

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 879 322**

51 Int. Cl.:

C12N 1/20 (2006.01)

A01N 63/27 (2010.01)

C12R 1/40 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.04.2018** **PCT/EP2018/058567**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.10.2018** **WO18185139**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.04.2018** **E 18716220 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.04.2021** **EP 3607048**

54 Título: **Cepa de Pseudomonas putida**

30 Prioridad:

06.04.2017 EP 17382188

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.11.2021

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

LARA SÁNCHEZ, JOSÉ MANUEL y
FERNÁNDEZ CASTILLO, CAROLINA

74 Agente/Representante:

CONTRERAS PÉREZ, Yahel

ES 2 879 322 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

Cepa de *Pseudomonas putida*

5 Campo técnico

La presente invención se refiere al campo de los productos fitosanitarios, específicamente a una nueva cepa de *Pseudomonas putida* y a su uso en el control biológico de enfermedades fúngicas y bacterianas en cultivos de interés agrícola.

10

Técnica anterior

Actualmente, el control de las enfermedades infecciosas de las plantas ha centrado su atención en minimizar el impacto conocido que tienen los fungicidas y bactericidas sobre la salud del consumidor y el medio ambiente. Por esa razón, se observa un cambio hacia un uso racional de este tipo de productos y una aplicación de métodos que sean menos tóxicos.

Aunque se considera que los antibióticos son los productos fitosanitarios con mayor eficacia en el control de enfermedades bacterianas en las plantas, su uso prolongado favorece la generación de cepas resistentes, lo que compromete su eficacia. Asimismo, la resistencia a los antibióticos generada en estas cepas se puede transferir a otras bacterias, incluidos los patógenos humanos. Este hecho explica la prohibición de su uso en la agricultura en muchos países, incluida la Unión Europea. Una alternativa a los antibióticos son los antimicrobianos de amplio espectro, como los compuestos a base de cobre, pero en este caso tienen una eficacia limitada y un impacto ambiental adverso debido a su toxicidad y acumulación en el medio ambiente.

25

En el estado actual de la técnica, se han descrito cepas de bacterias no patógenas transmitidas por el suelo con habilidad de antagonizar fitopatógenos fúngicos y bacterianos, como una alternativa a los plaguicidas químicos. Sin embargo, estas cepas bacterianas tienen algunos inconvenientes. Ejemplos de ello son la producción de metabolitos secundarios tóxicos y la falta de una idoneidad ecológica adecuada para la colonización de plantas; o cierta inestabilidad con el paso del tiempo, lo que dificulta la formulación de estas cepas en composiciones de periodo de validez prolongado.

30

Además de lo anterior, en algunos casos se ha indicado que estas cepas bacterianas tienen dificultades para colonizar y sobrevivir eficazmente en los órganos del hospedador infectado, lo que requiere la aplicación de altas concentraciones o formulaciones complejas para obtener un efecto significativo del control de las enfermedades. Es más, el hecho de que participen organismos vivos significa que, aunque tienen ventajas sobre otros plaguicidas sintéticos, las condiciones ambientales y del hospedador afectan a su actividad biológica, haciendo que su efectividad sea generalmente variable y significativamente más baja que la de los productos químicos de referencia. Asimismo, en los últimos años, para impedir la aparición de resistencias en cepas patógenas para seres humanos o animales, las bacterias productoras de antibióticos utilizadas como ACB (agentes de control biológico) se han reducido

40

En el estado de la técnica se conocen varias cepas de *Pseudomonas putida*, útiles como agente de control biológico (por ejemplo, de los documentos WO 2013/150422, EP 1241247 y WO 99/05257).

En vista de lo anterior, a pesar de los trabajos realizados, sigue existiendo la necesidad de cepas bacterianas que superen total o parcialmente las limitaciones mostradas por las cepas ya conocidas en el estado de la técnica en el control de la fitopatología (enfermedades de las plantas).

45

Sumario de la invención

50

Los inventores han aislado una nueva cepa de la especie *Pseudomonas putida*, aislada en Gavá (Barcelona, noreste de España), que se caracteriza por tener un amplio espectro de actividad, controlando así varios patógenos fúngicos y bacterianos, en una amplia gama de pH del suelo.

Como se ilustra a continuación, la cepa de la invención se caracteriza por mostrar una actividad antagonista contra cepas fúngicas de *Botrytis aclada*, *Pythium ultimum*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Colletotrichum coccodes*, *Fusarium oxysporum*, *Alternaria porri*, y contra la cepa bacteriana de *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* (FIG. 2 y Tablas 4 y 5). Los presentes inventores también han descubierto que la cepa de la invención es capaz de inhibir las infecciones causadas por *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* en plantas en condiciones de cultivo (Tabla 4).

60

La cepa de la invención presenta actividades de leucina arilamidasa y fosfatasa alcalina, ambas con un impacto beneficioso sobre el crecimiento, desarrollo y reproducción de las plantas. La leucina arilamidasa libera aminoácidos de compuestos poliméricos de elevada masa molecular proporcionando una fuente de nitrógeno orgánico disuelto que

es un nutriente esencial para la planta. Asimismo, la actividad de fosfatasa alcalina juega un papel importante en la solubilización de los fosfatos unidos, poniéndolos a disposición de las plantas y también ayudando a su crecimiento y desarrollo.

- 5 En cuanto a la actividad de control biológico de la cepa de la invención, como se comentó anteriormente, tiene la capacidad de antagonizar diferentes agentes fitopatógenos. En este contexto, como se ilustra en la Tabla 5, la cepa de la invención puede antagonizar más eficazmente el crecimiento del hongo *Botrytis aclada* que otras cepas de *P. putida*, teniendo un efecto superior y duradero. Por tanto, a partir de los datos que se indican a continuación, también se puede llegar a la conclusión de que la efectividad de la cepa de la invención puede permitir su uso en
- 10 concentraciones más bajas para alcanzar la actividad de control biológico. Esto puede dar lugar a ventajas en la formulación de diferentes composiciones que comprenden la cepa de la invención, así como una reducción de costes relacionados con su producción industrial.

- La actividad antagonista de la cepa de la invención puede deberse en parte a la expresión de enzima esterasa (C₄)
- 15 (Tabla 3), que se ha relacionado con la capacidad de control biológico debido a su actividad desintoxicante de algunas fitotoxinas microbianas, inhibiendo la entrada de hongos en las células vegetales y/o suscitando las respuestas de defensa de las plantas.

- A pesar de la alta capacidad antagonista de la cepa de la invención, se ha descubierto sorprendentemente que la cepa de la invención no expresa ni sintetiza los compuestos antimicrobianos pirrolnitrina, 2,4-diacetilfloroglucinol (2,4-DAPG), pioluteorina y piocianina como se describe en los ejemplos 4 A y B. Estos metabolitos son conocidos por ser los compuestos antimicrobianos más comunes producidos por *Pseudomonas* spp. y están implicados en la aparición de resistencia en cepas patógenas para seres humanos o animales. Por tanto, la falta de expresión de estos metabolitos por la cepa de la invención la confiere un perfil más seguro.

- 25 Es más, la cepa de la invención tiene la habilidad de colonizar y sobrevivir en suelos con pH entre 4 y 10 (Tabla 2).

- El intervalo de pH de los suelos, puede variar desde ultra ácido, que son suelos que tienen un pH inferior a 3,5, a suelos muy fuertemente alcalinos, que tienen pH superiores a 9. El crecimiento de las plantas depende de la
- 30 disponibilidad de micronutrientes y macronutrientes. El pH del suelo tiene un claro impacto en la disponibilidad de nutrientes. Esta es la razón por la que hay algunas especies que pueden crecer en algunos suelos y otras que no dependiendo de sus requisitos de crecimiento. Por otro lado, los expertos en la técnica reconocen bien que las condiciones ambientales, tales como el pH, pueden afectar negativamente a la viabilidad/actividad de un microorganismo particular. Los inventores han descubierto sorprendentemente que la cepa de la invención puede
- 35 sobrevivir a valores de pH muy extremos, entre 4 y 10. Es decir, la eficacia de la cepa de la invención no se ve afectada negativamente por el pH del suelo, lo cual es una valiosa ventaja adicional porque significa que la cepa de la invención puede ejercer su función en cualquier tipo de cultivo de plantas.

- En conjunto, los datos aquí proporcionados permiten llegar a la conclusión de que la cepa de la invención es una cepa
- 40 segura y versátil que puede ejercer de manera eficaz su acción como plaguicida independientemente de la naturaleza del suelo, a diferencia de otras cepas de *P. putida*.

- Por tanto, la presente invención proporciona, en un primer aspecto, una cepa de *Pseudomonas putida* depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con el número de registro CECT8538, o una mutante de la misma, en
- 45 donde dicha cepa mutante se obtiene usando la cepa CECT8538 de *Pseudomonas putida* y también conserva las siguientes características de la cepa de partida: (a) actividad antagonista de la cepa de partida contra *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*, *Botrytis aclada*, *Pythium ultimum*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Colletotrichum coccodes*, *Fusarium oxysporum* y *Alternaria porri* y (b) habilidad de colonizar o sobrevivir en una parte aérea o en las raíces de una planta.

- 50 La cepa de *Pseudomonas putida* de la invención, aislada de suelo en Gavá (Barcelona, noreste de España), fue depositada por el solicitante, según el Tratado de Budapest, el 21 de enero de 2014 en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), ubicada en la Universidad de Valencia, Edificio de Investigación, Campus de Burjassot, 46100 Burjassot, Valencia, España. La cepa recibió el número de registro CECT8538 después de considerarla como una
- 55 cepa viable.

Por tanto, en un segundo aspecto, la presente invención proporciona el uso de la cepa CECT8538 de *P. putida* o una mutante de la misma como se define en el primer aspecto de la invención, como un plaguicida.

- 60 En cuanto a su uso como un plaguicida en plantas, es importante obtener grandes cantidades de células viables de la cepa. Como se muestra en el Ejemplo 5, una vez concentrada y liofilizada, la composición muestra > 90 % de viabilidad celular, que se mantiene conserva el almacenamiento.

En un tercer aspecto, la presente invención proporciona un proceso para obtener una suspensión celular viable

procedente de la cepa CECT8538 de *Pseudomonas putida* o de una mutante de la misma como se define en el primer aspecto de la invención, comprendiendo el proceso: (i) inocular la cepa en un medio de cultivo, (ii) someter el medio de cultivo inoculado de la etapa (i) a condiciones adecuadas para el crecimiento de la cepa, y (iii) someter opcionalmente el medio resultante de la etapa (ii) a una etapa de concentración.

5

En un cuarto aspecto, la divulgación proporciona un extracto acelular procedente de la cepa CECT8538 de *Pseudomonas putida* o de una mutante de la misma como se define en el primer aspecto de la invención, pudiendo obtenerse dicho extracto mediante un proceso que comprende: (i) inocular la cepa en un medio de cultivo adecuado; (ii) someter el medio de cultivo inoculado a condiciones de crecimiento adecuadas; (iii) separar las células del medio de cultivo de la etapa (ii); (iv) recoger el extracto acelular; y (v) opcionalmente someter el extracto acelular a una etapa de concentración.

10

Como alternativa, una vez inoculada la cepa y sometiéndola a condiciones de crecimiento adecuadas, el producto de inoculación resultante puede someterse a una etapa de inactivación del microorganismo.

15

En un quinto aspecto, la invención proporciona un producto de inoculación que comprende la cepa de la invención inactivada.

El producto de inoculación del quinto aspecto de la invención puede ejercer el efecto antagonista debido a la secreción, durante la etapa de crecimiento, de los metabolitos responsables de ese efecto.

20

En un sexto aspecto, la presente invención proporciona una composición que comprende la cepa CECT8538 de *Pseudomonas putida* o una mutante de la misma como se define en el primer aspecto de la invención, o un producto de inoculación como se define en el quinto aspecto, y uno o más compuestos agrícolamente aceptables.

25

En un séptimo aspecto, la presente invención proporciona el uso de la cepa de la invención o una mutante de la misma como se define en el primer aspecto de la invención, o el producto de inoculación como se define en el quinto aspecto de la invención, o una composición como se define en el sexto aspecto de la invención como un plaguicida.

30

Por último, en un octavo aspecto, la presente invención proporciona un método para controlar una infección causada por un patógeno bacteriano o fúngico en una planta, que comprende administrar a la planta, la cepa de la invención o una mutante de la misma como se define en el primer aspecto, el producto de inoculación como se define en el quinto aspecto o la composición como se define en el sexto aspecto.

35 Breve descripción de los dibujos

FIG. 1. La cepa CECT8538 tiene capacidad de enjambre a 28 °C. Imágenes representativas de *P. putida* CECT8538 incubada con M9 o BM2 a 28 °C (derecha) o a 37 °C (izquierda) durante 30 h.

40

FIG 2. La cepa CECT8538 tiene actividad antifúngica. Imágenes representativas de hongos fitopatógenos que crecen en APD que contiene dos dosis de *P. putida* CECT8538 en comparación con APD solo como control. A: *B. aclada* CECT 2851, B: *R. solani* DSMZ 63010, C: *P. ultimum* CECT 20902, D: *S. sclerotiorum* CECT 2822, E: *S. esclerotiorum* cepa H24, F: *C. coccodes* cepa H827, G: *F. oxysporum* cepa H828 y H: *A. porri* cepa H830.

45

FIG 3. Cinética del crecimiento fúngico de *Botrytis aclada* expuesta o no a las cepas de *P. putida* indicadas. El gráfico muestra el % de inhibición del crecimiento de *B. aclada* creciendo en APD (control; rombos), APD inoculado con CECT8538 (cuadrados), APD inoculado con CECT324 (triángulos) y APD inoculado con DSM6125 (cruces) a los 3, 7 y 10 días después de la inoculación.

50 Descripción detallada de la invención

Todos los términos que se utilizan en la presente solicitud, a menos que se indique otra cosa, se entenderán en su significado habitual como se conoce en la técnica. Otras definiciones más específicas de determinados términos y expresiones que se utilizan en la presente solicitud, son como se exponen a continuación y se pretende que se apliquen de manera uniforme a lo largo de la memoria descriptiva y las reivindicaciones a menos que una definición expuesta expresamente de otro modo proporcione una definición más amplia.

55

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a una cepa de *Pseudomonas putida* depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con el número de registro CECT8538, o a una cepa mutante de la misma.

60

Por el término "mutante" se entiende una bacteria que se obtiene usando, como material de partida, la cepa CECT8538 de *P. putida* de la invención, y que conserva las propiedades de dicha cepa depositada, con respecto a su actividad antagonista y a la habilidad de colonizar o sobrevivir en una parte de una planta.

La actividad antagonista contra diferentes fitopatógenos se puede analizar a través de diferentes métodos. Estos métodos se basan comúnmente en el análisis de la capacidad de crecimiento de los patógenos en contacto con el principio activo o el ACB, o en la evaluación de la gravedad de la enfermedad causada por la infección del patógeno después de la exposición al principio activo o al ACB. Algunos protocolos habituales para valorar esta actividad son, entre otros, la técnica de los alimentos envenenados y el análisis de la gravedad de la podredumbre blanda bacteriana. Resumiendo, la técnica de los alimentos envenenados consiste en la generación de una placa de agar, patata y dextrosa, que contiene el agente de control biológico, en la exposición de esta placa a un cultivo de micelio previamente preparado de las cepas patógenas, y en la evaluación del crecimiento de las cepas patógenas a lo largo del tiempo. En el caso del análisis de la gravedad de la podredumbre blanda bacteriana, el protocolo consta de las siguientes etapas: (i) desinfección y siembra de semillas; (ii) permitir el crecimiento de las plántulas durante 4 semanas; (iii) exponer la planta resultante a la cepa patógena; (iv) incubar la planta con el agente de control biológico; y (v) evaluar la gravedad de la enfermedad después de una incubación adicional durante 4 semanas. Más adelante, en los Ejemplos 6 A-C, se muestra la capacidad de la cepa de la invención para antagonizar diferentes agentes fitopatógenos. La FIG. 2 y las Tablas 4 y 5 ilustran que la cepa de la invención no solo puede antagonizar diferentes cepas de hongos de manera más eficaz que otras cepas de *P. putida*, sino que también es eficaz contra el crecimiento de bacterias, tales como *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* en condiciones de cultivo. La capacidad de colonización es necesaria para que un ACB realice correctamente su función. Esta capacidad se puede estudiar usando varias técnicas que comprenden el ensayo de enjambre, o ensayos funcionales tales como la evaluación de la actividad antagonista en condiciones similares a las de un cultivo. Para evaluar la movilidad de enjambre, las cepas bacterianas se siembran en placas en medios específicos (M9 o BM2) y se incuban durante la noche a una temperatura deseada. Después de la incubación, se analiza el movimiento multicelular de la superficie por las bacterias. Asimismo, relacionado con la capacidad de colonizar, hay otras capacidades también implicadas en la adaptación a diferentes condiciones ambientales, tales como las tolerancias de pH y temperatura. En este contexto, la cepa de la invención muestra la habilidad de colonizar diferentes sustratos a 26 °C (FIG 1), así como la habilidad de actuar contra una infección bacteriana cuando se aplica a la planta infectada (Tabla 4), pudiendo sobrevivir en un amplio intervalo de pH, de 4 a 10 (Tabla 2).

Un "mutante" de CECT8538 de *P. putida*, también se entiende como una "variante" de CECT8538 de *P. putida*. Los expertos en la técnica entenderán que los mutantes que conservan las características y ventajas relevantes descritas en el presente documento se pueden obtener habitualmente, por ejemplo, por mutagénesis espontánea o mutación dirigida, usando la cepa de la invención como material de partida. En la técnica se conocen métodos para obtener mutantes de una cepa bacteriana específica. Un ejemplo se puede encontrar en Sambrook, J. y Russell, D.W. "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Capítulo 13, "Mutagenesis", Cold Spring Harbor, 3ª ed, 2001. De ahora en adelante, cuando en la presente invención se hace referencia a la expresión "cepa de la invención", esta abarca la cepa CECT8538 de *P. putida* y sus mutantes.

La planta puede ser un tubérculo, como patatas, o un árbol, en particular, un árbol frutal, como un peral, tomate, coliflor o pimiento, entre otras. Por tanto, en el presente documento, las expresiones "control de plagas" y "control biológico de plagas", se usan indistintamente y se refieren al control integrado de plagas. En vista de lo anterior, en otro aspecto, la invención se refiere al uso de la cepa CECT8538 de *P. putida* o de una variante de la misma, como un plaguicida en plantas. En la presente invención, el término "plaguicida" se entiende por su significado habitual en el campo de la agronomía como un producto destinado a destruir, repeler, regular o interrumpir el crecimiento de organismos vivos que se consideran plagas. Claramente, debido a la naturaleza de la cepa CECT8538 de *P. putida* o variante de la misma, en el presente documento se entiende que "plaguicida" es un plaguicida biológico o ecológico (orgánico), denominado también bioplaguicida. En el alcance de la presente invención, el término "plaguicida" tendría el mismo significado que el término "fitosanitario".

En la presente invención, la expresión "control de la enfermedad" significa que previene, reduce, cura o erradica la enfermedad.

En una realización del segundo aspecto de la invención, la cepa se usa para prevenir infecciones causadas por bacterias u hongos en las plantas.

En un tercer aspecto, la presente invención se refiere a un proceso para obtener una suspensión celular viable procedente de la cepa de la invención que comprende: (i) inocular la cepa de la invención en un medio de cultivo adecuado, (ii) someter el medio de cultivo inoculado de la etapa (i) a condiciones apropiadas para el crecimiento de la cepa, y (iii) someter opcionalmente el medio resultante de la etapa (ii) a una etapa de concentración.

La expresión "procedente de la cepa de la invención" significa que la suspensión se obtiene a partir de la cepa objeto de la presente invención.

La cepa de la invención puede inocularse en el medio de cultivo a una concentración final comprendida entre el 5 y el

7 % v/v. Preferentemente, el cultivo inoculado se encuentra en una fase de crecimiento exponencial. El crecimiento celular se ralentizará al alcanzar, preferentemente, una concentración celular comprendida entre $1,0 \times 10^9$ y $1,0 \times 10^{10}$ UFC/ml. Los medios de cultivo adecuados para el crecimiento de la cepa de la invención son medios sintéticos, tales como LB (del inglés *lysogenic broth*, caldo lisogénico) y PM (*saline production medium*, medio de producción salino), o medios de origen vegetal tales como melaza (por ejemplo, de caña de azúcar, remolacha y otros). Las condiciones adecuadas para el crecimiento de la cepa son temperaturas comprendidas entre 25 y 35 °C, un pH comprendido entre 6 y 8 y una concentración de oxígeno comprendida entre 50 y 100 %. El crecimiento de la cepa de la invención se produce mediante agitación. En el Ejemplo 5 se refleja un ejemplo del método detallado para obtener células de la cepa de la invención.

En otra realización del proceso para la obtención de la suspensión, las células se separan del medio para obtener una suspensión concentrada. Las técnicas de separación adecuadas incluyen centrifugación o filtración del cultivo. Al realizar la centrifugación del cultivo, por ejemplo, a un mínimo de 5000 rpm, las células se obtienen en el sedimento, que se resuspende en parte del medio de cultivo o en un medio tamponado adecuado, de modo que la concentración de la cepa sea de aproximadamente 1×10^{11} UFC/ml.

Una vez obtenida la suspensión, ésta puede someterse a una etapa de deshidratación. La deshidratación se puede realizar mediante un proceso de liofilización. Como alternativa, la suspensión se puede deshidratar mediante secado en lecho fluidizado. Otra opción es deshidratar la suspensión mediante secado por pulverización o secado en un horno al vacío. En este sentido, otra característica ventajosa de la cepa de la invención es que presenta una alta resistencia a los procesos de deshidratación, que son habituales en la obtención de microorganismos a escala industrial. Para mejorar la viabilidad celular, se puede añadir un ingrediente protector osmótico inerte a la suspensión antes de llevar a cabo el proceso de deshidratación.

En otra realización del tercer aspecto de la invención, el proceso comprende resuspender las células resultantes de la etapa de separación en un tampón adecuado para producir una suspensión concentrada de células.

En un cuarto aspecto, la divulgación proporciona un extracto acelular procedente de la cepa CECT8538 de *P. putida* o de una mutante de la misma, como se define en el primer aspecto de la invención, pudiendo obtenerse dicho extracto mediante un proceso que comprende: (i) inocular la cepa en un medio de cultivo adecuado; (ii) someter el medio de cultivo inoculado a condiciones de crecimiento adecuadas; (iii) separar las células del medio de cultivo de la etapa (ii); (iv) recoger el extracto acelular; y (v) opcionalmente someter el extracto acelular a una etapa de concentración.

El medio acelular obtenido mediante los procesos de separación descritos anteriormente, podría usarse y/o introducirse en una formulación apropiada directamente o someterse a una etapa de concentración para alcanzar una composición más adecuada. Por tanto, en una realización del cuarto aspecto, la divulgación se refiere a diferentes protocolos para concentrar el extracto acelular que se puede usar, tales como deshidratación, filtración, ultrafiltración, centrifugación, ultracentrifugación, precipitación o cromatografía.

En otro aspecto de la invención, la invención proporciona en un quinto aspecto un producto de inoculación que comprende la cepa de la invención.

Por "producto de inoculación" se entiende un producto obtenido después de inocular la cepa en un medio de cultivo adecuado, sometiendo el medio de cultivo inoculado a condiciones de crecimiento adecuadas.

En una realización del quinto aspecto de la invención, el producto de inoculación está en forma concentrada. En otra realización, el producto de inoculación está en forma concentrada seca. Las técnicas para concentrar y secar el producto de inoculación son habituales y se han proporcionado anteriormente.

En otra realización del quinto aspecto de la invención, el producto de inoculación comprende la cepa de la invención inactivada.

Por "producto de inoculación que comprende la cepa de la invención inactivada" se refiere a un producto obtenido después de inocular la cepa en un medio de cultivo adecuado, someter el medio de cultivo inoculado a condiciones de crecimiento adecuadas y después, inactivar la cepa. El término "inactivado" significa que el microorganismo no puede formar colonias. En una realización, los microorganismos inactivados tienen la membrana celular intacta o rota. En un sexto aspecto, la presente invención proporciona una composición que comprende la cepa como se define en el primer aspecto de la invención, o un producto de inoculación como se define en el quinto aspecto, y uno o más compuestos agrícolamente aceptables. Con miras a un uso práctico en el control de plagas, los agentes plaguicidas se formulan normalmente en composiciones que también incluyen aditivos adecuados para su uso agrícola. Las composiciones de la invención pueden ser sólidas (incluyendo, por ejemplo, concentrado de bacterias deshidratadas) o líquidas (incluyendo suspensiones concentradas de bacterias).

"Compuestos agrícolamente aceptables" se refiere a aquellos compuestos y/o materiales, que son adecuados para su uso en agricultura. En general, dichos compuestos no deberían ser tóxicos para los seres humanos y, preferentemente, deberían ser respetuosos con el medio ambiente.

En una realización particular del sexto aspecto de la invención, las composiciones plaguicidas de la invención pueden contener compuestos para mejorar la adherencia de las cepas en las plantas a tratar, así como compuestos fitofortificantes, nutrientes, agentes humectantes, estabilizantes, protectores osmóticos, antioxidantes, protectores solares, compuestos tamponantes o combinaciones de los mismos.

En otra realización del sexto aspecto de la invención, son ejemplos de productos de adhesión la gelatina, el almidón, las pectinas, los alginatos y varios tipos de gomas tales como el xantano. Muchos de estos compuestos también son agentes humectantes. En el caso de los protectores solares, pueden usarse emulsiones de cera, rojo Congo y carbonato de calcio. Los fitofortificantes son compuestos que pueden facilitar que los cultivos desarrollen fortaleza o

- 5 tolerancia contra patógenos o condiciones ambientales adversas, por ejemplo, análogos del ácido jasmónico y algunos estimulantes de las defensas de las plantas tales como harpinas, quitosanos y laminarinas. Asimismo, son ejemplos de protectores osmóticos la trehalosa, las betaínas y los aminoácidos. Por último, el ácido ascórbico y el glutatión se incluyen entre los antioxidantes.
- 10 En una realización adicional del sexto aspecto de la invención, la composición comprende al menos un agente plaguicida adicional, dicho plaguicida adicional no afecta negativamente a la actividad de la cepa CECT8538. En otra realización del sexto aspecto de la invención, el agente plaguicida adicional se selecciona del grupo que consiste en una cepa bacteriana eficaz para controlar una infección bacteriana o fúngica, un fungicida, un bactericida, un herbicida, un insecticida o un nematocida.

- 15 Las composiciones del sexto aspecto de la invención se pueden preparar mediante protocolos habituales, tal como mezclando los diferentes ingredientes.

En un séptimo aspecto, la invención se dirige al uso de la cepa de la invención como se define en el primer aspecto de la invención, o al producto de inoculación como se define en el quinto aspecto de la invención, o a las composiciones como se definen en el sexto aspecto de la invención, como un plaguicida en plantas.

- 20 En otra realización del séptimo aspecto de la invención, la invención se refiere al uso de las composiciones del sexto aspecto para controlar enfermedades causadas por patógenos fúngicos o bacterianos en las plantas.

En otro aspecto, la invención proporciona un método que comprende administrar la cepa de la invención o sus mutantes, como se define en el primer aspecto, o el producto de inoculación definido en el quinto aspecto, o las composiciones definidas en el sexto aspecto, a la parte afectada de la planta y/o la semilla, o al sustrato o suelo que

- 25 se usa para el cultivo de dicha planta, para prevenir, curar, reducir o erradicar una enfermedad causada por una infección bacteriana o fúngica.

A lo largo de la descripción y en las reivindicaciones, la palabra "comprende" y variaciones de la misma, no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o etapas. Es más, la palabra "comprende" abarca el caso

- 30 de "consiste en". Objetos, ventajas y características adicionales de la invención serán obvias para los expertos en la materia tras examinar la descripción o pueden aprenderse poniendo en práctica la invención. Los siguientes ejemplos se proporcionan a modo de ilustración y no pretenden ser limitantes de la presente invención.

Ejemplos

35

Ejemplo 1. Aislamiento e identificación de la cepa CECT8538 de *Pseudomonas putida*

Para obtener los aislados, se recogieron muestras de suelo de la región de España. Todas las muestras procedían de campos y entornos naturales de clima mediterráneo. Las muestras se procesaron mediante métodos microbiológicos

- 40 convencionales (Mora *et al.*, "Antimicrobial peptide genes in *Bacillus* strains from plant environments", *International Microbiology*, 2011, vol. 14, págs. 213-223) y las bacterias del género *Pseudomonas* se aislaron en medio NA a 28 °C durante 24 h, formando una colección de 2.400 aislados. La cepa CECT8538 se identificó inicialmente mediante secuenciación de ADNr 16S. El ADNr 16S se amplificó usando el cebador directo bacteriano 8f, con la secuencia SEQ ID NO: 1 (cebador directo 8f: AGTTTGATCCTGGCTCAG) y el cebador universal complementario inverso 1492r, con
- 45 SEQ ID NO: 2 (cebador inverso 1492r: ACGGTTACCTTGTTACGACTT), usando PCR de colonias (con la punta de una pipeta estéril, se recogió una sola colonia de un cultivo sólido en NA; la punta se sumergió en 50 µl de agua estéril, se hirvió durante 10 min a 98 °C y puso inmediatamente en hielo hasta su uso como molde de PCR) con una ADN polimerasa de alta fidelidad (Biotaq, Bioline, Londres, RU) siguiendo las instrucciones del fabricante. El amplicón de
- 50 SEQ ID NO: 3 (correspondiente a la subunidad 16S de ADNr de la cepa CECT8538 de la invención) se purificó y se secuenció usando el cebador 8f. A continuación, la secuencia se sometió a una búsqueda de homología BLASTn contra toda la base de datos de nucleótidos del NCBI (Centro Nacional de Información Biotecnológica). Basándose en la secuencia de nucleótidos del ADNr 16S, el aislado bacteriano se identificó inicialmente como una cepa de *Pseudomonas* sp. estrechamente relacionada con el denominado "complejo de *P. putida*" (*P. putida/plecoglossida/taiwanensis*).

55

Para una identificación más precisa de la cepa bacteriana, las secuencias de nucleótidos de *rpoD* y *gyrB*, que, según los informes, son más discriminativas dentro de este género, se recuperaron de la secuencia hologenómica (WGS, *whole-genome sequencing*) indiscriminada y se analizaron como en el caso de 16S, excepto que la base de datos diana se limitó a entradas de *Pseudomonas* spp. (taxid: 286). Las secuencias de nucleótidos de *rpoD* (SEQ ID: 4) y

- 60 *gyrB* (SEQ ID: 5) muestran que la cepa CECT8538 es una cepa de *P. putida* perteneciente a la biovariedad A o C. A diferencia de la biovariedad C, las cepas de *P. putida* de la biovariedad A no pueden crecer a 4 °C. Dado que la cepa CECT8538 no pudo crecer a 4 °C, se concluyó que era una cepa de *P. putida* de la biovariedad A.

Para obtener amplia información sobre la cepa de la invención, incluyendo una clasificación precisa, se realizó un

experimento de secuenciación hologenómica (de todo el genoma). Para esto, se obtuvo ADN de un cultivo líquido de CECT8538 y se secuenció usando la tecnología Illumina (HiSeq2500) en una biblioteca de ADN Nextera® (Illumina, Cambridge, RU) siguiendo las especificaciones del fabricante. Los datos generados se analizaron en Sequentia Biotech (Barcelona, España) aplicando un flujo de trabajo patentado, RECONSTRUCTOR, que genera una secuencia hologenómica (WGS) indiscriminada usando un enfoque combinado *de novo* y de ensamblaje asistido por referencias. Para el ensamblaje asistido por referencias, como referencia se usó *P. putida* KT2440 (n.º de registro NC_002947.4; DSM6125).

La secuencia WGS se anotó usando RAST (*Rapid Annotations using Subsystems Technology*). Para la exploración de operones de ARNr se usó la herramienta informática WebMGA (<http://weizhong-lab.ucsd.edu/metagenomic-analysis/>). Para la identificación de los ARNt se usó ARAGORN v1.2.36. El oriC y las secuencias relacionadas se identificaron usando Ori-Finder y la base de datos DoriC. Las islas genómicas se identificaron usando IslandViewer 3.

El ensamblaje de la secuencia del genoma de CECT8538 produjo 186 armazones, que contenían 6315656 nucleótidos, contruidos a partir de cóntigos sin ningún acierto BLAST (límite del valor de e 0,01) o con los mejores aciertos BLAST en *Pseudomonas* spp. De los 186 armazones, el primero (denominado en el presente documento "el cromosoma") incluye 5860165 bases, es decir, el 92,8 % de todas las bases secuenciadas. El contenido global de GC, del genoma de CECT8538, es del 61,7 %. IslandViewer predice 12 islas genómicas (IsG) en el cromosoma, coincidiendo algunas de ellas con regiones de GC distorsionadas, de las cuales al menos 5 llevan secuencias relacionadas con profagos. Una de estas IsG abarca aproximadamente 700 kbp e incluye más de 600 CDS.

Solo un fragmento de una copia de ADNr 5S se ensambla en el cromosoma de CECT8538. Las secuencias completas de 16S y 23S, adyacentes a un fragmento del 5S, están codificadas en uno de los armazones más grandes (excluido el cromosoma). Asimismo, otros armazones contienen o bien un fragmento o la secuencia de 5S completa cada uno. Muy probablemente, RECONSTRUCTOR alinea las copias de ADNr entre sí considerando que son lecturas superpuestas. La WGS de CECT8538 incluye secuencias que codifican 67 ARNt. De estas, 57 están codificadas en el cromosoma e incluyen los ARNt para 22 aminoácidos, incluyendo seC (selenocisteína) y un ARNt ambiguo (para seC o Val). La secuencia oriC del genoma de CECT8538 comprende 573 nucleótidos, flanqueados por los genes rpmH y dnaA, y comprende 4 cajas de dnaA y dos secuencias adicionales con 1 y 2 sitios no emparejados, respectivamente.

La herramienta de anotación RAST predijo 5892 CDS codificadas en 5595813 nucleótidos (es decir, las regiones codificantes cubren el 88,6 % del genoma), variando la longitud de CDS de 60 a 14394 nucleótidos, con longitudes medias y medianas de CDS de 950 y 819 nucleótidos, respectivamente, y con una longitud de N50 CDS de 1197 nucleótidos. De todas las CDS, el 50 % se clasificaron como proteínas hipotéticas.

Asimismo, Sequentia Biotech realizó un análisis de validación de variantes para descifrar polimorfismos mononucleotídicos (SNP, *single nucleotide polymorphisms*), pequeñas inserciones o deleciones (INDEL) y grandes variantes estructurales (VE) en CECT8538 en comparación con el genoma de referencia (KT2440; DSM6125). Después de filtrar por calidad de variante y profundidad de genotipo, CECT8538 muestra 112931 SNP y 867 INDEL (332 pequeñas deleciones y 535 pequeñas inserciones) en comparación con KT2440. Asimismo, de todas las lecturas de CECT8538 obtenidas en el experimento, el 22,3 % no se mapeó en el genoma de KT2440. Estas lecturas se ensamblaron *de novo* y de los armazones ensamblados se predijeron 512 ORF (forma siglada de *open reading frame*, marco abierto de lectura), incluyendo 402 proteínas completas. El algoritmo megablast, con la configuración predeterminada, no mostró una alineación significativa con ninguna secuencia de nucleótidos en la base de datos del NCBI para más de 200 de estos ORF, lo que indica que la cepa CECT8538 no solo es diferente a la KT2440, sino también de otras cepas.

Ejemplo 2. Caracterización de las propiedades fisicoquímicas de la cepa CECT8538 de *Pseudomonas putida*

Para los ensayos de caracterización, la cepa de la invención se sembró en placas con medios de agar nutritivo comercial (NA, Scharlab), M9 (casaminoácidos al 0,5 %, MgSO₄ 2 mM, CaCl₂ 0,1 mM complementado con glucosa al 0,4 % y solidificado con agar al 0,5 %) o BM2 (tampón de fosfato de potasio 62 mM, pH = 7, MgSO₄ 2 mM, FeSO₄ 10 µM, casaminoácidos al 0,5 % [p/vol], complementado con glucosa al 0,4 % y solidificado con agar al 0,5 %). Las placas se prepararon después de la esterilización de los medios y, una vez que éstos se enfriaron lo suficiente, se vertió en las placas y se dejó hasta que se volviesen semisólidos. Para la evaluación del perfil de temperatura, la cepa de la invención se sembró en placas de NA a una concentración de 10⁸ (UFC ml⁻¹), y se incubó a diferentes temperaturas (es decir, 4 °C, 26 °C, 37 °C y 42 °C) durante 5 días. Se descubrió que las temperaturas de 26 °C y 37 °C eran óptimas para el crecimiento de la cepa CECT8538 aislada mientras que no crecía a 4 °C y 42 °C después de 24 h de incubación (véase la Tabla 1). Como se ha descrito anteriormente, basándose en las secuencias de nucleótidos de *rpoD* y *gyrB*, CECT8538 se agrupó como *P. putida* biovariedad A o C. A diferencia de la biovariedad C, la habilidad de las cepas de *P. putida* de la biovariedad A para crecer a 4 °C, es relativamente rara, lo que confirma que la cepa de la invención pertenece a la biovariedad A.

La sensibilidad a los antibióticos se determinó incorporando 15 µg/ml de ácido nalidíxico, 50 µg/ml de cloranfenicol, 50 µg/ml de sulfato de estreptomicina, 50 µg/ml de oxitetraciclina o 50 µg/ml de nitrofurantoína en medio NA. También se determinó la habilidad para crecer en NA que contiene 5 % de NaCl. En todas las condiciones, las placas se incubaron durante 48 horas a 26 °C. *P. putida* CECT8538 fue resistente a 15 µg/ml de ácido nalidíxico y a 50 µg/ml de cloranfenicol. Sin embargo, la cepa de la invención no pudo crecer en NA que contenía 50 µg/ml de sulfato de estreptomicina, 50 µg/ml de oxitetraciclina o NaCl al 5 %. El antibiótico nitrofurantoína mostró un ligero efecto sobre el crecimiento bacteriano a 50 µg/ml (véase la Tabla 1).

Para caracterizar además la cepa de la invención, las actividades enzimáticas se analizaron con un kit API ZYM según los procedimientos descritos por el fabricante (BioMerieux, Lyon Francia). La cepa de la invención presentó las actividades enzimáticas de esterasa (C₄), leucina arilamidasa y fosfatasa alcalina.

Tabla 1. Características fisicoquímicas de *P. putida* CECT8538

Característica	Resultado ^a
Crecimiento a diferentes temperaturas:	
4 °C	-
26 °C	+
37 °C	+
42 °C	-
Crecimiento en NA + NaCl al 5 %	-
Resistencia a antibióticos:	
Ácido nalidíxico (15 µg/ml)	+
Cloramfenicol (50 µg/ml)	+
Sulfato de estreptomicina (50 µg/ml)	-
Oxitetraciclina (50 µg/ml)	-
Nitrofurantoína (50 µg/ml)	d
API ZYM:	
Fosfatasa alcalina	+
Esterasa (C ₄)	+
Esterasa lipasa (C ₈)	-
Lipasa (C ₁₄)	-
Leucina arilamidasa	+
Valina arilamidasa	-
Cistina arilamidasa	-
Tripsina	-
α-Quimotripsina	-
Fosfatasa ácida	-
Naftol-AS-BI- fosfohidrolasa	
α-Galactosidasa	-
β-Galactosidasa	-
API ZYM:	-
β-Glucuronidasa	-
α-Glucosidasa	-
β-Glucosidasa	-
N-Acetil-β-glucosamidasa	-
α-Manosidasa	-
α-Fucosidasa	-

^a (-) negativo; (+) positivo, (d) débilmente positivo

La capacidad de colonización es una característica crucial para que los agentes de control biológico compitan adecuadamente en el entorno de la rizosfera. Para probar esta capacidad de la cepa de la invención, se evaluó su movilidad de enjambre bacteriano. El enjambre es un movimiento multicelular especializado que facilita la colonización coordinada de superficies por bacterias. Resumiendo, se inoculó un precultivo de la cepa de la invención en placas que contenían medio M9 o BM2, y se incubó durante 30 h a 28 °C o a 37 °C (Figura 1). Como se muestra en la Figura 1, la cepa de la invención tiene una alta capacidad de enjambre a 28 °C, pero no a 37 °C. Esto indica que la cepa de la invención es metabólicamente activa a 28 °C, que es la temperatura media del suelo, y que no lo es a 37 °C, que es la temperatura óptima de colonización de los microorganismos patógenos humanos.

Ejemplo 3. Análisis comparativo de la capacidad de crecimiento celular a diferentes pH

Para comparar la habilidad de sobrevivir a diferentes pH dentro de diferentes cepas de *P. putida*, la cepa de la invención, CECT8538, y las cepas de referencia de *P. putida* CECT324 y DSM6125 (KT2440), se cultivaron

previamente en un agitador a 28 °C y a 120 rpm durante la noche. Estos precultivos se sembraron en placas de *Petri* NA con los pH ajustados deseados (véase la tabla 2) y se incubaron durante 24 h a 28 °C. El ajuste del pH se realizó después de la esterilización del medio NA, justo antes de verter el medio en las placas. La Tabla 2 muestra los resultados observados después de 24 h de incubación. La cepa CECT8538 fue la cepa que pudo sobrevivir en un intervalo de pH más amplio en comparación con las otras cepas de *P. putida*, confirmando la alta capacidad de adaptación de la cepa de la invención al medio ambiente.

Tabla 2. Análisis de la capacidad de crecimiento celular de CECT8538 a diferentes pH.

pH	4	5	6	7	8	9	10
CECT8538	+	++	++	++	++	++	+
CECT324	-	+	++	++	++	+	+
DSM6125	-	++	++	++	++	+	+

10 Ejemplo 4. Análisis de producción antimicrobiana por la cepa de la invención.

Ejemplo 4A. Análisis mediante HPLC en busca de pruebas de producción de metabolitos por *P. putida* CECT8538.

15 Los metabolitos antimicrobianos más comunes producidos por *Pseudomonas* spp. son pirrolnitrina, 2,4-DAPG, pioluteorina y fenazinas, que desempeñan un importante papel en el control biológico. Durante la fase de crecimiento logarítmica tardía o estacionaria, *Pseudomonas* spp. puede sintetizar estos metabolitos.

20 Para evaluar la producción de metabolitos de la cepa CECT8538 de *P. putida*, la cepa de la invención se sometió a un proceso de fermentación para crecer. Los cultivos a gran escala se realizaron en un biorreactor industrial F3-100 (modelo F3-industrial, Bionet) con un volumen de trabajo de 100 litros, usando medio de cultivo LB, una temperatura ajustada a 28 °C ± 1 °C, aireación de 8 l/min, oxígeno disuelto a > 50 % y agitado a 200-400 rpm. El cultivo se inoculó al 5 % v/v con un precultivo desarrollado durante 24 horas en un biorreactor de laboratorio F1-5 (modelo F1-lab, Bionet) con los mismos parámetros del biorreactor industrial.

25 Durante la fermentación, todos los parámetros (es decir, temperatura, pH, presión de oxígeno, agitación, velocidad del flujo de aire, nivel de espuma y densidad óptica) se controlaron y se midieron. Una vez finalizada la fermentación, las células se recogieron por centrifugación (Hitachi CR22N), el sobrenadante del cultivo se almacenó a 4 °C y las células se liofilizaron (Heto Power Dry LL 3000) para conservar la viabilidad de la biomasa.

30 Las posibles fracciones metabólicas se analizaron mediante HPLC (sistema eAlliance, Waters). Los cromatogramas se realizaron usando una columna de fase inversa XBridge C18 (5 µm 4,6x150 mm, Waters) eluida (1 ml min⁻¹) con un gradiente lineal de 0-80 % de acetonitrilo en agua durante 15 min. Ambos disolventes contenían ácido trifluoroacético (TFA) al 0,05 %. Los metabolitos se detectaron mediante espectroscopia UV con un detector de matriz de fotodiodos [para la pirrolnitrina, λ = 247 nm y tiempo de retención (t_r) = 14,6 min; para el 2,4-DAPG, λ = 278 nm y t_r = 12,6 min; para la pioluteorina, λ = 308 nm y t_r = 10,6 min; para la piocianina, λ = 278 nm y t_r = 5,5 min].

35 Los cromatogramas de HPLC de las diferentes muestras de la cepa de la invención, se compararon con el cromatograma obtenido de los metabolitos estándar pirrolnitrina, 2,4-DAPG, pioluteorina y piocianina. Los cuatro picos correspondientes de cada metabolito no estaban en los cromatogramas obtenidos de la cepa de la invención.

Ejemplo 4B. Análisis genómico para determinar la habilidad de la cepa de la invención para sintetizar los metabolitos pirrolnitrina, 2,4-DAPG, pioluteorina y piocianina

45 Se realizó un estudio genómico complementario para determinar si la cepa CECT8538 comprendía la maquinaria genética para sintetizar estos metabolitos en otras condiciones particulares de crecimiento/almacenamiento.

50 En primer lugar, se recuperaron las rutas biosintéticas principales de cada metabolito en *Pseudomonas* spp. de la base de datos del NCBI. En la WGS (secuencia hologenómica) de CECT8538 se buscaron los homólogos de las enzimas biosintéticas pirrolnitrina, 2,4-DAPG, pioluteorina y piocianina, y se realizaron alineaciones entre proteínas usando BLASTp. Usando una puntuación en bits como parámetro divisorio y aplicando un umbral de 40, se obtuvo una base de datos que consistía en la traducción informática de los genes previstos del genoma de CECT8538 (5892 genes que codifican proteínas).

55 Las enzimas biosintéticas de pirrolnitrina están codificadas por genes ubicados en el operón *prn*, que incluye *prnA* (que codifica una triptófano halogenasa), *prnB* (que codifica una monodecloroaminopirrolnitrina sintasa), *prnC* (que codifica una halogenasa) y *prnD* (que codifica una aminopirrolnitrina oxigenasa). La cepa CECT8538 de *P. putida* tiene sólo un homólogo de *prnA* procedente del operón *prn*, lo que sugiere que la cepa CECT8538 no es capaz de sintetizar pirrolnitrina (Tabla 3).

60

La ruta biosintética principal del 2,4-DAPG está codificada por genes en el locus *phl*, que incluye *phlA* (que codifica una β -cetoacil-ACP sintasa III), *phlB* (que codifica una supuesta enzima de unión a ácido nucleico), *phlC* (que codifica una enzima de condensación) y *phlD* (que codifica una policétido sintasa de tipo III; PKS). Algunas proteínas PhlD en *Pseudomonas* spp. mostraron un homólogo en CECT8538, pero en la cepa de la invención no se encontraron 5 homólogos de PhlA, PhlB o PhlC (Tabla 3). Por tanto, se deduce que CECT8538 no puede sintetizar 2,4-DAPG.

Los genes biosintéticos de la pioluteorina, en *P. fluorescens* Pf-5, están agrupados en el grupo génico *plt*. Este grupo incluye 10 genes, aunque solo 7 constituyen la ruta biosintética principal de la pioluteorina: *pltF* (que codifica una acil-CoA sintasa), *pltE* (que codifica una acil-CoA deshidrogenasa), *pltA* y *pltM* (ambos codificantes de halogenasas), *pltB* 10 (PKS), *pltC* (PKS) y *pltG* (tioesterasa). De estas 7 proteínas biosintéticas de la pioluteorina, PltF tenía un homólogo en CECT8538; solo en algunas especies/cepas PltA, PltB, PltC, PltE y PltM, mostraron homología con una proteína de CECT8538; y ninguna PltG tenía un homólogo en la cepa de la invención. La PltG de tioesterasa es probablemente responsable de la terminación del ensamblaje de policétidos, por tanto, la ausencia de *pltG* sugiere que CECT8538 no puede sintetizar pioluteorina.

15 Las fenazinas, tales como el ácido fenazin-1-carboxílico (PCA) y la piocianina, son factores de virulencia en *P. aeruginosa*. Ambos estimulan una respuesta inflamatoria neutrofílica y regulan positivamente quimiocinas (IL-8) y moléculas de adhesión (ICAM-1) a través de mecanismos dependientes de oxidantes. La biosíntesis de la piocianina se realiza mediante la acción combinada de la ruta biosintética principal de la fenazina que conduce al PCA y de 20 reacciones biosintéticas específicas de la piocianina que permiten la conversión del PCA en piocianina. Estos dos conjuntos de reacciones son catalizados por enzimas codificadas en dos operones respectivos. Cinco genes del grupo génico *phz* -*phzB/A* (que codifica la cetoesteroide isomerasa; *phzA* que es una copia no funcional de *phzB*), *phzD* (que codifica la isocorismatasa), *phzE* (similar a la antranilato sintasa), *phzF* (que codifica una trans-2,3-dihidro-3-hidroxi-antranilato isomerasa) y *phzG* (que codifica una oxidasa dependiente de flavina)- son estrictamente necesarios 25 para la biosíntesis del PCA, el precursor de la piocianina. Asimismo, la acción de *phzM* y *phzS*, que codifican el PCA metiltransferasa y una hidroxilasa dependiente de flavina, respectivamente, también son estrictamente necesarios para la biosíntesis de la piocianina.

En la base de datos del NCBI hay miles de secuencias de PhzF de *Pseudomonas* spp., de las cuales, 27 corresponden 30 a *P. putida*. CECT8538 tiene una copia de PhzF homóloga a la de otras cepas de *P. putida* (Tabla 3), y la traducción informática de los genes previstos de la secuencia genómica de CECT8538 predice la presencia de una copia de *phzF* en esta cepa. Con respecto a los accesos de PhzA, PhzB y PhzD, las búsquedas se limitaron a accesos correspondientes a *P. putida* y a los correspondientes a genes de referencia en *Pseudomonas* spp. (todos pertenecen a *P. aeruginosa*). El acceso correspondiente a *P. putida* NJ-10 PhzD mostró un homólogo en CECT8538, y lo mismo 35 se observó con proteínas PhzD de *P. aeruginosa* PAO1. Por otro lado, PhzA y PhzB no mostraron homólogos en CECT8538, ni las secuencias de *P. putida* FDAARGOS, ni las de *PAG. aeruginosa* PAO1.

No se encontraron homólogos de PhzE, PhzG, PhzM y PhzS en la base de datos del NCBI de ninguna cepa de *P. putida*. Sin embargo, CECT8538 mostró un homólogo de proteína previsto a PAO1 PhzE de *P. aeruginosa* y dos 40 proteínas de CECT8538 mostraron homología a 3 accesos encontrados para PhzG en *Pseudomonas* spp. Además, mientras que ninguno de los dos genes *phzM* de referencia de *Pseudomonas* spp. (ambos pertenecientes a *P. aeruginosa*) tenía un homólogo en CECT8538, el gen de referencia *phzS* (también de *P. aeruginosa*) tenía un homólogo en la cepa de la invención. Debido a la ausencia de PhzB, una cetoesteroide isomerasa esencial para la biosíntesis del PCA precursor de piocianina y a la ausencia de PhzM, una metiltransferasa necesaria para la biosíntesis 45 de la piocianina, se deduce que CECT8538 no es capaz de sintetizar la piocianina.

Todos estos datos confirman lo que reveló el análisis mediante HPLC e indican que la cepa de la invención no es capaz de producir algunos metabolitos antimicrobianos debido a la ausencia de genes específicos necesarios para su síntesis. La incapacidad de producir estas toxinas, que puede explicar los problemas de resistencia a los antibióticos 50 en patógenos humanos, confiere a la cepa de la invención un perfil adecuado para su uso en el tratamiento de plantas destinadas al consumo humano.

Tabla 3. Homólogos de enzimas biosintéticas pirrolnitrina, 2,4-DAPG, pioluteorina y piocianina

Metabolito	Proteína biosintética	Homólogos ^a	Conclusión
pirrolnitrina	PrnA	23/23	Sí
	PrnB	0/17	NO
	PrnC	0/280	NO
	PrnD	0/14	NO
(continuación)			
Metabolito	Proteína biosintética	Homólogos ^a	Conclusión
2,4-DAPG	PhlA	0/14	NO
	PhlB	0/25	NO
	PhlC	0/250	NO
	PhlD	7/128	?

Pioluteorina	PltA	1/3	?
	PltB	2/3	?
	PltC	2/3	?
	PltE	1/2	?
	PltF	2/2	Sí
	PltG	0/2	NO
	PltM	1/3	?
Piocianina ^b	PhzB/A	0/4	NO
	PhzD	1/1 (2/2)	Sí
	PhzE	NE (2/2)	Sí
	PhzF	23/27 (ND)	Sí
	PhzG	NE (2/3)	?
	PhzM	NE (0/2)	NO
	PhzS	NE (1/1)	Sí

^a Los números indican el número de secuencias con un homólogo en CECT8538 frente al número de búsquedas de secuencias de *Pseudomonas* spp.

^b Para la piocianina, los números indican el número de secuencias con un homólogo en CECT8538 frente al número de búsquedas de secuencias de *P. putida*. Entre paréntesis, se muestra el número de secuencias con un homólogo en CECT8538 frente al número de genes de referencia de *Pseudomonas* spp.

^cNE: No encontrado

Ejemplo 5. Producción a escala industrial de una composición de la invención.

Para la producción a escala industrial de composiciones con la cepa de la invención, se pueden usar las condiciones óptimas de fermentación descritas a continuación, usando un biorreactor del tipo F3-100 en medio líquido, aunque también se pueden usar técnicas basadas en la fermentación en medios sólidos, siendo todos ellos métodos estándar usados en la microbiología industrial.

- Para determinar las condiciones óptimas, se usó un biorreactor F1-F5 con medio 10LLB a 28 °C, pH 7,0, ascenso de pO₂ >50 % y agitación a 200-400 rpm. Se inoculó un cultivo exponencial de *P. putida* CECT8538 al 5 % v/v y se controlaron los parámetros operativos del biorreactor, finalizando el crecimiento en fase estacionaria en 12 h y obteniéndose concentraciones celulares de 2,0x10⁹ UFC/ml. A continuación, el cultivo se centrifugó en una centrífuga Hitachi CR22N a 5000 rpm y las células se recogieron asépticamente. Al final de esta etapa, la biomasa se concentró resuspendiéndola en 500 ml de tampón, obteniendo aproximadamente 1 litro de concentrado de 2,0x10¹⁰ UFC/ml. Posteriormente, al concentrado se le añadió un ingrediente protector osmótico inerte (1 l) y se deshidrató en un liofilizador Heto Power Dry LL 3000 en condiciones estándar durante 72 h, obteniendo aproximadamente 100 g de peso seco (material activo al 50 %), con una concentración de 1,0x10¹¹ UFC/g p.s. En dichas condiciones, se obtiene un producto con una viabilidad celular cercana al 90 %, estable, fácil de almacenar y manipular, que a dosis operativas de 5x10⁷ UFC/ml, permite la preparación de aproximadamente 200 l de un producto listo para aplicar sobre las plantas de cultivo a proteger.
- Posteriormente, el material se envasó en bolsas selladas al vacío y se conservó a 4 °C, lo que mantiene su periodo de validez durante más de un año.

Ejemplo 6. Actividad de control biológico de la cepa CECT8538

25 Ejemplo 6A. Evaluación de la actividad de la cepa de la invención contra *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* en cultivo de patata

La actividad biobactericida se evaluó mediante un método de análisis interno (MA 10 "Determinación de la actividad biocida o bioestática *in vivo*", Futureco Bioscience).

- Se establecieron tres bioensayos independientes con tubérculos de patata para valorar la actividad antagonista del ACB, la cepa CECT8538 de *Pseudomonas putida*, contra *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* (cepa DSM 30184, colección alemana DSMZ, aislada de una planta de patata) el agente causante de la enfermedad bacteriana conocida como "podredumbre blanda bacteriana". Para estos análisis, se seleccionó la variedad de patata "Kennebec" por ser una de las variedades de cultivo más habituales en España. Se evaluaron tres composiciones diferentes formuladas como Principio Activo de Calidad Técnica (PACT; consistente en material liofilizado compuesto por 50 % p/p de células viables y 50 % p/p de sacarosa), formulación en polvo humectable (PH; compuesto por 10 % p/p de PACT, 2 % p/p de sílice precipitada (CAS 1343-98-2), 3 % p/p de carboximetil celulosa (CAS 9004-32-4), 2 % p/p de ácido naftaleno y alquil naftaleno sulfónico, sal de sodio (CAS 68425-94-5), 0,5 % p/p de ácido 2R)-3-(2-hidroxi-3-metoxifenil)-2-[2-metoxi-4-(3-sulfopropil)fenoxi] propano-1-sulfónico (CAS 105859-97-0) y 82,5 % p/p de bentonita (tipo montmorillonita, CAS 1302-78-9)) y formulación dispersable en aceite (DA; compuesta por 10 % p/p de PACT, 1 % p/p de sílice precipitada (CAS 1343-98-2), 20 % p/p de trimetilnonil polietilenglicol (CAS 60828-78-6) y 69 % p/p de aceite de linaza refinado (CAS 68649-95-6)).

- Se desinfectaron aproximadamente 2x2 cm de tubérculos de patata con brotes (lejía comercial al 1,2 %, 5 minutos y después 3 baños con agua destilada), se sembraron y se cultivaron durante cuatro-cinco semanas en sustrato de turba:vermiculita (1:1; v/v) en condiciones de cámara de crecimiento (Fitoclima 20000, ARALAB; 18-20 °C; HR al 60-70 %, 13 h:11 h día:noche; 270-300 PAR). Después de cuatro-cinco semanas, las plántulas se transfirieron a una maceta de 1 l con sustrato de suelo:turba:perlita (2:1:0,5; v/v). Se llevó a cabo en diseño de bloques al azar que consistía en 3 repeticiones por tratamiento, con 4 plantas por repetición (12 plantas por tratamiento). Las sustancias de prueba (PACT, PH o DA) se aplicaron tres veces a lo largo de cada bioensayo. La primera aplicación de prueba (A) se realizó 24 h después del trasplante (6 días antes de la exposición al patógeno) añadiendo sobre el sustrato 20 ml que contenían diferentes concentraciones de las sustancias de prueba (véase la Tabla 4). La inoculación con el patógeno se realizó 7 días después del trasplante añadiendo 20 ml de una suspensión bacteriana patógena (2×10^9 UFC/ml; 4×10^7 UFC/planta) de un precultivo de 24 h por planta. Se realizaron dos aplicaciones más (B y C) con la cepa de la invención, una y dos semanas después de la primera, a razón de 20 ml por planta (B= 7DDA; C=14 DDA; DAA significa "días después del tratamiento A". En los 3 bioensayos, se incluyó un control infectado con el patógeno pero no tratado con la cepa de la invención.
- Las plantas se mantuvieron en condiciones de cámara de crecimiento (Fitoclima 20000, ARALAB) durante 4 semanas (20 °C (día), 18 °C (noche); HR al 60-70 %; 13 h:11 h día:noche; 270-300 PAR) y se regaron todos los días. Veintidós días después del trasplante a las macetas de 1 l, las plantas se clasificaron con respecto a la gravedad de la enfermedad de la podredumbre blanda bacteriana (porcentaje de PBB como lesión vascular necrótica). La eficacia se evaluó midiendo el porcentaje de tallo dañado como podredumbre parda en relación con la longitud total del tallo 7 días después de la última aplicación (7 DDC, días después del tratamiento C).

El porcentaje de eficacia se calculó usando la fórmula de Abbot:

$$\% \text{ de eficacia} = 100 - \frac{(\text{TR} \times 100)}{\text{UNTR}}$$

TR = porcentaje de tallo dañado en la parcela tratada

UNTR = porcentaje de tallo dañado en la parcela no tratada

Tabla 4. Eficacia contra *Erwinia carotova* subsp. *atroseptica* en plantas de patata vc Kennebec en condiciones controladas

ENSAYO	TRATAMIENTO	Concentración UFC/ml *	% de GRAVEDAD	% de EFICACIA/GRAVEDAD
Exp 1	Control		22 %	
	PACT	1,26E+08	11 %	50 %
ENSAYO	TRATAMIENTO	Concentración UFC/ml *	% de GRAVEDAD	% de EFICACIA/GRAVEDAD
Exp 2	Control		57 %	
	PACT	5,40E+07	40 %	30 %
	PH	4,43E+07	32 %	44 %
ENSAYO	TRATAMIENTO	Concentración UFC/ml *	% de GRAVEDAD	% de EFICACIA/GRAVEDAD
Exp 3	Control		41,40 %	
	PACT	5,80E+06	31,50 %	24 %
	DA	2,70E+07	21,00 %	49 %

- Como se muestra en la tabla, la cepa de la invención tiene la capacidad de colonizar cultivos de patata y actuar como un agente de control biológico contra las bacterias *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. Estos datos muestran que la cepa de la invención tiene la capacidad de colonizar una planta infectada y antagonizar las enfermedades causadas en ella por una infección bacteriana.

Ejemplo 6B. Actividad antifúngica *in vitro* de la cepa CECT8538 de *Pseudomonas putida*

- Para valorar la capacidad de control biológico de la cepa de la invención, se analizó *in vitro* su capacidad fitopatógena contra hongos usando la técnica de los alimentos envenenados. Para la evaluación, se seleccionaron 8 hongos, 4 cepas adquiridas de una colección de microorganismos (*Botrytis aclada* CECT 2851, *Rhizoctonia solani* DSMZ 63010, *Pythium ultimum* CECT 20902 y *Sclerotinia sclerotiorum* CECT 2822) y 4 cepas de la colección de cultivos de Futureco Bioscience aisladas de plantas infectadas (cepa H24 de *Sclerotinia sclerotiorum* aislada de lechuga, cepa H827 de *Colletotrichum coccodes* aislada de patata, cepa H828 de *Fusarium oxysporum* aislada de tomate y cepa H830 de *Alternaria porri* aislada de cebolla).

- Como se ha mencionado anteriormente, las pruebas de inhibición fúngica se realizaron contra los fitopatógenos indicados con la técnica de los alimentos envenenados. Resumiendo, la bacteria se cultivó durante la noche en medio LB a 28 °C y 200 rpm. De este cultivo estacionario, una solución del agente de control biológico, CECT8538, se

transfirió asépticamente con una pipeta en agar de patata y dextrosa (APD) templado para alcanzar dos concentraciones bacterianas finales, 3×10^6 y 3×10^7 UFC ml⁻¹. A continuación, el medio se vertió en placas de Petri de 9 cm y, después de la solidificación, se colocaron discos de agar (de 6 mm de diámetro) que contenían micelio desde el borde del crecimiento activo de cultivos de 7 días de las cepas patógenas en el centro de cada placa en una posición invertida para lograr un mayor contacto del micelio con el medio envenenado. Cada tratamiento se realizó por triplicado. Las placas se incubaron a 26 °C en la oscuridad y el crecimiento micelial radial de la colonia fúngica se siguió midiendo el radio más corto y más largo en diferentes días. El ensayo se repitió al menos dos veces para cada patógeno. El efecto de CECT8538 *in vitro* se comparó con el de las placas de control (APD sin la modificación bacteriana).

La cepa de la invención mostró una fuerte actividad antagonista contra todos los patógenos fúngicos analizados (Figura 2). Después de 3 días de incubación, se observaron diferencias en la zona de crecimiento entre los hongos que crecían en APD con la bacteria y control (APD solo) y esta inhibición del crecimiento mejoró cuando se usó la dosis más alta de CECT8538.

Ejemplo 6C. Análisis comparativo de la actividad antagonista de *B. aclada* entre diferentes cepas de *P. putida*.

Botrytis aclada es uno de los agentes causantes de la podredumbre del cuello de la cebolla, y el responsable de las mayores pérdidas en términos de producción. Aunque los síntomas relacionados con la infección por *B. aclada* aparecen durante el almacenamiento de la cebolla, la infección tiene lugar en el campo. Se sabe que algunas cepas de *P. putida*, como WCS3558, pueden inhibir otras especies de *Botrytis* como *B. cinerea*, que afectan a otro tipo de cultivos frutales como la uva.

Los inventores identificaron que la cepa de la invención tenía la capacidad de inhibir el crecimiento de *B. aclada* CECT 2851 (ejemplo 6B), pero no estaba claro si esta capacidad era específica de la cepa de la invención o si otras cepas de *P. putida* podían tener el mismo efecto. Para valorar eso, se realizó un análisis de comparación usando la cepa de la invención y las cepas de referencia CECT324 y DSM6125 (KT2440) de *P. putida*.

Como se ha descrito anteriormente, la capacidad de inhibición del crecimiento se midió con la técnica de los alimentos envenenados y se controló el crecimiento fúngico a los 3, 7 y 10 días (véase la FIG. 3 y la Tabla 5).

La Tabla 5 muestra los resultados finales 10 días después de la inoculación de las cepas de *P. putida*. La cepa de la invención fue la única cepa de *P. putida* que mantuvo un efecto significativo sobre el crecimiento de *B. aclada* después de 10 días de incubación. Las cepas de referencia también tenían la capacidad de inhibir el crecimiento de *B. aclada* 3 días después de la inoculación, pero perdían su efecto después de 7 y 10 días de la inoculación (FIG. 3). Por lo tanto, aunque las tres cepas analizadas tuvieron un efecto inhibitorio al inicio del ensayo, sólo la cepa de la invención tuvo un efecto duradero sobre el crecimiento de *B. aclada*. Asimismo, la cantidad de la cepa de la invención era del mismo orden que la cantidad de las cepas comparativas, y el efecto inhibitorio obtenido con la cepa de la invención mejoró notablemente.

Tabla 5. Análisis comparativo de la inhibición del crecimiento de *B. aclada* con las diferentes cepas de *P. putida* analizadas.

Concentración (ufc/ml)	Cepa	Crecimiento (%)	Inhibición (%)
$3,9 \times 10^7$	CECT8538	16,01	83,99
Concentración (ufc/ml)	Cepa	Crecimiento (%)	Inhibición (%)
$1,2 \times 10^7$	CECT324	83,35	16,65
$2,79 \times 10^7$	DSM6125	100	0

Bibliografía

1. Mora *et al.*, "Antimicrobial peptide genes in Bacillus strains from plant environments", International Microbiology, 2011, vol. 14, págs. 213-223

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> FUTURECO BIOSCIENCE, S.A.

<120> Una cepa de *Pseudomonas putida* y su uso en el control de enfermedades causadas por bacterias y hongos en plantas.

<130> P3878PC00

<150> EP17382188

<151> 06/04/2017

<160> 5

<170> PatentIn versión 3.5

5 <210> 1
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> cebador

15 <400> 1
agtttgatcc tggctcag 18

20 <210> 2
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> cebador

30 <400> 2
acggttacct tgttacgact t 21

<210> 3
<211> 953
<212> ADN
<213> *Pseudomonas putida*

<400> 3

tgcaagtcga gcggatgacg ggagcttgct ccttgattca gcggcggacg ggtgagtaat 60

gcctaggaat ctgcctggta gtgggggaca acgttttcgaa aggaacgcta ataccgcata 120

cgtcctacgg gagaaagcag gggaccttcg ggccttgccg tatcagatga gcctaggctcg 180

gattagctag ttggtggggt aatggctcac caaggcgacg atccgtaact ggtctgagag 240

gatgatcagt cacactggaa ctgagacacg gtccagactc ctacgggagg cagcagtggtg 300

gaatattgga caatgggcga aagcctgacg cagccatgcc gcgtgtgtga agaaggtctt 360

cggattgtaa agcactttaa gttgggagga agggcagtaa gctaatacct tgctgttttg 420

acgttaccga cagaataagc accggctaac tctgtgccag cagccgcggt aatacagagg 480

gtgcaagcgt taatcggaat tactgggcgt aaagcgcgcg taggtggttt gttaagttgg 540

atgtgaaagc cccgggctca acctgggaac tgcattccaaa actggcaagc tagagtacgg 600

tagaggggtg tggaatttcc tgtgtagcgg tgaaatgcgt agatatagga aggaacacca 660

gtggcgaagg cgaccacctg gactgatact gacactgagg tgcgaaagcg tggggagcaa 720

acaggattag ataccctggt agtccacgcc gtaaacgatg tcaactagcc gttggaatcc 780

ttgagatttt agtggcgag ctaacgcatt aagttgaccg cctggggagt acggccgcaa 840

ggttaaaaact caaatgaatt gacgggggcc cgcacaagcg gtggagcatg tggtttaatt 900

35 cgaagcaacg cgaagaacct taccaggcct tgacatgcag agaactttcc aga 953

ES 2 879 322 T3

<210> 4
 <211> 1983
 <212> ADN
 <213> *Pseudomonas putida*

5

<400> 4

atggccgggc tgattcccca gagtttcatt gacgacctga tcaaccgcct cgacatcgtc	60
gacgtggtga gttcgcgcgt ccagctgaaa aaaaccggca agaactactc ggcctgctgc	120
ccgttccaca aagaaaaaac cccgtccttc acggtcagcc ccgacaagca gttctactac	180
tgcttcggct gtggcgccgg tggcaacgcc ttgggctttg tcatggacca cgacaacctg	240
gacttcccc aggccgtcga ggaactggca cgcgcgctg gcatggaagt ccccgcgag	300
caaggccgcc gcgaccagaa gccgcgccag cccactgact cgccactgta cccgctactg	360
gacgccgcct cggagtttta ccgccaggcc ctgcgcagcc acccgtcacg caaggcagcg	420
gtggactacc tcaagggccg cggcctgtcc ggggaaattg cccgcgactt cggcctgggc	480
tttggcccg cgggctggga caacctgtc aagcacctgg gtgccgacac cctgcagcag	540
aaggtgatga tcgatgccg cctgctgatc gagaacgcc agagcgcaa gcgctacgac	600
cgcttcgcg accgggtgat gttcccgata cgtgacagcc gcgggcgcac catcgcttc	660
ggtggccggg tgctcggcga cgacaagccc aagtacctga actccccga aaccccggtg	720
ttccacaagg gacaggagct gtacgggctg tacgaggcgc gcaagcaca cgcgaacctc	780
gacgagatca tcgtcgtcga gggctacatg gacgtcattg ccctggccca gcaaggcctg	840
cgcaatgccg tggccaccct tggcaccgcc accagcgaag agcacctcaa gcgcctgttc	900
cgcgtggtgc ccagcgtgct gttctgtttt gacggtgacc aggctgggcg caaggcggcc	960
tggcgcgcac tggaatcgac attgtcgaac ctgcaggacg gccgtcgcgc gcgcttcctg	1020
ttcctgcccg aaggcgaaga cccggacagc ctggtgcgtg ccgaaggtag cgacgccttc	1080
atggcccgtg tcaaccagca cgcccaaccg ctggccgact acttcttcga gcaacttggc	1140
gtcgaagccg acccgcgctc actggaaggc aaggcgcata tggcgacctt ggccgcaccg	1200
ttgatcgaaa agatccccgg cgccaacctg cgtcagctga tgcgcaaccg cctgaaggaa	1260

ES 2 879 322 T3

atcaccggcc	tcgacccgca	gcaggtcgag	cagttggcgc	agcaagcgcc	ggcgaccagc	1320
agcatgccgg	actacgaccc	tggctacgat	tacgacgcca	tggccagcta	cacccccgac	1380
tatggcgaca	tgccgcagca	cgactatgcc	cccgttcac	aggagcaggc	atggaaaccc	1440
aacaaggggg	gcagcaagaa	gccgtggagc	gacaaaccct	gggataagaa	ccgcaagggc	1500
ggtaagccct	ggcagcaacg	cgacgaagca	cctccccgcg	tgccagcacc	ggtcgagccg	1560
cccaccctgg	ccgccctgcg	caccctgctg	caccacccac	tgctggccgg	caaggtggaa	1620
gatgccagcc	acttcgccga	cgaagaacac	ctgtacagcc	agctgctggg	ggcactgatc	1680
gaagccgcgc	agaaaaatcc	tgggctaagc	tcaatgcagt	tgatcgcacg	ttggcatggc	1740
accgaacagg	gccgcctgct	acgggccctg	gcggaaaagg	aatggccttat	cgtggccgac	1800
aaccttgaac	aacagttttt	cgacactata	actagcttgt	ccgcccgcca	acgcgagcgc	1860
agcctggaac	aactgctcag	gaaatcacgt	caaagcgaat	tgaccagcga	ggaaaaaacc	1920
cagctcctcg	ccctgctgag	ccgaaatggt	cccgcacaaa	cgccgacctc	atctggcgcg	1980
tga						1983

<210> 5
 <211> 639
 <212> ADN
 <213> *Pseudomonas putida*

> 5

atgacagtac	gaaaggtggt	cacgcggcgg	tccaaccatt	accgcggcta	cttcccatcg	60
ctcaaaaata	aaaagcctgt	gccctgggag	tcccagctcg	aaggcgctct	ttttcggttt	120
cttgagctgt	ctcctgcggg	catcggctac	gtcccgcagc	ccagtgagga	acgtgttcca	180
tcgctccagg	gctacttcaa	atattaccca	gacgtacagg	ttttcctcgc	ggatgggcgc	240
gagtggtggt	ttgaagtga	gcctcacgac	cgactgaaga	ttgccagcgt	caggcagcga	300
ctggatgccg	ctgagcgcta	cttcaacgcc	actgcccgt	acttttcggt	gatcactgaa	360
aagttaattg	aagctgaacc	cctggctacc	aatcttagaa	ggctgatgta	tcaccggcgc	420
ggccagagc	tttcgcatca	ggcgttggag	gaggtaatgg	cgaccttcaa	cgaatggccg	480
cctatgaccg	ttgcagatct	gctctacgtg	gttggtgagg	ggaaagcctg	gcgcttggt	540
ggccttgggg	tgggtgggcat	tgaccttgat	aggtcaattg	acactgactc	cccgtctctc	600
ctgcaagggg	ggcaccgtca	tgcaaacctt	ttcccttag			639

REIVINDICACIONES

1. Una cepa de *Pseudomonas putida* depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con el número de registro CECT8538, o una mutante de la misma, en donde dicha cepa mutante se obtiene usando la CECT8538 de *Pseudomonas putida* y mantiene las siguientes características de la cepa de partida:
 - actividad antagonista de la cepa de partida contra *Erwinia carotovora* subsp *atroseptica*, *Botrytis aclada*, *Pythium ultimum*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Colletotrichum coccodes*, *Fusarium oxysporum* y *Alternaria porri*; y;
 - habilidad de colonizar o sobrevivir en una parte aérea o en las raíces de una planta.
2. Uso de la cepa CECT8538 de *Pseudomonas putida* o de una mutante de la misma como se define en la reivindicación 1, como pesticida en plantas.
3. El uso de acuerdo con la reivindicación 2, para controlar una enfermedad causada por una bacteria o un hongo en una planta.
4. Un procedimiento para obtener una suspensión celular viable derivada de la cepa CECT8538 de *Pseudomonas putida* o de una mutante de la misma como se define en la reivindicación 1, comprendiendo el procedimiento: (i) inocular la cepa en un medio de cultivo, (ii) someter el medio de cultivo inoculado de la etapa (i) a condiciones adecuadas para el crecimiento de la cepa, y (iii) someter opcionalmente el medio resultante de la etapa (ii) a una etapa de concentración
5. Un producto de inoculación que comprende la cepa definida en la reivindicación 1.
6. Una composición que comprende la cepa CECT8538 de *Pseudomonas putida* o una mutante de la misma como se define en la reivindicación 1, o un producto de inoculación como se define en la reivindicación 5, y uno o más compuestos agrícolamente aceptables.
7. La composición de acuerdo con la reivindicación 6, en donde el uno o más compuestos agrícolamente aceptables se seleccionan del grupo que consiste en nutrientes, agentes humectantes, compuestos que mejoran la adherencia, compuestos tamponantes, estabilizantes, antioxidantes, protectores osmóticos, filtros solares y fortificantes para plantas.
8. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 a 7, que comprende al menos un pesticida adicional.
9. La composición de acuerdo con la reivindicación 8, en donde el pesticida adicional se selecciona del grupo que consiste en una cepa bacteriana con actividad antifúngica y/o antibacteriana, un fungicida, un bactericida, un herbicida, un insecticida o un nematocida.
10. Uso de la cepa como se define en la reivindicación 1, o el producto de inoculación como se define en la reivindicación 5, o la composición como se define en cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, como pesticida en una planta.
11. El uso de acuerdo con la reivindicación 10, para el control de patógenos fúngicos y bacterianos en una planta.
12. Un método para controlar una infección causada por un patógeno bacteriano o fúngico en una planta, que comprende aplicar la cepa o una mutante de la misma como se define en la reivindicación 1, o el producto de inoculación como se define en la reivindicación 5, o la composición como se define en cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, a la parte afectada de la planta y/o a la semilla o al sustrato o al suelo usado para cultivar dicha planta.

FIG. 1

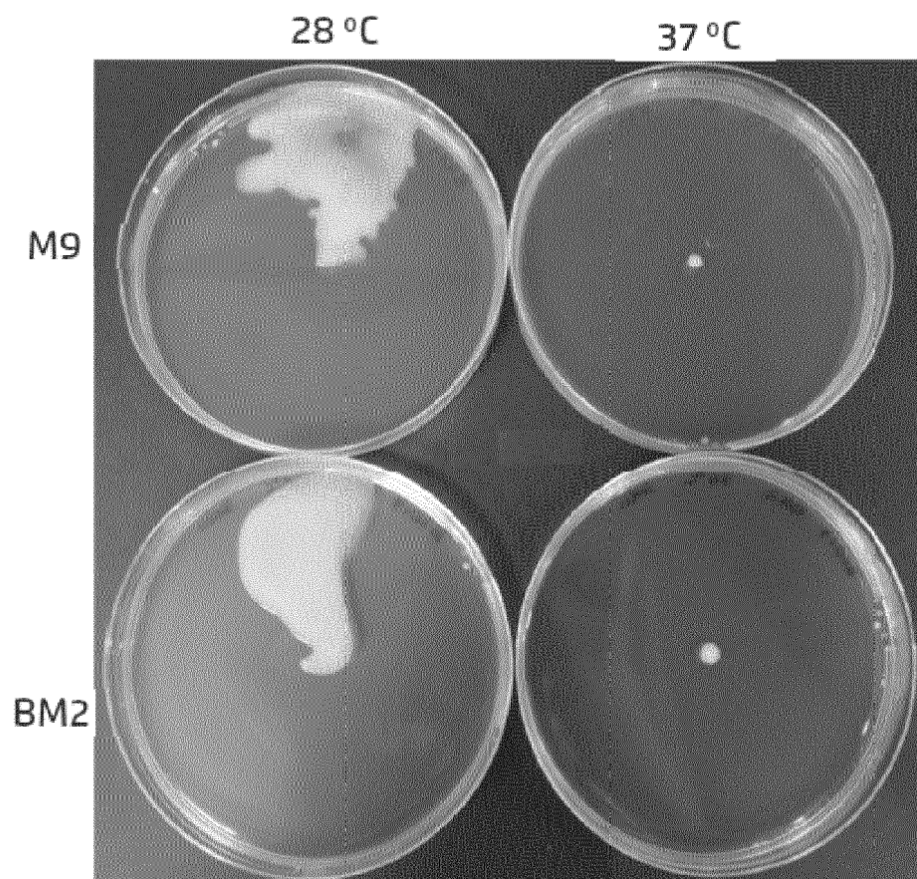


FIG. 2

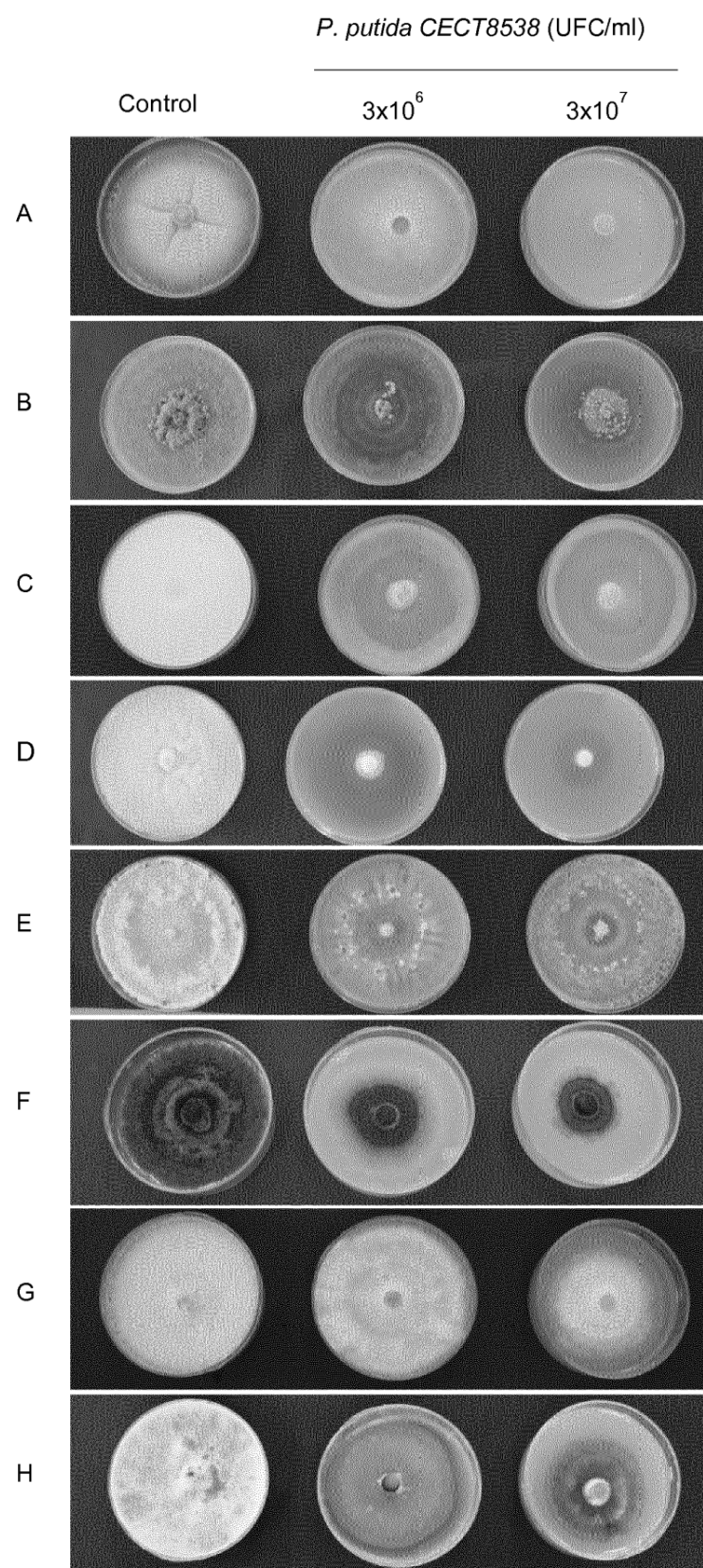
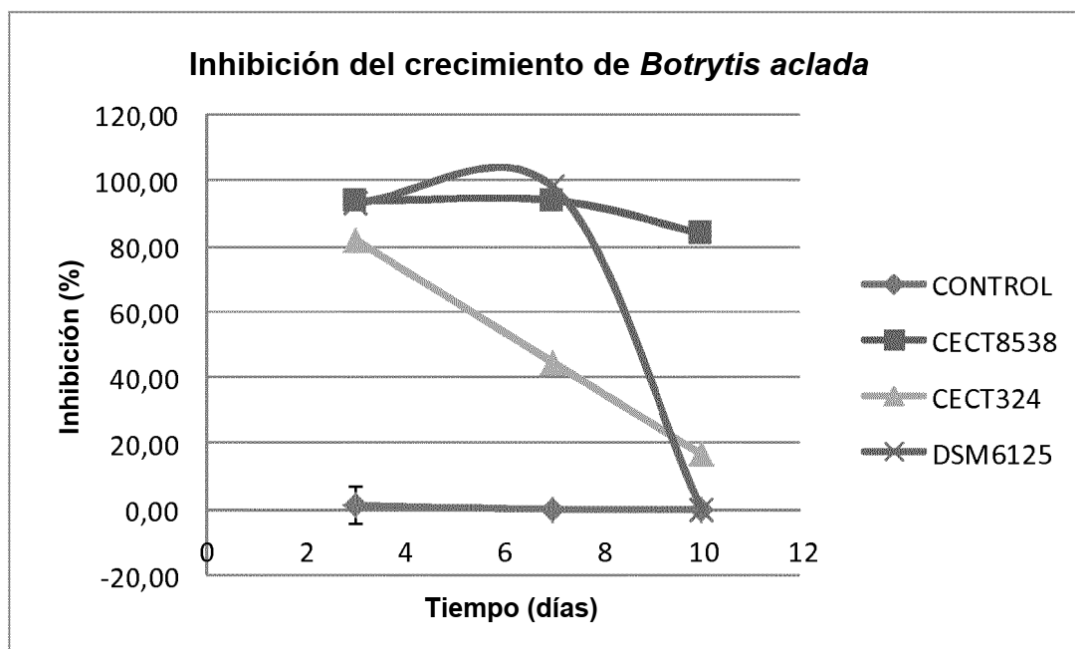


FIG. 3



REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Esta lista de referencias citadas por el solicitante es únicamente para la comodidad del lector. No forma parte del documento de patente europea. A pesar del cuidado tenido en la recopilación de las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la EPO niega toda responsabilidad en este sentido.

Documentos de patente citados en la descripción

- WO 2013150422 A [0006]
- EP 1241247 A [0006]
- WO 9905257 A [0006]
- EP 17382188 A [0090]

Bibliografía no de patente citada en la descripción

- Mutagenesis. **SAMBROOK, J.;** **RUSSELL, D.W.** Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, 2001 [0034]
- **MORA et al.** Antimicrobial peptide genes in Bacillus strains from plant environments. *International Microbiology*, 2011, vol. 14, 213-223 [0048] [0089]
- *CHEMICAL ABSTRACTS*, 1343-98-2 [0077]
- *CHEMICAL ABSTRACTS*, 9004-32-4 [0077]
- *CHEMICAL ABSTRACTS*, 68425-94-5 [0077]
- *CHEMICAL ABSTRACTS*, 105859-97-0 [0077]
- *CHEMICAL ABSTRACTS*, 1302-78-9 [0077]
- *CHEMICAL ABSTRACTS*, 60828-78-6 [0077]
- *CHEMICAL ABSTRACTS*, 68649-95-6 [0077]