



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 297 031**

⑮ Int. Cl.:

C12N 1/20 (2006.01)

A01N 63/02 (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑯ Número de solicitud europea: **02788659 .7**

⑯ Fecha de presentación : **26.11.2002**

⑯ Número de publicación de la solicitud: **1449914**

⑯ Fecha de publicación de la solicitud: **25.08.2004**

⑭ Título: **Cepa de *Bacillus* sp. D747, agentes de control de enfermedades de plantas y agentes de control de plagas de insectos usando los mismos y procedimiento de control usando los agentes.**

⑩ Prioridad: **26.11.2001 JP 2001-359222**
08.05.2002 JP 2002-133294

⑬ Titular/es: **KUMIAI CHEMICAL INDUSTRY Co., Ltd.**
4-26, Ikenohata 1-chome
Taitoh-ku, Tokyo 110-0008, JP

⑮ Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.05.2008

⑰ Inventor/es: **Watanabe, Satoshi;**
Toyoshima, Jun;
Shimizu, Tsutomu;
Yamaji, Koji;
Nagayama, Kozo y
Yano, Hiroyuki

⑮ Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.05.2008

⑰ Agente: **Carpintero López, Francisco**

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

Cepa de *Bacillus* sp. D747, agentes de control de enfermedades de plantas y agentes de control de plagas de insectos usando los mismos y procedimiento de control usando los agentes.

5

Campo técnico

La presente invención se refiere a una cepa D747 de *Bacillus* sp. y a aplicaciones de la misma. Más particularmente, la presente invención se refiere a un agente para controlar una enfermedad de una planta y/o un agente para controlar una plaga de insecto que comprende, como bacteria activa, la cepa D747 de *Bacillus* sp. que exhibe efectos de control de enfermedades de plantas y efectos de control de plagas, y se refiere a un procedimiento de control que usa estos agentes de control.

Técnica relacionada

15

Como ejemplos de procedimientos para controlar enfermedades y plagas de plantas, se debe hacer mención de procedimientos de control físico y procedimientos de control agrícola en campo que emplean rotación de cultivos o calentamiento solar, procedimientos de control químico que usan agroquímicos, procedimientos de control que utilizan variedades resistentes a enfermedades, procedimientos de control biológico que usan virus atenuados o microorganismos antagonistas sobre hongos patogénicos, y similares. Entre estos procedimientos, se ha mejorado significativamente la investigación y desarrollo de agroquímicos y particularmente fungicidas organosintéticos en los últimos años, y se están desarrollando continuamente muchos agentes que tienen alta potencia y que exhiben efectos diversos. Además, también se han proporcionado diversos procedimientos de aplicación. Los procedimientos de control químico que usan estos han contribuido en gran medida a controlar enfermedades de plantas, ahorrar trabajo en las operaciones de control, y similares, y se han empleado mucho. Sin embargo, recientemente, se observa en algunas plantas de cultivo y enfermedades que los efectos de control proporcionados por los procedimientos de control químico se reducen debido a la aparición de las llamadas plagas resistentes a químicos, y esto se ha convertido en un problema. Además, como consecuencia del cosechado continuo impuesto por la extensión de los monocultivos, los brotes de enfermedades infecciosas a través de la tierra, que se cree que son difíciles de controlar con agroquímicos, se han convertido en un problema grave en diversas localidades. Además, en los procedimientos en los que se emplean repetidamente grandes cantidades de agroquímicos, se liberan sustancias químicas, que no aparecen de forma natural, en el medio ambiente. Por esta razón, se ha comprendido que no sólo los químicos que son tóxicos directamente para animales y plantas, sino también químicos no tóxicos, pueden causar efectos negativos sobre el medio ambiente.

35

Como se describe anteriormente, es altamente probable que el control de enfermedades con agroquímicos reduzca los efectos de control debido a la aparición de plagas resistentes. En este caso, es necesario desarrollar nuevos fungicidas. Además, respecto al control de enfermedades que se cree que son difíciles de controlar con agroquímicos, se deben implementar medios alternativos o medios usados junto con otros procedimientos. Además, se desea establecer una técnica de control que sea más segura de cara al medio ambiente.

40

Recientemente, a la luz de estas circunstancias, se están reconsiderando procedimientos de control dependientes del uso de agroquímicos, y se han propuesto procedimientos de control biológico que utilizan microorganismos (denominados agentes de control biológico) que se cree que son más seguros para el medio ambiente comparados con los agroquímicos, y a algunos de estos se les ha dado uso práctico.

45

En la investigación del control biológico de enfermedades de plantas, se ha intentado la utilización de virus atenuados, la utilización de microorganismos de tipo patogénico o no patogénico atenuados de microbios patogénicos, la utilización de microorganismos antagonistas, y similares. Entre éstos, existe mucha investigación sobre la utilización de microorganismos antagonistas. Además, hay muchos informes sobre investigación para controlar enfermedades entre los microorganismos antagonistas del género *Bacillus*. Sin embargo, no se ha encontrado que el género *Bacillus* muestre efectos para controlar un amplio espectro de enfermedades.

55

El documento WO 98/50422 describe una nueva cepa de bacilos para controlar enfermedades de plantas en el gusano de la raíz del maíz. La nueva cepa de bacilos de acuerdo con la presente invención no se describe.

Höfte y Whiteley, Microbiological Reviews, 53(89), Junio, páginas 242-255, describen proteínas de cristal insecticidas de *Bacillus thuringiensis*. La cepa de bacilos descrita en este documento es completamente distinta de la nueva cepa de *Bacillus* de acuerdo con la presente invención.

60

El documento EP 0 522 836 A2 describe una nueva cepa de bacilos y un agente de control de plagas de insectos que pertenece al grupo del *Bacillus thuringiensis*, pero que es distinto del tema de acuerdo con la presente invención.

Descripción de la invención

65

Un objeto de la presente invención es aislar una nueva cepa que muestra efectos de control de enfermedades de variedades plurales de enfermedades de plantas y/o control de plagas de insectos.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar un agente para controlar una enfermedad de una planta y/o un agente para controlar una plaga de insecto, que comprende, como bacteria activa, la cepa antes mencionada, que se puede emplear eficazmente como agente de control biológico.

5 Otro objeto de la presente invención es proporcionar un procedimiento para controlar enfermedades de plantas y/o plagas de insectos que usa el agente para controlar una enfermedad de una planta y/o el agente para controlar una plaga de insecto anteriormente descrito.

10 Los presentes inventores descubrieron que una cepa nueva perteneciente al género *Bacillus* aislada de la naturaleza exhibe efectos de control de diversas variedades de enfermedades de plantas y exhibe efectos de control de plagas sin dañar el crecimiento de la planta, completando de este modo la presente invención.

15 La presente invención se refiere a una cepa descrita en lo que sigue, un agente para controlar una enfermedad de una planta y/o un agente para controlar una plaga de insecto, y un procedimiento para controlar enfermedades de plantas y/o controlar plagas de insectos.

(1) Una cepa D747 de *Bacillus* sp. que tiene un número de acceso FERM BP 8234, depositado a tenor del Tratado de Budapest.

20 (2) Un agente para controlar una enfermedad de una planta caracterizado por comprender la cepa D747 de *Bacillus* sp. como bacteria activa.

(3) Un agente para controlar una plaga de insecto caracterizado por comprender la cepa D747 de *Bacillus* sp. como bacteria activa.

25 (4) Un procedimiento para controlar una enfermedad de una planta y/o una plaga de insecto caracterizado por emplear el agente para controlar una enfermedad de una planta descrito anteriormente en el punto (2) y/o el agente para controlar una plaga de insecto descrito anteriormente en el punto (3).

*Aislamiento de la cepa D747 de *Bacillus* sp. y deposición de la misma*

30 La cepa D747 de *Bacillus* sp. de la presente invención es una cepa aislada del aire en Kikugawa-cho, Ogasa-gun, Shizuoka-ken, JAPON. A raíz de la identificación de la cepa a la vista de las características bacterianas descritas a continuación de acuerdo con el *Manual de Bacteriología Sistemática de Bergey*, Volumen 1 (1984), se pensó que era una nueva cepa perteneciente al género *Bacillus*, y podría ser *Bacillus cereus*. Por esta razón, la cepa se depositó 35 como “*Bacillus cereus* D747” en la Agencia de Ciencia Industrial y Tecnología, Instituto Nacional de Biociencia y Tecnología Humana, el 28 de Noviembre de 2000.

40 Sin embargo, después de eso, se estudió de nuevo en detalle para ver si pertenecía o no a *Bacillus cereus*. Por consiguiente, el estudio solamente proporcionó la confirmación de que pertenecía al género *Bacillus*. Por esta razón, se presentó una notificación de cambio del nombre de la cepa a “*Bacillus* sp. D747” el 1 de Abril de 2002.

45 Por lo tanto, la cepa D747 de *Bacillus* sp. (de aquí en adelante, referida simplemente como la “cepa D747”) de acuerdo con la presente invención se depositó en el Instituto Nacional de Ciencia Industrial Avanzada y Tecnología, Depositario de Organismos de Patente Internacional como “*Bacillus* sp. D747” con Número de Acceso “FERM P-18128”, y después se transfirió para ser depositado bajo el Tratado de Budapest el 8 de Noviembre de 2002, como “*Bacillus* sp. D747” con nuevo Número de Acceso “FERM BP-8234”.

Características bacterianas de la cepa D747

50 Las características bacterianas de la cepa D747 de acuerdo con la presente invención se describen como sigue. Las pruebas para las características bacterianas se llevaron a cabo de acuerdo con el *Manual de Bacteriología Sistemática de Bergey* anteriormente mencionado.

(A) Características morfológicas

55 Morfología: bacilo

Tamaño: anchura = 1,0 a 1,2 μm ; longitud = 3 a 5 μm

60 Movilidad: +

Condición adherente flagelar: flagelos periféricos

65 Endospora: +

Posición de la espora: centro

Crecimiento de la espora: -

ES 2 297 031 T3

(B) *Características de cultivo*

Color de colonia: blanco a marrón pálido

5 Cultivo en un medio en placa de agar-caldo: Se forma una colonia coloreada de blanco a crema, y la superficie de la misma está arrugada.

(C) *Características fisiológicas*

10 Capacidad de tinción gram: +

Reducción de nitratos: +

15 Prueba MR: -

Prueba VP: +

Formación de indol: -

20 Hidrólisis del almidón: +

Capacidad de asimilación de ácido cítrico: +

25 Fuente de nitrógeno inorgánico: +

Oxidasa: -

30 Catalasa: +

Crecimiento a pH 6,8, medio caldo: +

Crecimiento a pH 5,7, medio caldo: +

35 Temperatura de crecimiento, 30°C: +

Temperatura de crecimiento, 50°C: -

40 Concentración de NaCl de crecimiento, 2%: +

Concentración de NaCl de crecimiento, 5%: +

Concentración de NaCl de crecimiento, 7%: +

45 Crecimiento aerobio: +

Crecimiento anaerobio: +

50 Prueba O-F: O

Reacción de York: -

Formación de ácido de la glucosa: +

55 Formación de ácido del manitol: -

Formación de ácido de la L-arabinosa: -

60 Formación de ácido de la D-xilosa: -

Formación de gas de la glucosa: -

β -galactosidasa: -

65 Propiedad de requerimiento de NaCl y KCl: -

Cultivo de la cepa D747

- En el procedimiento de cultivo de la cepa D747 empleado en la presente invención, se pueden seleccionar apropiadamente las clases de medios, condiciones de cultivo, y similares. Como ejemplos de medios, se debe hacer mención de, por ejemplo, un medio que incluya glucosa, peptona, y un extracto de levadura, y similares, además de un medio común tal como un medio caldo. Además, se pueden emplear medios sólidos tales como un medio slant, un medio en placa, y similares, que incluyen agar, además de un medio líquido. Al ser cultivada, la cepa D747 se multiplica, de manera que pueda obtenerse una cantidad deseable de la cepa.
- Como fuente de carbono del medio, se pueden utilizar todos los materiales que pueda asimilar la cepa anteriormente mencionada. Como ejemplos de los mismos, se deben mencionar diversas fuentes de carbono sintéticas o naturales que puede utilizar la cepa D747, además de azúcares como glucosa, galactosa, lactosa, sacarosa, maltosa, un extracto de malta, y un hidrolisato de almidón.
- Como fuente de nitrógeno del medio, se pueden utilizar productos que contienen nitrógeno orgánico tales como peptona, caldo, extracto de levadura, y similares, y diversos productos sintéticos o naturales que la cepa D747 es capaz de utilizar.
- De acuerdo con procedimientos habituales para cultivar microorganismos, se pueden añadir, si se considera necesario, sales inorgánicas como el cloruro sódico, fosfatos, o similares; sales de metal tales como calcio, magnesio, hierro, o similares; fuentes de micronutrientes tales como vitaminas, aminoácidos, o similares.
- El cultivo se puede llevar a cabo bajo condiciones aerobias tales como cultivo en agitación, cultivo con aireación, o similares. La temperatura de cultivo oscila de 20 a 30°C, y preferiblemente oscila de 25 a 30°C; el pH oscila de 5 a 8, y preferiblemente oscila de 6 a 7; y el periodo de cultivo oscila apropiadamente de 1 a 4 días, y preferiblemente oscila de 2 a 3 días.
- La cepa D747 de *Bacillus* sp. de acuerdo con la presente invención exhibe propiedades de control de diversas enfermedades de plantas y control de plagas al administrar cultivos de las mismas (incluyendo las bacterias *per se*) o productos tratados de los mismos (una mezcla de un cultivo y otros ingredientes, o similares), o bacterias aisladas mediante cultivo (bacterias obtenidas tratando un cultivo mediante centrifugación, o bacterias extraídas del mismo, o similares) o productos tratados de las mismas (una mezcla de bacterias aisladas y otros ingredientes, o similares), productos tratados de aquellos anteriormente descritos (un producto diluido de los mismos con un líquido o un sólido, o similares), sobre partes de la planta tales como raíces, tallos, hojas, semillas, y similares, o sobre la tierra de cultivo.
- La cepa D747 de la presente invención puede controlar enfermedades de plantas provocadas por bacterias y hongos pertenecientes a los géneros *Oomycetes*, *Ascomycetes*, *Basidiomycetes*, y *Deuteromycetes*.
- Como ejemplos de hongos plaga causantes de enfermedades que puede controlar la cepa D747, se debe mencionar, por ejemplo, *Pseudoperonospora* tales como *Pseudoperonospora cubensis*, *Venturia* tales como *Venturia inaequalis*, *Erysiphe* tales como *Erysiphe graminis*, *Pyricularia* tales como *Pyricularia oryzae*, *Botrytis* tales como *Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia* tales como *Rhizoctonia solani*, *Puccinia* tales como *Puccinia recondite*, *Septoria* tales como *Septoria nodorum*, *Sclerotinia* tales como *Sclerotinia sclerotiorum*, *Pythium* tales como *Pythium debaryanum Hesse*; como bacterias, *Burkholderia* tales como *Burkholderia plantarii*; y similares. Se debería sobrentender que no se limitan a estos ejemplos en la presente invención.
- Además, la cepa D747 de la presente invención puede controlar lagas tales como plagas de hemípteros, plagas de lepidópteros, plagas de coleópteros, plagas de dípteros, plagas de ortópteros, plagas de isópteros, plagas de tisanópteros, plagas de tetraníquidos, y similares.
- Como ejemplos de plagas que puede controlar la cepa D747, se debe mencionar, por ejemplo, plagas de hemípteros que incluyen *Pentatomidae* (*Heteroptera*) tales como *Riptortus clavatus* y similares, *Cicadellidae* tales como *Nephrotettix cincticeps* y similares, *Delphacidae* tales como *Nilaparvata lugens* y similares, *Psyllidae* tales como *Psylla* sp., y similares, *Aleyrodidae* tales como *Bemisia tabaci* y similares, *Aphididae* tales como *Myzus persicae* y similares, *Pseudococcoidae* tales como *Pseudococcus comstocki* y similares; plagas de lepidópteros que incluyen *Torticoidea* tales como *Homona magnanima* y similares, *Cochylidae* tales como *Eupoecilia ambiguella* y similares, *Psychidae* tales como *Bambalina* sp., y similares, *Gracillariidae* tales como *Nemapogon granellus* y similares, *Phyllocnistinae* tales como *Phyllocnistis citrella* y similares, *Yponomeutidae* tales como *Plutella xylostella* y similares, *Pyralidae* tales como *Chilo suppressalis* y similares, *Noctuidae* tales como *Heliothis virescens* y similares; plagas de coleópteros que incluyen *Scarabeidae* tales como *Anomala cuprea* y similares, *Coccinellidae* tales como *Epilachna vigintioctopunctata* y similares, *Curculionidae* tales como *Lissorhoptrus oryzophilus* y similares; plagas de dípteros tales como *Culex pipiens*, *Anopheles sinensis*, *Culex tritaeniorhynchus*, y similares; plagas de ortópteros tales como *Blatella germanica*, y similares; plagas de isópteros tales como *Reticolitermes speratus*, y similares; plagas de tisanópteros tales como *Scirtothrips dorsali*, y similares; plagas de tetraníquidos tales como *Tetranychus urticae*, y similares; otros animales dañinos, criaturas que deban ser repelidas, plagas de insectos dadas unas condiciones de salubridad, parásitos, ejemplos de los cuales incluyen *Gastropoda* tales como *Pomacea canaliculat*, *Incilaria* sp., y similares; e *Isopoda* tales como *Armadillium* sp., y similares. Se debería sobrentender que la presente invención no se limita a estos ejemplos.

Agentes para controlar enfermedades de plantas y agentes para controlar plagas

Los agentes para controlar enfermedades de plantas y agentes para controlar plagas de acuerdo con la presente invención comprenden, como bacterias activas, la cepa D747, que tiene el número de acceso FERM-BP 82, que puede controlar enfermedades de plantas y plagas de insectos como se describe anteriormente. En los agentes para controlar enfermedades de plantas y agentes para controlar plagas de la presente invención, la cepa D747 se puede emplear sola o en combinación con una variante de la cepa D747. Las variantes tienen las características bacterianas de la cepa D747 descrita anteriormente, exhiben efectos de control de enfermedades de plantas, y exhiben efectos de control de plagas. Por tanto se pueden emplear cepas mutantes espontáneas, cepas mutantes producidas al usar rayos UV o agentes mutágenos químicos, cepas de fusión celular, y cepas de recombinación genética. En la presente invención, la cepa D747 contenida en los agentes para controlar enfermedades de plantas y los agentes para controlar plagas también incluyen las variantes de la cepa D747.

El término "controlar" en la memoria se usa para significar no solamente prevenir y repeler enfermedades o plagas, sino también eliminarlas y destruirlas. Por lo tanto, incluso para plantas que han sido infectadas por hongos patogénicos, si se les aplican los agentes para controlar enfermedades de plantas, se pueden eliminar los hongos patogénicos de las plantas, y de este modo, se puede evitar la patogenicidad provocada por los hongos patogénicos y el deterioro de las enfermedades. Además, las plagas también se pueden controlar debido a los efectos de repulsión y muerte de las plagas.

Para el caso en que la cepa D747 se incluye como microorganismo viable en los agentes para controlar enfermedades de plantas y los agentes para controlar plagas de insectos de acuerdo con la presente invención, es preferible que la cepa se aplique al organismo de la planta a una concentración que oscila entre 10^5 y 10^{10} microorganismos/ml.

Además, para el caso en que se emplee un cultivo de la cepa D747, el tiempo de aplicación y la cantidad de aplicación del mismo se debe determinar apropiadamente de acuerdo con el caso del microorganismo viable anteriormente descrito.

Además, en los agentes para controlar enfermedades de plantas y los agentes para controlar plagas de insectos de acuerdo con la presente invención, la cepa D747 se puede emplear sola como cepa, o se puede emplear un cultivo de la misma, como formulaciones en las que se diluye la cepa con un líquido inerte o vehículo sólido, y a ello se añaden tensioactivos y otros agentes auxiliares, si se considera necesario. Como ejemplos de formulaciones, se deben mencionar gránulos, polvos finos, polvos humectables, suspensiones, concentrados emulsionables, y similares. Como ejemplos de vehículos preferibles, se deben mencionar vehículos sólidos porosos tales como talco, bentonita, arcilla, caolín, barro de diatomeas, carbón blanco, vermiculita, cal muerta, arena de sílice, sulfato amónico, y urea; vehículos líquidos tales como agua, alcohol de isopropilo, xileno, ciclohexanona, metilnaftaleno, y glicol de alquilo; y similares. Como ejemplos de tensioactivos y dispersivos, se debe mencionar, por ejemplo, dinaftilmetanosulfonatos, sulfatos de alcohol, alquil aril sulfonatos, sulfonatos de lignina, éteres de polioxietilenglicol, alquil aril éteres de polioxietileno, monoalquilatos de polioxietilen sorbitan, y similares. Como ejemplos de agentes auxiliares, se debe mencionar carboximetilcelulosa, polietilen glicol, propilen glicol, goma arábiga, goma de xantano, y similares. Como ejemplos de agentes protectores, se debe mencionar leche desnatada, tampones de pH, y similares. En este caso, la cantidad de microorganismos viables de la cepa D747 y/o la cantidad de cultivos de la misma, el tiempo de aplicación, y la cantidad de aplicación se pueden determinar apropiadamente de acuerdo con el caso de los microorganismos viables anteriormente descrito.

Además, los agentes para controlar enfermedades de plantas y los agentes para controlar plagas de insectos de acuerdo con la presente invención pueden incluir otros ingredientes tales como pesticidas, otros fungicidas, herbicidas, modificadores del crecimiento vegetal, fertilizantes y abonos, y similares, como ingredientes activos, si se considera necesario. Además, los agentes para controlar enfermedades de plantas y los agentes para controlar plagas de insectos de acuerdo con la presente invención pueden incluir distintas variedades de cepas de la cepa D747, junto con la cepa D747.

Los agentes para controlar enfermedades de plantas y los agentes para controlar plagas de insectos de acuerdo con la presente invención pueden aplicarse directamente o pueden aplicarse después de diluir los agentes con agua o similar. Los procedimientos para aplicar los agentes para controlar enfermedades de plantas y los agentes para controlar plagas de insectos no están particularmente limitados. Como ejemplos de los mismos, se debe mencionar, por ejemplo, un procedimiento en el que se pulverizan directamente sobre plantas o plagas de insectos, un procedimiento en el que se pulverizan sobre la tierra, un procedimiento en el que se añaden a agua o fertilizantes y abonos para aplicarse a las plantas o a la tierra, y similares. Además, la cantidad de formulaciones aplicadas dependerá de las enfermedades que se vayan a controlar, de las plagas de insectos que se vayan a controlar, de las plantas a las que se vaya a aplicar, de los procedimientos de aplicación, de la naturaleza de la ocurrencia de las enfermedades o plagas, del grado de daño, de las condiciones ambientales, de las formas de las formulaciones que se vayan a usar, y similares. Por esta razón, es preferible que la cantidad de las formulaciones aplicadas se ajuste apropiadamente.

Como se describe anteriormente, la cepa D747 de *Bacillus sp.* de la presente invención controla un amplio espectro de enfermedades y plagas, y puede controlar múltiples variedades de enfermedades y plagas de plantas.

ES 2 297 031 T3

Los agentes para controlar enfermedades de plantas y los agentes para controlar plagas que comprenden la cepa D747 de acuerdo con la presente invención pueden controlar enfermedades y plagas de plantas. Por esta razón, se pueden emplear como agentes de control biológico. Por lo tanto, los agentes para controlar enfermedades de plantas y los agentes para controlar plagas de insectos de la presente invención son altamente seguros respecto al medio ambiente, 5 y exhiben efectos de control de múltiples variedades de enfermedades y plagas. Por esta razón, habitualmente pueden prevenir enfermedades y plagas sin emplear otros medios para uso simultáneo con el mismo.

Mejores modos para llevar a cabo la invención

10 La presente invención se describe en detalle por medio de los Ejemplos descritos a continuación. Sin embargo, se debería sobrentender que la presente invención no se limita a estos Ejemplos.

Ejemplo 1

15 *Cultivo de la cepa D747*

Se aisló la cepa D747 del aire en Kikugawa-cho, Ogasa-gun, Shizuoka-ken, JAPON. Más particularmente, para aislar el microorganismo presente en el aire en Kamo, Kikugawa-cho, Ogasa-gun, Shizuoka-ken, JAPON, se dejó reposar un medio en placa que contenía agar de patata-dextrosa durante 10 minutos sin la tapa para que estuviera en 20 contacto con el aire. El medio se incubó durante 3 días a 27°C, y se aisló la colonia formada. La colonia aislada se incubó con un agitador en un medio líquido de patata-dextrosa. Se descubrió la cepa que exhibía actividades respecto a las enfermedades de plantas, desembocando así en el aislamiento de la cepa D747.

Se incubó la cepa D747 aislada a 27°C sobre un agitador rotatorio a 120 rpm durante 3 días en un medio que tenía 25 un pH de 6,0 y que comprendía un 1% de glucosa, un 2% de un almidón soluble, un 0,5% de polipeptona, un 1% de una levadura seca, un 1% de semillas de soja libres de grasa, un 0,2% de KH_2PO_4 , un 0,2% de NaCl, y un 0,3% de carbonato cálcico. Subsiguientemente, se recogieron las cepas mediante centrifugación (10.000 g, durante 15 minutos), se suspendieron en agua esterilizada, y se lavaron para eliminar los ingredientes del medio. Los procedimientos en serie anteriormente descritos se repitieron dos veces. Subsiguientemente, se suspendieron las cepas de nuevo en agua 30 esterilizada a una concentración de aproximadamente $10^9/\text{ml}$.

Ejemplo 2

Ensayo sobre los efectos del control de la infección por el mal del cuello del arroz

35 Se sembraron semillas de arroz (variedad: Aichi Asahi) a una tasa de 10 granos por maceta en macetas de arcilla que tenían un diámetro de 7,5 cm, y se dejaron crecer en un invernadero. Se pulverizó una suspensión de las cepas D747 producidas como se describe en el Ejemplo 1 a una tasa de 10 ml por maceta sobre los brotes de arroz en su estado de 4 hojas. Despues de secar al aire, se inocularon los brotes pulverizando una suspensión de esporas de hongos 40 del mal del cuello del arroz (*Pyricularia oryzae*), y se ubicaron en una cámara de humedad. Al quinto día tras la inoculación, se contó el número de lesiones en la cuarta hoja, y se evaluó según el alcance de las lesiones sobre la base de los criterios de evaluación que se muestran en la Tabla 1 descritos a continuación. Los resultados de los ensayos se muestran en la Tabla 2.

45

TABLA 1

Evaluación	
A	No se observaron lesiones
B	Menos del 20% en base al alcance de las lesiones en la línea no tratada
C	20% o más pero menos del 50% en base al alcance de las lesiones en la línea no tratada
D	50% o más en base al alcance de las lesiones en la línea no tratada

60

Ejemplo 3

Ensayo sobre los efectos del control de la infección por plaga de la vaina del arroz

65

Se sembraron semillas de arroz (variedad: Kinmaze) a una tasa de 10 granos por maceta en macetas de arcilla que tenían un diámetro de 6,0 cm, y se dejaron crecer en un invernadero. Se pulverizó una suspensión de las cepas

D747 producidas como se describe en el Ejemplo 1 a una tasa de 10 ml por maceta sobre los brotes de arroz en sus estados de 2 a 3 hojas. Después de secar al aire, se inocularon los brotes con hongos de la plaga de la vaina del arroz (*Thanatephorus cucumeris*), y se ubicaron en una cámara de humedad. Al quinto día tras la inoculación, se midió la altura de las lesiones, y se emplearon como una evaluación del alcance de las lesiones. La evaluación se llevó a cabo 5 sobre la base de los criterios de evaluación que se muestran en la Tabla1 descritos a continuación. Los resultados de los ensayos se muestran en la Tabla 2.

Ejemplo 4

10 *Ensayo sobre los efectos del control de la infección por la mancha de la gluma del trigo*

Se sembraron semillas de trigo (variedad: Nourin Nº 61) a una tasa de 10 granos por maceta en macetas de plástico que tenían un diámetro de 6,0 cm, y se dejaron crecer en un invernadero. Se pulverizó una suspensión de las cepas 15 D747 producidas como se describe en el Ejemplo 1 a una tasa de 10 ml por maceta sobre los brotes de trigo en su estado de 2 hojas. Después de secar al aire, se inocularon los brotes con picnosporas de hongos de la mancha de la 20 gluma del trigo (*Septoria nodorum*), y se ubicaron en un invernadero. Al décimo día tras la inoculación, se midió el área infectada de la primera hoja en cada maceta, y se empleó como una evaluación del alcance de las lesiones. La evaluación se llevó a cabo sobre la base de los criterios de evaluación que se muestran en la Tabla1 descritos a continuación. Los resultados de los ensayos se muestran en la Tabla 2.

Ejemplo 5

25 *Ensayo sobre los efectos del control de la infección por oidiosis del trigo*

Se sembraron semillas de trigo (variedad: Nourin Nº 61) a una tasa de 10 granos por maceta en macetas de plástico que tenían un diámetro de 6,0 cm, y se dejaron crecer en un invernadero. Se pulverizó una suspensión de las cepas 30 D747 producidas como se describe en el Ejemplo 1 a una tasa de 10 ml por maceta sobre los brotes de trigo en sus estados de 1,5 a 2 hojas. Después de secar al aire, se inocularon los brotes con conidiosporas de la oidiosis del trigo (*Erysiphe graminis*), y se ubicaron en un banco de un invernadero hasta que se llevara a cabo una medida de la 35 infección. Al décimo día tras la inoculación, se midió el área infectada de la primera hoja en cada maceta, y se empleó como alcance de las lesiones. La evaluación se llevó a cabo sobre la base de los criterios de evaluación que se muestran en la Tabla1 descritos a continuación. Los resultados de los ensayos se muestran en la Tabla 2.

35

Ejemplo 6

40 *Ensayo sobre los efectos del control de la infección por moho gris del pepino*

Se sembraron semillas de pepino (variedad: Sagami Hanjiro) a una tasa de 4 granos por maceta en macetas de plástico que tenían un diámetro de 6,0 cm, y se dejaron crecer en un invernadero. Se pulverizó una suspensión de las 45 cepas D747 producidas como se describe en el Ejemplo 1 a una tasa de 10 ml por maceta sobre los brotes jóvenes de pepino en su estado cotiledónico. Después de secar al aire, se inocularon los brotes colocando un disco de papel inmerso en una suspensión de esporas del moho gris del pepino (*Botrytis cinerea*) sobre la superficie de los cotiledones de los brotes de pepino, y después se ubicaron en una cámara de humedad a 20°C. Al tercer día tras la inoculación, se midió el área infectada de los cotiledones, y se empleó como una evaluación del alcance de las lesiones. La evaluación se llevó a cabo sobre la base de los criterios de evaluación que se muestran en la Tabla1 descritos a continuación. Los 50 resultados de los ensayos se muestran en la Tabla 2.

50

Ejemplo 7

55 *Ensayo sobre los efectos del control de la infección por el mildiú velloso del pepino*

Se sembraron semillas de pepino (variedad: Sagami Hanjiro) a una tasa de 4 granos por maceta en macetas de plástico que tenían un diámetro de 6,0 cm, y se dejaron crecer en un invernadero. Se pulverizó una suspensión de las 60 cepas D747 producidas como se describe en el Ejemplo 1 a una tasa de 10 ml por maceta sobre los brotes jóvenes de pepino en su estado cotiledónico. Después de secar al aire, se inocularon los brotes pulverizando una suspensión de zoosporangios del mildiú velloso del pepino (*Pseudoperonospora cubensis*), y después se dejaron reposar en una cámara de humedad a 22°C durante 24 horas. Al octavo día tras la inoculación, se midió el área infectada de los cotiledones, y se empleó como una evaluación del alcance de las lesiones. La evaluación se llevó a cabo sobre la base de los criterios de evaluación que se muestran en la Tabla1 descritos a continuación. Los resultados de los ensayos se muestran en la Tabla 2.

65

TABLA 2

Ejemplo Nº	Enfermedad vegetal ensayada	Efecto de control por la cepa D747
2	mal del cuello del arroz	A
3	plaga de la vaina del arroz	A
4	mancha de la gluma del trigo	A
5	oidiosis del trigo	A
6	moho gris del pepino	A
7	mildiú veloso del pepino	A

20 Ejemplo 8

*Ensayo de mortalidad de *Lissorhoptrus oryzophilus**

25 Se colocó una suspensión de la cepa D747 producida como se describe en el Ejemplo 1, en una cantidad de 30 ml, en una taza de plástico que tenía un volumen de 60 ml. En ella se dejaron flotar tres trozos de hojas de arroz con una longitud de 3 cm. Se liberaron diez imágnes de *Lissorhoptrus oryzophilus* en ella, y se cubrió la taza con una tapa. Tras dejarla reposar en una cámara termostática a 25°C durante 3 días, se contó el número de insectos vivos. El ensayo se llevó a cabo tres veces. Se calculó una tasa de mortalidad mediante la Ecuación (1) descrita a continuación. Se determinó una tasa de mortalidad definitiva calculando un valor medio de los tres valores. Los resultados de los ensayos se muestran en la Tabla 3.

$$\text{Tasa de mortalidad (\%)} = \{[10 - (\text{el número de insectos vivos})] / 10\} \times 100$$

35 TABLA 3

	Tasa de mortalidad definitiva (%)
Tratados con la cepa D747	100
Sin tratamientos	0

45 Como resulta evidente a partir de los resultados que se muestran en la Tabla 2 y la Tabla 3, las plantas a las que se aplicaron los agentes para controlar enfermedades de plantas y los agentes para controlar plagas de insectos que comprenden la cepa D747 de acuerdo con la presente invención exhibieron mayores efectos de control respecto a diversas enfermedades y plagas de plantas.

50 **Aplicabilidad Industrial**

La presente invención resulta característica en que se descubrió una nueva cepa de D747 (FERM BP-8234) de *Bacillus* sp. Al administrar cultivos de la cepa D747 de *Bacillus* sp. (que incluyen las bacterias viables) o bacterias viables aisladas mediante cultivo, sobre partes de la planta tales como raíces, tallos, hojas, semillas, y similares, o en la tierra de cultivo, se pueden controlar brotes de diversas enfermedades de plantas en un intervalo extremadamente amplio, y se pueden controlar plagas. Además, las plantas sobre las que se pulverizan los agentes para controlar enfermedades de plantas y los agentes para controlar plagas de insectos que comprenden la cepa D747 de acuerdo con la presente invención pueden exhibir mayores efectos de control respecto a diversas enfermedades y plagas de plantas.

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una cepa D747 de *Bacillus* sp. que tiene un número de acceso FERM-BP 8234, depositado a tenor del Tratado de Budapest.
- 10 2. Un agente para controlar una enfermedad de una planta **caracterizado** por comprender la cepa de bacilo de acuerdo con la reivindicación 1 como bacteria activa.
- 15 3. Un agente para controlar una plaga de insecto **caracterizado** por comprender una cepa de *Bacillus* de acuerdo con la reivindicación 1 como bacteria activa.
4. Un procedimiento para controlar una enfermedad de una planta y/o una plaga de insecto, **caracterizado** por emplear el agente para controlar una enfermedad de una planta de acuerdo con la Reivindicación 2 y/o emplear el agente para controlar una plaga de insecto de acuerdo con la Reivindicación 3.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65