Cuando crecen a 26°C, las colonias tienen un aspecto opaco de color blanco (figura1). *Ensifer adhaerens* cepa B760 es capaz de crecer a 37°C pero *Ensifer adhaerens* B742 y B758 no (figura2). La morfología tanto a 26°C
10 como a 37°C es la misma.

Caracterización molecular:

15 La identificación molecular de *Ensifer adhaerens* cepa B742, B758 y B760 se realiza por medio de la amplificación de la subunidad 16S del ADN ribosomal con el uso de los cebadores:

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

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

La búsqueda de secuencias coincidentes se realizó usando el software BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) y los resultados mostraron que la secuencia amplificada se encuadraba dentro de la especie mediante *Ensifer adhaerens*.

25 Las secuencias obtenidas del fragmento amplificado por estos cebadores son SEQ ID NO: 3 para la cepa B742, SEQ ID NO: 4 para la cepa B758 y SEQ ID NO: 5 para la cepa B760. Estas secuencias se muestran a continuación:

B742 (SEQ ID NO: 3)

CGAGCGCCCCGCAAGGGGAGCGGCAGACGGGTGAGTAACGCGTGGAATCTACCCTTTTCTACG
 GAATAACGCAGGGAAACTTGTGCTAATAACCGTATGAGCCCTTCGGGGAAAGATTTATCGGGAA
 AGGATGAGCCCGCGTTGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCCATA
 GCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAAACTCCTACGGGAGGC
 AGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGAGTGATGAAG
 GCCCTAGGGTTGTAAAGCTCTTTACCCGGTGAAGATAATGACGGTAACCGGAGAAGAAGCCCCG
 GCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGTTCCGAATTACTGGGC
 GTAAAGCGCACGTAGGCGGACATTTAAGTCAGGGGTGAAATCCCGGGGCTCAACCCCGGAACTG
 CCTTTGATACTGGGTGTCTAGAGTATGGAAGAGGTGAGTGGAATCCGAGTGTAGAGGTGAAAT
 TCGTAGATATTCGGAGGAACACCAGTGCGAAGGCGGCTCACTGGTCCATTACTGACGCTGAGG
 TGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAATG
 TTAGCCGTCGGGCAGTTTACTGTTCCGGTGGCGCAGCTAACGCATTAAACATTCGCGCTGGGGAG
 TACGGTCGCAAGATTA AAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGG
 TTTAATTCGAAGCAACGCGCAGAACCTTACCAGCCCTTGACATCCCGATCGCGGATTACGGAGA
 CGTTTTCTTCAGTTCGGCTGGATCGGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTG
 GAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGCCCTTAGTTGCCAGCATTTAGTTGG
 GCACTCTAAGGGGACTGCCGGTGATAAGCC

ES 2 819 425 T3

B758 (SEQ ID NO: 4)

TGCAGTCGAGCGCCCCGCAAGGGGAGCGGCAGACGGGTGAGTAACGCGTGGGAATCTACCCTTT
TCTACGGAATAACGCAGGGAACTTGTGCTAATACCGTATAAGCCCTTCGGGGGAAAGATTTAT
CGGGAAAGGATGAGCCCGCTTGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGA
TCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAAACTCCTACG
GGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGAGTG
ATGAAGGCCCTAGGGTTGTAAAGCTCTTTCACCGGTGAAGATAATGACGGTAACCGGAGAAGAA
GCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGTTTCGGAATTA
CTGGGCGTAAAGCGCACGTAGGCGGACATTTAAGTCAGGGGTGAAATCCCAGAGCTCAACTCTG
GAACTGCCTTTGATACTGGGTGTCTAGAGTATGGAAGAGGTGAGTGGAATTCGAGTGTAGAGG
TGAAATTCGTAGATATTCGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCACTGGTCCATTACTGACG
CTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGA
TGAATGTTAGCCGTCGGGCAGTTTACTGTTTCGGTGGCGCAGCTAACGCATTAACATTCCGCCT
GGgGAGTACGGTCGCAAGATTAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGC
ATGTGGTTTTAATTCGAAGCAACGCGCAgAACCTtTACCAGCCCTTGACATCCCGATCGCGGATTA
CGGAGACGTTTTCTTCAgTTCGGCTGGATCGGAgACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTGAGCTCG
TGTCGtGAGATGTTGGGTTAAGTCCC

B760 (SEQ ID NO: 5)

AGTCGAGCGCCCCGCAAGGGGAGCGGCAGACGGGTGAGTAACGCGTGGGAATCTACCCTTTTCT
ACGGAATAACGCAGGGAACTTGTGCTAATACCGTATAACCCCTTCGGGGGAAAGATTTATCGG
GAAAGGATGAGCCCGCTTGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCC
ATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAAACTCCTACGGGA
GGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGAGTGATG
AAGGCCCTAGGGTTGTAAAGCTCTTTCACCGGTGAAGATAATGACGGTAACCGGAGAAGAAGCC
CCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGTTTCGGAATTAAGT
GGCGTAAAGCGCACGTAGGCGGACATTTAAGTCAGGGGTGAAATCCCGGGGCTCAACCCCGGAA
CTGCCTTTGATACTGGGTGTCTAGAGTATGGAAGAGGTGAGTGGAATTCGAGTGTAGAGGTGA
AATTCGTAGATATTCGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCACTGGTCCATTACTGACGCTG
AGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGA
ATGTTAGCCGTCGGGCAGTTTACTGTTTCGGTGGCGCAGCTAACGCATTAACATTCCGCCTGGG
GAGTACGGTCGCAAGATTAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATG
TGTTTTAATTCGAAGCAACGCGCAGAACCCTTACCAGCCCTTGACATCCCGATCGCGGATTACGG
AGACGTTTTCTTTCAGTTCGGCTGGATCGGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGT
CGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCACGAGCGCAACCCTCGCCCTTAGTTGCCAGCATTTAGT
5 TGGGCACTCTAAGGGGACTGCCGG

Para demostrar que B742, B758 y B760 son cepas diferentes, se llevó a cabo un protocolo de diferenciación a nivel de cepa. El ADN genómico se extrajo por medio del Kit ZYMO según las instrucciones del fabricante. Se usaron

procedimientos de toma de huellas (del inglés, *fingerprinting*) que incluyen PCR REP y ERIC (Versalovic, J., Schneider, M., De Bruijn, F. J., & Lupski, J. R. (1994). Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods in molecular and cellular biology*, 5(1), 25-40.; Ateba, C. N., & Mbewe, M. (2013). Determination of the genetic similarities of fingerprints from *Escherichia coli* O157: H7 isolated from different sources in the North West Province, South Africa using ISR, BOXAIR and REP-PCR analysis. *Microbiological research*, 168(7), 438-446).

Los cebadores usados para tipificar *E. adhaerens* fueron:

REP 1R 5'-IIICGICGICATCIGGC-3' (SEQ ID NO: 6)

Rep2I 5'-ICGICTTATCIGGCCTAC-3' (SEQ ID NO: 7) y

ERIC 1 5'-AGTAAGTGACTGGGGTGAGC-3' (SEQ ID NO: 8)

ERIC 2 5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3' (SEQ ID NO: 9)

La amplificación del ADN se llevó a cabo en un termociclador Eppendorf programado para una etapa inicial de desnaturalización a 95°C (7 minutos), seguido de 30 ciclos de desnaturalización durante 6 minutos a 90°C, hibridación durante 1 minuto a la temperatura apropiada (REP a 40°C y ERIC a 52°C), extensión durante 8 minutos a 65°C y una extensión final durante 8 minutos a 65°C. Las muestras se mantuvieron a 4°C hasta la separación electroforética de los productos de amplificación. Se hizo la electroforesis de los productos de PCR en gel de agarosa al 1,5% en tampón Tris-borato. Los geles se tiñeron con GEL RED® y se visualizaron en un transiluminador de luz UV.

Los 4 aislados tipificados usando el análisis PCR REP produjeron patrones diferentes con bandas de diferente tamaño (figura3). Los resultados de este estudio permitieron concluir que *Ensifer adhaerens* B742, B758, B760 y DSMZ23677 son aislados diferentes.

Ejemplo 2

Actividad nematocida in vitro de *Ensifer adhaerens* cepa B758 frente a huevos de *Meloidogyne javanica*

Materiales y procedimientos

La actividad nematocida de *Ensifer adhaerens* frente a huevos de *Meloidogyne javanica* se evaluó mediante ensayos *in vitro*. Los huevos de nematodos se obtuvieron a partir de raíces de tomate infectadas con *M. javanica*. Alícuotas (200-300 µl) de las suspensiones de huevos que contenían 350 huevos se pipetearon en las cámaras de eclosión que se habían colocado previamente en placas de micropocillos estériles (con una cámara de eclosión por pocillo) que contiene 3 ml de agua destilada estéril. Las placas se dejaron entonces durante 24 horas para recoger cualquier juvenil (J₂) presente en la suspensión de huevos. Las cámaras se transfirieron entonces a una nueva placa de micropocillos y el agente de control biológico *Ensifer adhaerens* cepa B758 se añadió a una concentración de 1,19 x 10¹⁰ UFC/ml. Los pocillos que contenían agua destilada estéril sirvieron como control y también se incluyó un control químico (fenamifos). Se prepararon 8 repeticiones por tratamiento. Las placas se incubaron a 26°C en oscuridad y el número de J₂ eclosionados se registró después de 1, 7, 15 y 21 días. En cada momento, las cámaras de eclosión se retiraron de los pocillos y se colocaron en nuevos pocillos que contenían agua destilada estéril fresca.

Resultados y discusión

Tabla 1.- Eficacia (%) corregida respecto al control del producto químico usado como referencia y *E. adhaerens* cepa B758 frente a huevos de *M. javanica*.

Tratamientos	Eficacia (%)
Fenamifos	90,89
<i>E. adhaerens</i> B758	79,12

En el seguimiento de la eclosión de huevos de *M. javanica* durante los 21 días de duración del ensayo, el tratamiento con *E. adhaerens* cepa B758 mostró una reducción significativa respecto al control (figura 4).

Tres semanas después de la aplicación de los distintos tratamientos, 35,27% de los huevos no tratados (control) eclosionaron, mientras que de los tratados con *E. adhaerens* cepa B758 eclosionaron un 7,36% y un 3,21% de los tratados con fenamifos.

Por lo tanto, *E. adhaerens* cepa B758 presenta una eficacia de reducción de la eclosión del 79,12% 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 90,89% (figura 5).

Ejemplo 3

5 Actividad nematocida *in vivo* de *Ensifer adhaerens* cepa B758 frente a *Meloidogyne javanica*

Materiales y Procedimientos

10 Semillas de la variedad de tomate comercial variedad “Marmande” se sembraron en 36 semilleros (5x5x6 cm) que contenían turba estéril (Compo®) y se mantuvieron en un fitotrón (Fitoclima 1200, ARALAB) en condiciones controladas (22°C; 60% RH; 14:10 h luz:oscuridad) durante 4 semanas. Plántulas de tomate comercial variedad Marmande se inocularon con 10 ml/planta de una suspensión que contenía 2,24x10⁸ UFC/ml del agente de control biológico (ACB) *Ensifer adhaerens* cepa B758.

15 Setenta y dos horas (72 h) después de la primera aplicación (A) del ACB, las plántulas se trasplantaron individualmente a macetas de 1,5 l que contenían una mezcla de arena de río esterilizada, turba y perlita (4:2:1 v/v) (tratada en autoclave dos veces en dos días separados, 121°C durante 1 hora).

20 Veinticuatro horas (24 h) después del trasplante de las plántulas a la maceta, 1500 juveniles (J₂) de *Meloidogyne javanica* los cuales se mantuvieron rutinariamente sobre plantas de tomate comercial variedad Marmande, se inocularon a cada planta mediante el pipeteo de 4 ml de una suspensión de juveniles dentro de 4 agujeros realizados en la base de la planta.

25 Una semana después de la inoculación con los nematodos, se realizó una segunda aplicación (B) de 2,6x10⁸ UFC/ml del ACB por medio del pipeteo de 15 ml de la suspensión bacteriana a la base de la planta.

Finalmente, 15 días después de la segunda aplicación, se realizó una tercera aplicación (C) de *Ensifer adhaerens* cepa B758 a una concentración de 3,92x10⁷ UFC/ml por medio del mismo procedimiento descrito anteriormente.

30 Se incluyó un control absoluto con solo el inóculo de nematodos y un estándar químico (Nemacur 40 LE, ingrediente activo: Fenamifos 40% p/v concentrado emulsionable) como tratamiento de referencia y se aplicó a la dosis comercial (12 l/ha) y en los mismos tiempos de aplicación y volumen que los tratamientos con el agente de control biológico (A-B-C). Cada tratamiento consistió en 10 repeticiones.

35 Todas las plantas se mantuvieron en una en cámara climática visitable (Fitoclima 15000 EH, ARALAB) a 18-22 °C; 60-70% RH y 15 h:9 h (fotoperiodo de luz: oscuridad) durante 8 semanas a partir del trasplante. Después de esto, se recogieron las plantas de tomate y se determinaron los parámetros de crecimiento junto con la reproducción y la fertilidad de nematodos.

40 Resultados y Discusión

Se determinó el factor de reproducción (figura 6). Los resultados muestran diferencias significativas entre el control y los tratamientos con *E. adhaerens* B758 y el producto químico fenamifos utilizado como referencia.

45 Tabla 2.- Eficacia (%) corregida respecto al control del químico usado como referencia y *E. adhaerens* cepa B758 frente a *M. javanica*.

Tratamientos	Eficacia (%)
Fenamifos	99,28
<i>E. adhaerens</i> B758	65,38

50 Por lo tanto, *E. adhaerens* cepa B758 tiene un 65,38% de actividad nematocida con respecto al control en condiciones *in vivo*, mientras que la eficacia del producto químico de referencia fue del 99,28% (figura 7).

Ejemplo 4

55 Estudio de la actividad nematocida de diferentes cepas de *Ensifer adhaerens* frente a huevos de *Meloidogyne javanica*

Materiales y Procedimientos

60 La actividad nematocida de *Ensifer adhaerens* frente a huevos de *Meloidogyne javanica* se evaluó en ensayos *in vitro*. Las cepas de *Ensifer adhaerens* ensayadas fueron B742, B758, B760 y DSMZ 23677. *Ensifer adhaerens* cepa B742, B758 y B760 pertenecen a la Colección de Microorganismos de Futureco Bioscience y se aislaron previamente como se describe en el ejemplo 1, y DSMZ 23677 se adquirió a la Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos

Celulares.

Los huevos de nematodos se obtuvieron a partir de raíces de tomate infectadas con *M. javanica*. Alícuotas (200-300 μ l) de las suspensiones de huevos que contiene 370 huevos se pipetearon en cámaras de eclosión en las cuales, previamente se habían añadido 2 g de suelo previamente esterilizado. Cada cámara de eclosión se habían colocado previamente en placas de múltiples pocillos (placas de múltiples pocillos de superficie Nunclon™, Nunc, Denmark) (con una cámara de eclosión por pocillo) que contenía 3 ml de agua destilada estéril. Las placas se dejaron entonces durante 24 horas para recoger cualquier juvenil (J₂) presente en la suspensión de huevos. Las cámaras se transfirieron a una nueva placa de micropocillos y se añadieron las diferentes cepas de *Ensifer adhaerens* (B742, B758, B760 y DSMZ 23677) a las concentraciones detalladas en la tabla 3.

Tabla 3.- Concentración de las cepas de *E. adhaerens* sometidas a ensayo.

<i>Ensifer adhaerens</i> cepa	Concentración UFC/ml
B760	9,00E+08
DSMZ 23677	5,30E+08
B758	8,90E+08
B742	8,30E+08

Se incluyeron pocillos que contenían agua destilada estéril como controles y pocillos que contenían un producto químico de referencia (fenamifos). Se prepararon ocho repeticiones por tratamiento. Las placas se incubaron a 26°C en oscuridad durante 3 semanas y se registró el número de J₂ eclosionados a los 7, 15 y 21 días después de aplicar las cepas de *Ensifer adhaerens*. En cada momento, las cámaras de eclosión se retiraron de los pocillos y se colocaron en pocillos nuevos que contenían agua destilada estéril.

Resultados y discusión

Tabla 4.- Eficacia (%) corregida respecto al control del producto químico usado como referencia (fenamifos) y de las diferentes cepas de *E. adhaerens* frente a huevos de *M. javanica*.

Tratamientos	Eficacia (%)
Fenamifos	99,57
<i>E. adhaerens</i> B742	48,19
<i>E. adhaerens</i> B758	50,53
<i>E. adhaerens</i> B760	42,07
<i>E. adhaerens</i> DSMZ 23677	12,06

En el seguimiento de la eclosión de huevos de *M. javanica* durante los 21 días de duración del ensayo, el tratamiento con todas las cepas *E. adhaerens* mostraron actividad nematocida (figura 8).

Tres semanas después de la aplicación de los distintos tratamientos, 34,8% de los huevos no tratados (control) eclosionaron, mientras que solo eclosionaron el 18,04% de los tratados con *E. adhaerens* cepa B742, eclosionaron el 17,23% de los tratados con *E. adhaerens* cepa B758, eclosionaron el 20,17% de los tratados con *E. adhaerens* cepa B760 y eclosionaron el 30,62% de los tratados con *E. adhaerens* cepa DSMZ 23677.

Por lo tanto, la eficacia en reducir la eclosión con respecto al control en condiciones *in vitro* es del 48,19% para *E. adhaerens* cepa B742, el 50,53% para *E. adhaerens* cepa B758, el 42,07% para *E. adhaerens* cepa B760 y el 12,06% para *E. adhaerens* cepa DSMZ 23677 (figura 9).

Ejemplo 5

Estudio de la actividad nematocida *in vitro* de *Ensifer adhaerens* cepa B742, B758 y B760 frente a huevos de *Meloidogyne incognita*

Materiales y procedimientos

La actividad nematocida de *Ensifer adhaerens* frente a huevos de *Meloidogyne incognita* se evaluó mediante ensayos *in vitro*. Se obtuvieron huevos de nematodo a partir de raíces de tomate infectadas de *M. incognita*. Alícuotas (200-300 μ l) de las suspensiones de huevos que contenían 400 huevos se pipetearon sobre las cámaras de eclosión, se han colocado previamente en una placa de micropocillos estériles (con una cámara de eclosión por pocillo) que contiene 3 ml de agua destilada estéril. La placa se dejó entonces durante 24 h para recoger cualquier juvenil (J₂) presente en la suspensión de huevos. Las cámaras se transfirieron entonces a una nueva placa de micropocillos y el agente de control biológico *Ensifer adhaerens* cepa B742, B758 o B760 se añadió a 2×10^8 UFC/ml aproximadamente.

Los pocillos que contenían agua destilada estéril sirvieron como controles y un control químico Vydate® (Oxamyl) al 0,5% se incluyó también. Se prepararon ocho repeticiones por tratamiento. Las placas se incubaron a 26°C en oscuridad, y se registró el número de J2 eclosionados después de 1, 7, 15 y 21 días. En cada momento, las cámaras de eclosión se retiraron de los pocillos y se colocaron en nuevos pocillos que contenían agua destilada estéril fresca.

Resultados y discusión

Tabla 5.- Eficacia (%) corregida respecto al control del producto químico usado como referencia y de las diferentes de *E. adhaerens* cepas B742, B758 y B760 frente a huevos de *M. javanica*.

Tratamientos	Eficacia (%)
Oxamyl	35,5
<i>E. adhaerens</i> B742	38,3
<i>E. adhaerens</i> B758	22,7
<i>E. adhaerens</i> B760	19,5

En el seguimiento de la eclosión de huevos de *M. incognita* durante los 21 días de duración del ensayo, el tratamiento con todas las cepas *E. adhaerens* mostraron actividad nematocida (figura 10).

Tres semanas después de la aplicación de los distintos tratamientos, 34,33% de los huevos no tratados (control) eclosionaron, mientras que solo eclosionaron el 21,20% de los tratados con *E. adhaerens* cepa B742, eclosionaron el 26,53% de los tratados con *E. adhaerens* cepa B758, eclosionaron el 27,65% de los tratados con *E. adhaerens* cepa B760 eclosionaron y eclosionaron el 22,15% de los tratados con el producto de referencia (figura 10).

Por lo tanto, la eficacia en reducir la eclosión con respecto al control en condiciones *in vitro* es del 38,3% para *E. adhaerens* cepa B742, el 22,7% para *E. adhaerens* cepa B758, el 19,05% para *E. adhaerens* cepa B760 y el 35,5% para el producto de referencia Oxamyl (figura 11).

Conclusiones

Los resultados obtenidos muestran que *Ensifer adhaerens* cepa B758 presenta una eficacia significativa frente a huevos y juveniles de *Meloidogyne* tanto para los ensayos *in vitro* como *in vivo*, en particular para *M. javanica* y *M. incognita*.

Ensifer adhaerens cepa B758 presenta una eficacia del 79,12% en el ensayo *in vitro* y una eficacia del 65,38% en el ensayo *in vivo* con elevadas presiones de patógeno frente a *M. javanica*.

Todas las cepas de *Ensifer adhaerens* evaluadas en ensayos *in vitro* han demostrado actividad nematocida frente a huevos y juveniles de *M. javanica*. Las cepas B742, B758 and B760 presentan más actividad que la cepa DSMZ 23677.

Todas la cepas de *Ensifer adhaerens* evaluadas en ensayos *in vitro* han demostrado actividad nematocida frente a huevos y juveniles de *M. incognita*.

El uso de *Ensifer adhaerens* como bionemático para el control de nematodos fitopatógenos o dentro de un programa de gestión integrado de plagas, disminuye los residuos y reduce el desarrollo de nematodos resistentes a este producto de control.

Depósito de material biológico

Ensifer adhaerens cepa B742 se ha depositado en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) (Edificio 3 CUE, Parc Científic Universitat de Valencia, Catedrático Agustín Escardino, 9; 46980 Paterna, Valencia, España) bajo las condiciones estipuladas en el Tratado de Budapest. El depósito tuvo lugar el 13 de enero de 2015 y el número asignado a dicho depósito fue CECT 8809.

Ensifer adhaerens cepa B758 se ha depositado en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) (Edificio 3 CUE, Parc Científic Universitat de Valencia, Catedrático Agustín Escardino, 9; 46980 Paterna, Valencia, España) bajo las condiciones estipuladas en el Tratado de Budapest. El depósito tuvo lugar el 13 de enero de 2015 y el número asignado a dicho depósito fue CECT 8810.

Ensifer adhaerens cepa B760 se ha depositado en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) (Edificio 3 CUE, Parc Científic Universitat de Valencia, Catedrático Agustín Escardino, 9; 46980 Paterna, Valencia, España) bajo las condiciones estipuladas en el Tratado de Budapest. El depósito tuvo lugar el 13 de enero de 2015 y el número asignado a dicho depósito fue CECT 8808.

Lista de secuencias

5	<110> FUTURECO BIOSCIENCE, S.A.	
	<120> Bacteria con actividad nematocida	
	<130> P11575PC00	
10	<150> EP15382067.5	
	<151> 19-02-2015	
	<160> 9	
15	<170> PatentIn versión 3.5	
	<210> 1	
	<211> 18	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador directo 8-f	
25	<400> 1	
	agttgatcc tggctcag	18
	<210> 2	
	<211> 21	
30	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador inverso 1492-r	
35	<400> 2	
	acggttacct tgttacgact t	21
	<210> 3	
40	<211> 1054	
	<212> ADN	
	<213> <i>Ensifer adhaerens</i> cepa B742	
	<400> 3	
	cgagcgcgcc gcaaggggag cggcagacgg gtgagtaacg cgtgggaatc tacccttttc	60
	tacggaataa cgcagggaaa cttgtgctaa taccgtatga gcccttcggg ggaaagattt	120
	atcgggaaag gatgagcccg cgttggatta gctagttggt ggggtaaagg cctaccaagg	180
	cgacgatcca tagctggtct gagaggatga tcagccacat tgggactgag acacggccca	240
	aactcctacg ggaggcagca gtggggaata ttggacaatg ggcgcaagcc tgatccagcc	300
	atgccgcgtg agtgatgaag gccctagggt tgtaaagctc tttcaccggt gaagataatg	360
	acggtaaccg gagaagaagc cccggctaac ttcgtgccag cagccgcggt aatacgaagg	420
	gggctagcgt tgttcggaat tactgggcgt aaagcgcacg taggaggaca ttttaagtcag	480
45	gggtgaaatc ccggggctca accccggaac tgcctttgat actgggtgtc tagagtatgg	540

ES 2 819 425 T3

aagaggtagag tggaattccg agtgtagagg tgaattcgt agatattcgg aggaacacca 600
 gtggcgaagg cggctcactg gtccattact gacgctgagg tgcgaaagcg tggggagcaa 660
 acaggattag ataccctggt agtccacgcc gtaaacgatg aatgtagcc gtcgggcagt 720
 ttactgttcg gtggcgcagc taacgcatta aacattccgc ctggggagta cggtcgcaag 780
 attaaaactc aaaggaattg acgggggccc gcacaagcgg tggagcatgt ggtttaattc 840
 gaagcaacgc gcagaacctt accagccctt gacatcccga tcgaggatta cggagacggt 900
 ttccttcagt tcggctggat cggagacagg tgctgcatgg ctgtcgtcag ctcgtgctgt 960
 gagatgttg gttaagtccc gcaacgagcg caaccctcgc ccttagttgc cagcatttag 1020
 ttgggcactc taaggggact gccggtgata agcc 1054

<210> 4

<211> 986

5 <212> ADN

<213> *Ensifer adhaerens* cepa B758

<400> 4

tgcagtcgag cgccccgcaa ggggagcggc agacgggtga gtaacgcgtg ggaatctacc 60
 cttttctacg gaataacgca gggaaacttg tgctaatacc gtataagccc ttcgggggaa 120
 agatztatcg ggaaaggatg agcccgcgtt ggattagcta gttggtgggg taaaggccta 180
 ccaaggcgac gatccatagc tggctgaga ggatgatcag ccacattggg actgagacac 240
 ggcccaaact cctacgggag gcagcagtgg ggaatattgg acaatgggcg caagcctgat 300
 ccagccatgc cgcgtgagt atgaaggccc tagggttgta aagctctttc accggtgaag 360
 ataatgacgg taaccggaga agaagccccg gctaacttcg tgccagcagc cgcggaata 420
 cgaagggggc tagcgttgtt cggaattact gggcgtaaag cgcacgtagg cggacattta 480
 agtcaggggt gaaatcccag agctcaactc tggaaactgcc tttgatactg ggtgtctaga 540
 gtatggaaga ggtgagtgga attccgagt tagaggtgaa attcgtagat attcggagga 600
 acaccagtgg cgaaggcggc tcaactgtcc attactgacg ctgaggtgcg aaagcgtggg 660
 gagcaaacag gattagatac cctggtagtc cacgccgtaa acgatgaatg ttagccgtcg 720
 ggcagtttac tgttcggtgg cgcagctaac gcattaaaca ttccgcctgg ggagtacggt 780
 cgcaagatta aactcaaag gaattgacgg gggcccgcac aagcgggtgga gcatgtggtt 840
 taattcgaag caacgcgcag aaccttacca gcccttgaca tcccgatcgc ggattacgga 900
 gacgttttcc ttcagttcgg ctggatcggg gacaggtgct gcatggctgt cgtcagctcg 960
 tgtcgtgaga tgttgggtta agtccc 986

10

<210> 5

<211> 1048

<212> ADN

<213> *Ensifer adhaerens* cepa B760

ES 2 819 425 T3

<400> 5

```

agtcgagcgc cccgcaaggg gagcggcaga cgggtgagta acgcgtggga atctaccctt      60
ttctacggaa taacgcaggg aaacttgtgc taataccgta tacgcccttc gggggaaaga      120
tttatcggga aaggatgagc ccgcgttggg ttagctagtt ggtggggtaa aggcctacca      180
aggcgacgat ccatagctgg tctgagagga tgatcagcca cattgggact gagacacggc      240
ccaaactcct acgggaggca gcagtgggga atattggaca atgggcgcaa gcctgatcca      300
gccatgccgc gtgagtgatg aaggccctag ggttgtaaag ctctttcacc ggtgaagata      360
atgacggtaa ccggagaaga agccccggct aacttcgtgc cagcagccgc ggtaatacga      420
agggggctag cgttgttcgg aattactggg cgtaaagcgc acgtaggcgg acatttaagt      480
caggggtgaa atcccggggc tcaaccccg g aactgccttt gatactgggt gtctagagta      540
tggaaagaggt gagtggaatt ccgagtgtag aggtgaaatt cgtagatatt cggaggaaca      600
ccagtggcga aggcggctca ctgggccatt actgacgctg aggtgcgaaa gcgtggggag      660
caaacaggat tagataccct ggtagtccac gccgtaaacg atgaatgta gccgtcgggc      720
agtttactgt tcggtggcgc agctaacgca ttaaaccattc cgcctgggga gtacggtcgc      780
aagattaaaa ctcaaaggaa ttgacggggg cccgcacaag cggtgagca tgtggtttaa      840
ttcgaagcaa cgcgcagaac cttaccagcc cttgacatcc cgatcgcgga ttacggagac      900
gttttccttc agttcggctg gatcggagac aggtgctgca tggctgtcgt cagctcgtgt      960
cgtgagatgt tgggttaagt cccgcaacga gcgcaaccct cgcccttagt tgccagcatt     1020
tagttgggca ctctaagggg actgccgg                                     1048

```

5

<210> 6

<211> 18

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> cebador REP 1R

<220>

<221> modified_base

15 <222> (1)..(4)

<223> |

<220>

<221> modified_base

20 <222> (7)..(7)

<223> |

<220>

<221> modified_base

25 <222> (10)..(10)

<223> |

<220>

<221> modified_base

30 <222> (15)..(15)

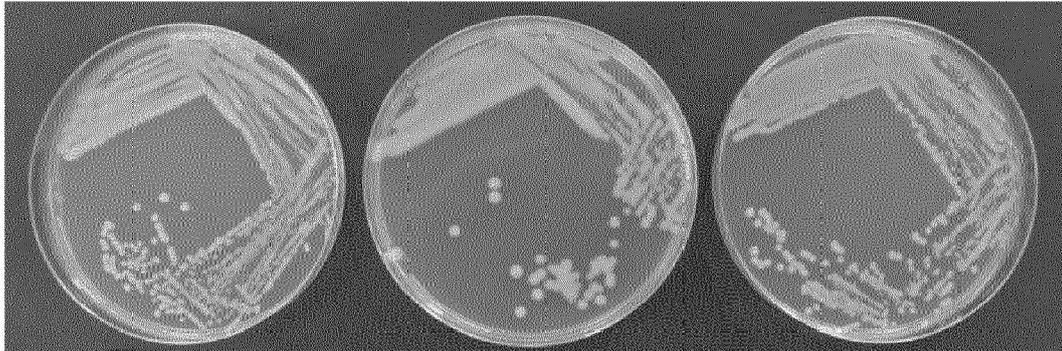
ES 2 819 425 T3

<223> I
 <400> 6
 nnnncgncgn catcnggc 18
 5
 <210> 7
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10
 <220>
 <223> cebador Rep2I
 <220>
 15 <221> modified_base
 <222> (1)..(1)
 <223> I
 <220>
 20 <221> modified_base
 <222> (4)..(4)
 <223> I
 <220>
 25 <221> modified_base
 <222> (11)..(11)
 <223> I
 <400> 7
 30 ncgncctatc nggcctac 18
 <210> 8
 <211> 20
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador ERIC 1
 40 <400> 8
 agtaagtgac tggggtgagc 20
 <210> 9
 <211> 22
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador ERIC 2
 50 <400> 9
 atgtaagctc ctggggattc ac 22

REIVINDICACIONES

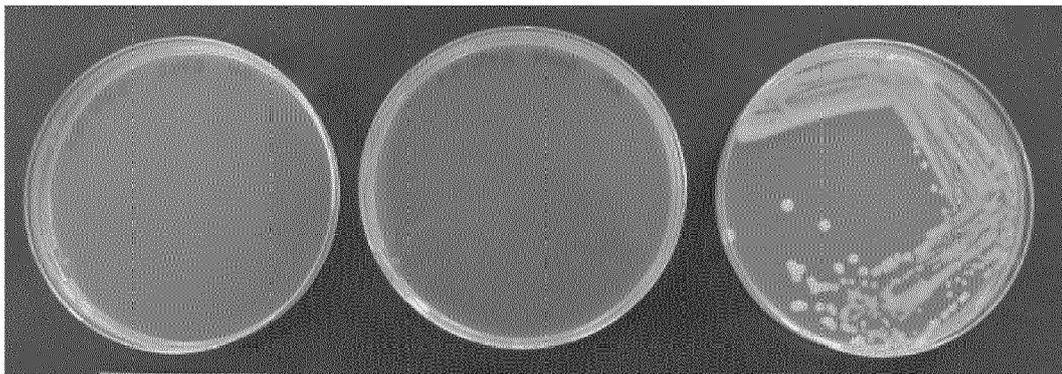
1. Microorganismo de la especie *Ensifer adhaerens* que tiene actividad nematocida sobre un nematodo del género *Meloidogyne*, en el que el microorganismo se selecciona del grupo que consiste en :
 - (i) *E. adhaerens* cepa B742, depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con el número de registro CECT 8809,
 - (ii) *E. adhaerens* cepa B758, depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con el número de registro CECT 8810, y
 - (iii) *E. adhaerens* cepa B760, depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con el número de registro CECT 8808,
 o un mutante de dicho microorganismo que mantiene dicha actividad nematocida, en el que el mutante tiene un genoma que tiene una identidad de secuencia de al menos el 95% con el genoma de una de las cepas B742, B758 o B760 de *E. adhaerens*.
2. Cultivo biológicamente puro de un microorganismo según la reivindicación 1.
3. Procedimiento para obtener una biomasa del microorganismo vivo según la reivindicación 1 que comprende cultivar dicho microorganismo en condiciones adecuadas para su crecimiento.
4. Biomasa del microorganismo vivo según la reivindicación 1, obtenible mediante el procedimiento de la reivindicación 3.
5. Producto fitosanitario que comprende un microorganismo según la reivindicación 1, o un cultivo biológicamente puro según la reivindicación 2 o una biomasa según la reivindicación 4, y un excipiente agrícola aceptable.
6. Semilla suplementada que comprende:
 - (i) una semilla, y además
 - (ii) un producto seleccionado del grupo que consiste en:
 - a) el 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.
7. Semilla suplementada según la reivindicación 6, en la que la semilla es una de una planta de la familia *Solanaceae*.
8. Procedimiento para controlar biológicamente un nematodo del género *Meloidogyne* que comprende aplicar a dicho nematodo el 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.
9. Procedimiento para prevenir la infección de una planta provocada por un nematodo del género *Meloidogyne* que comprende aplicar una cantidad eficaz del 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, sobre dicha planta, sobre la semilla de dicha planta, en el suelo que rodea a dicha planta, o sobre un nematodo del género *Meloidogyne* susceptible de infectar a dicha planta, o alternativamente, sembrar una semilla de dicha planta suplementada con dicho microorganismo, dicho cultivo biológicamente puro, dicha biomasa o dicho producto fitosanitario.
10. Procedimiento para tratar una planta infectada por un nematodo del género *Meloidogyne* que comprende aplicar una cantidad eficaz del 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, sobre dicha planta o en el suelo que rodea a dicha planta.
11. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, en el que el microorganismo es una combinación de dos o más de las cepas de *E. adhaerens* B742, B758 y B760.

12. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en el que la planta pertenece a la familia *Solanaceae*.
- 5 13. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12, en el que la cantidad eficaz del 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, 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 aplican entre 10 y 20 días después de la aplicación precedente.
- 10



E. adhaerens B742 *E. adhaerens* B758 *E. adhaerens* B760

FIG. 1



E. adhaerens B742 *E. adhaerens* B758 *E. adhaerens* B760

FIG. 2

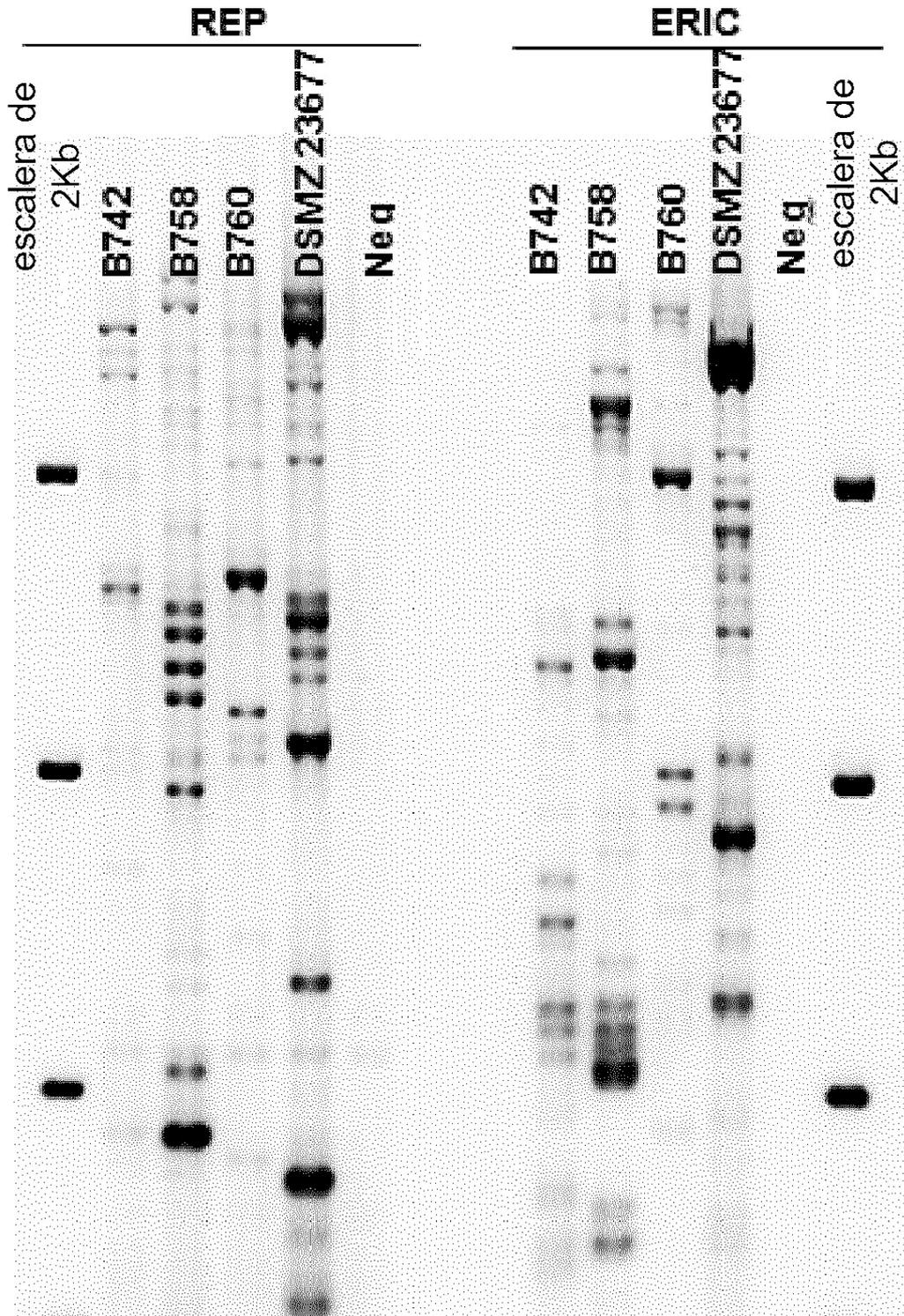


FIG. 3

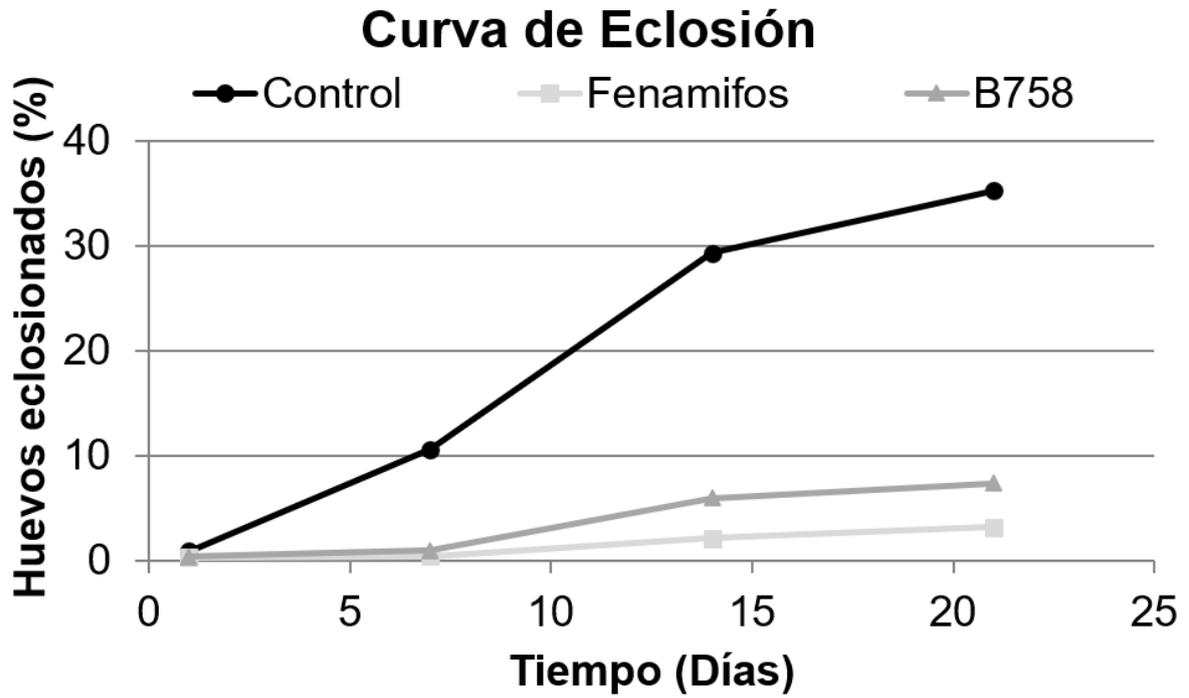


FIG. 4

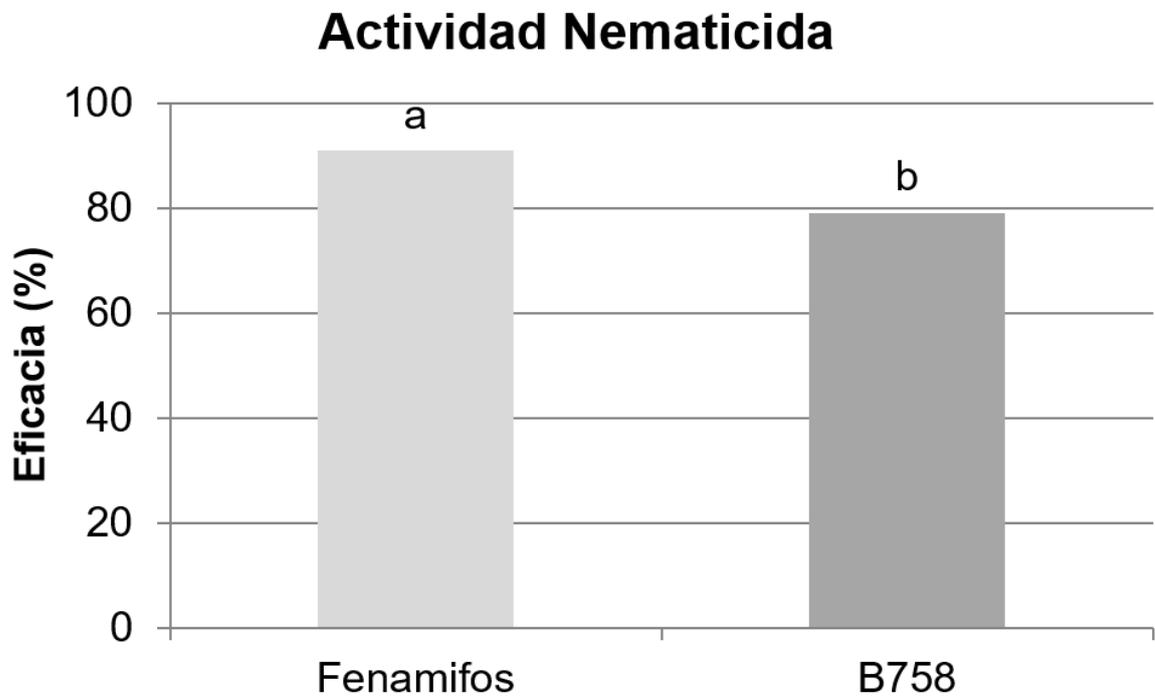


FIG. 5

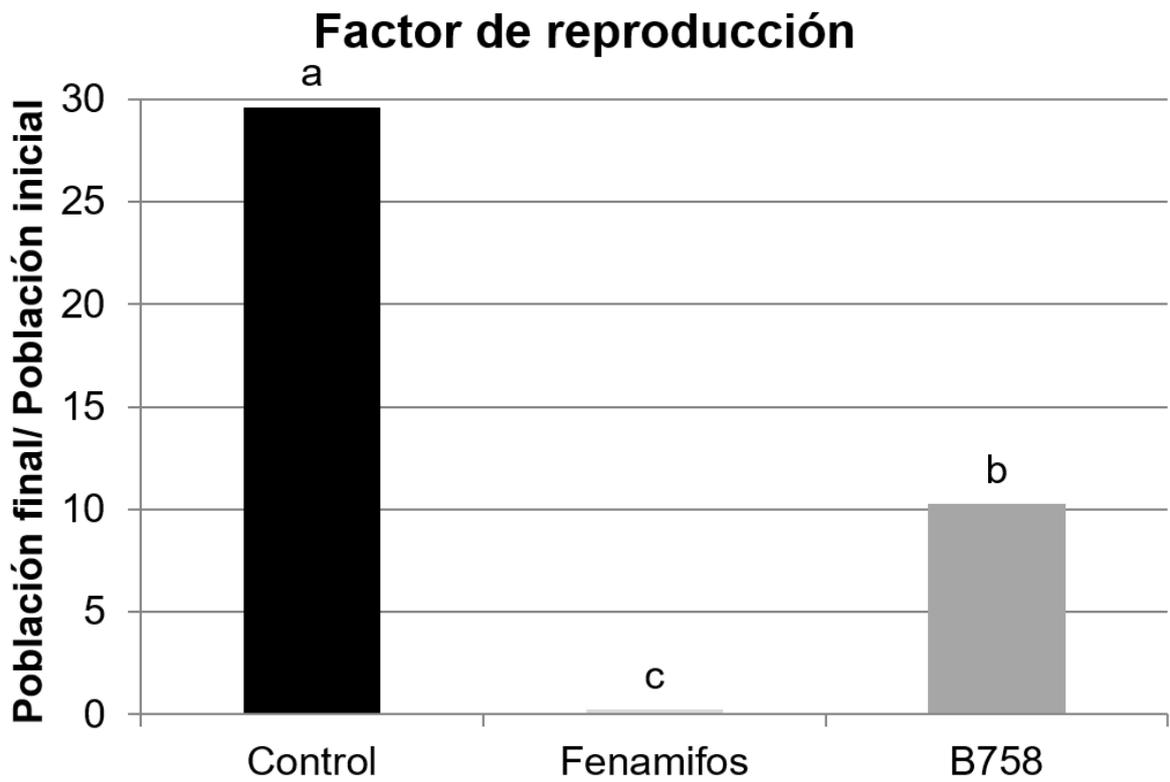


FIG. 6

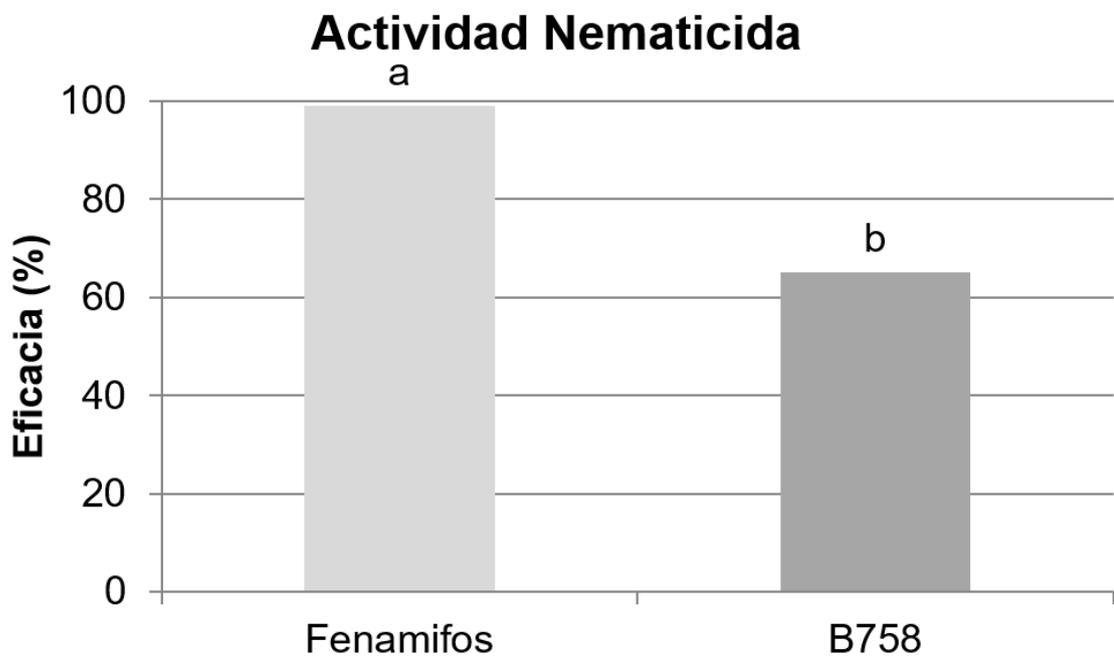


FIG. 7

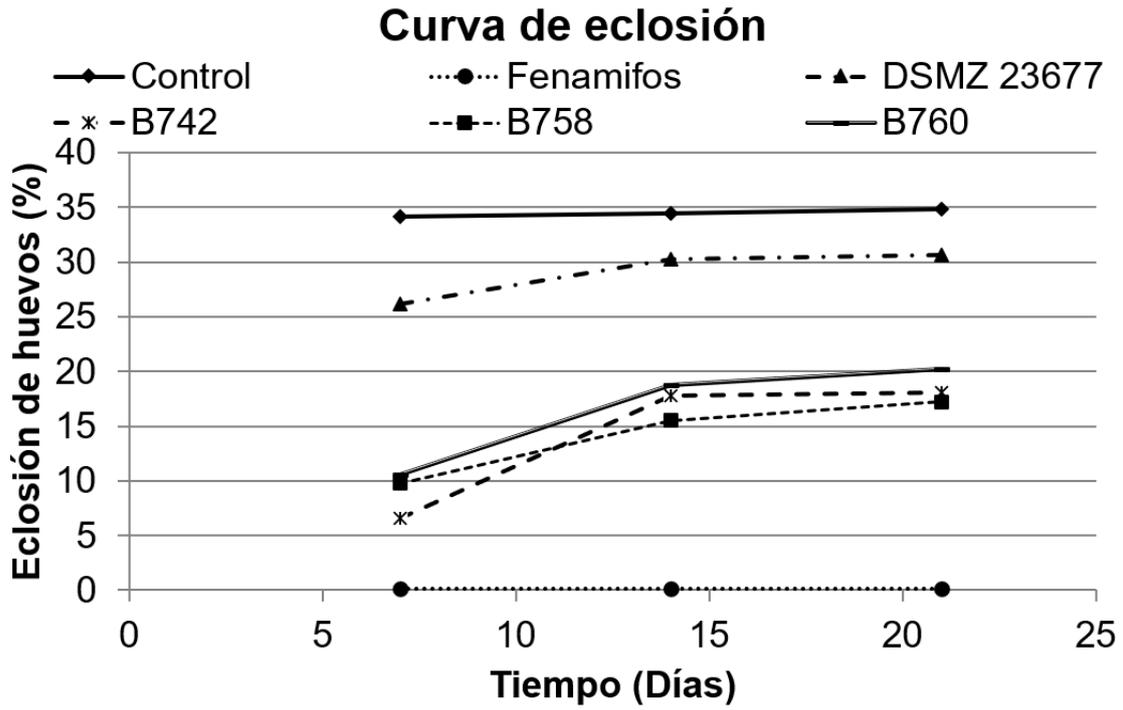


FIG. 8

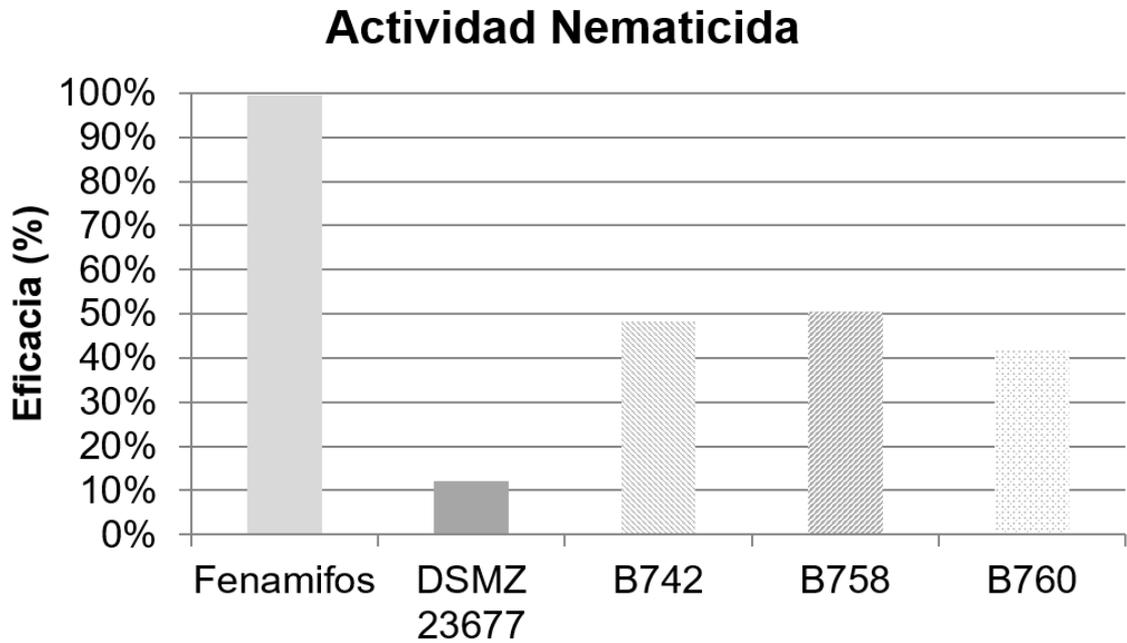


FIG. 9

Curva de eclosión

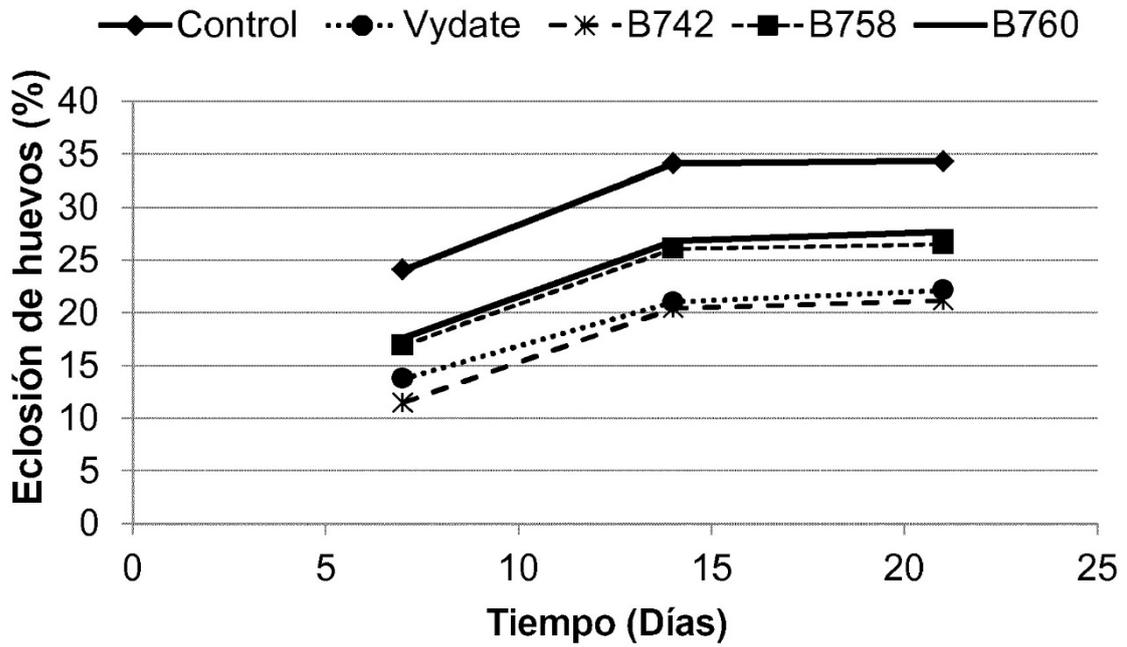


FIG. 10

Actividad nematicida

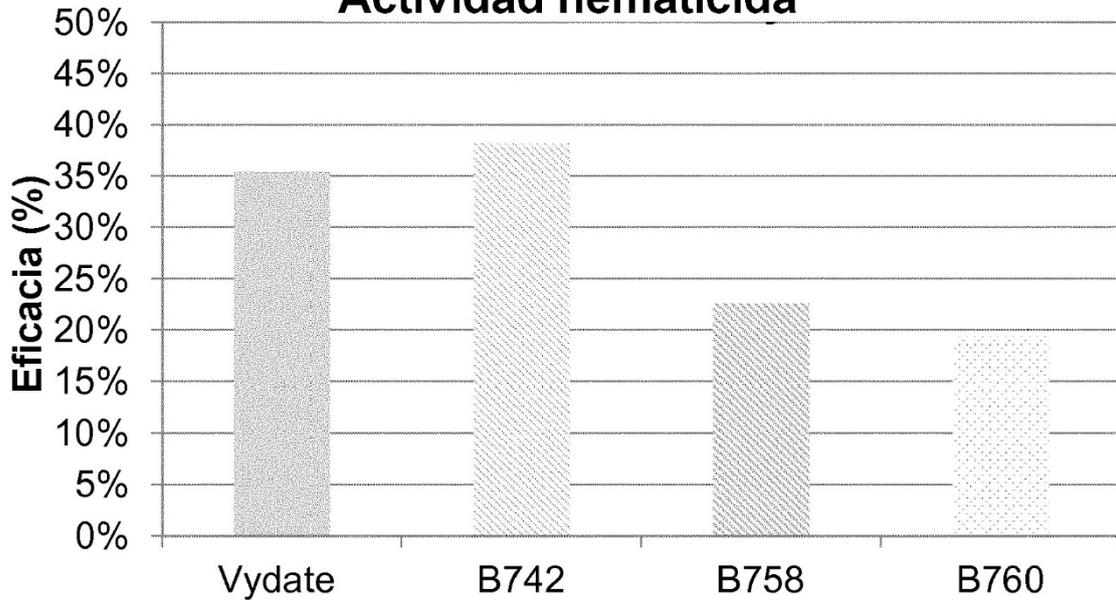


FIG. 11