



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 343 163**

51 Int. Cl.:

C12N 1/20 (2006.01)

A01N 63/00 (2006.01)

A01C 1/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **00987214 .4**

96 Fecha de presentación : **04.11.2000**

97 Número de publicación de la solicitud: **1234020**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **28.08.2002**

54 Título: **Tratamiento de semillas y plantas con bacterias útiles.**

30 Prioridad: **29.11.1999 DE 199 57 378**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
26.07.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
26.07.2010

73 Titular/es: **Sourcon-Padena GmbH & Co. KG.**
Hechinger Strasse 262
72072 Tübingen, DE

72 Inventor/es: **Vogt, Wolfgang**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

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

Tratamiento de semillas y plantas con bacterias útiles.

5 La presente invención se refiere al tratamiento de semilla y plantas con bacterias del género *Pseudomonas*, así como a una nueva especie del género *Pseudomonas* especialmente adecuada para esto.

Por el documento DE 197 39 364 A1 ya se conoce un procedimiento para reforzar y para proteger plantas en el que se usan microorganismos del género *Pseudomonas*.

10 En el procedimiento conocido se introduce al menos un inductor de resistencia junto con un microorganismo útil en el suelo nutriente de las plantas o en las semillas de la planta, presentando el inductor de resistencia y el microorganismo un efecto positivo complementario sobre la planta.

15 Como ejemplo de un microorganismo útil se menciona la cepa *Pseudomonae sp.* Ps1 de la especie *Pseudomonas fluorescens* que está depositada en la DSMZ.

20 En este documento se describe además un procedimiento sobre cómo puede aislarse un microorganismo útil de este tipo de la tierra y las raíces. En este procedimiento, una serie de dilución de tierra y raíces se siembra en placa, se incuba y se prueba para las colonias fluorescentes con las que luego se realiza un cribado contra hongos nocivos. Una cepa encontrada según el procedimiento conocido se investiga a continuación para ver en qué medida puede combinarse con inductores de resistencia. De esta manera se encontró la cepa *Pseudomonae sp.* PS1.

25 Sin embargo, los experimentos del solicitante de la presente solicitud ha dado como resultado que el tratamiento descrito en el documento mencionado al principio todavía no es satisfactorio, lo que se atribuye entre otras cosas a que deben usarse costosos inductores de resistencia junto con el microorganismo descrito, resultando además que frecuentemente la acción protectora no es satisfactoria.

30 Por el documento US 2.932.128 se conoce un procedimiento para el tratamiento de semilla en el que la semilla se humedece con una solución de bacterias y luego se expone a una presión negativa para impregnar la semilla.

En vista de lo anterior, el objetivo de la presente invención se basa en proporcionar nuevas soluciones y procedimientos, así como un nuevo microorganismo para el tratamiento de semilla y/o plantas.

35 Según la invención, este objetivo se alcanza especialmente, por una parte, mediante una cepa de *Pseudomonas* con el nombre Proradix que se depositó el 03/11/1999 con el número de entrada *Pseudomonas sp.* PRORADIX - DSM 13134 en la DSMZ, 38124 Braunschweig, según el Tratado de Budapest.

40 El inventor de la presente solicitud ha aislado la cepa de *Pseudomonas proradix* que después de ser investigada por la DSMZ probablemente representa una nueva especie dentro del grupo I de ARN de las Pseudomonadaceae. Sin embargo, no pudo realizarse una clasificación definitiva de Proradix ya que sólo existe una similitud de secuencias relativamente baja con especies válidamente descritas del género *Pseudomonas*.

45 Los ensayos de campo con la especie Proradix han mostrado que a este respecto se trata de una bacteria útil que coloniza las raíces de plantas útiles y desde allí puede desarrollar su acción sobre las plantas. A este respecto se ha mostrado que es suficiente una aplicación por periodo de vegetación y que puede renunciarse a inductores de resistencia adicionales.

50 Proradix puede usarse en una formulación como desinfectante líquido o como polvo y es adecuado para el tratamiento de semillas de hortalizas, especialmente de lechuga y zanahorias, de semillas de césped y semillas de plantas leñosas. Además, puede usarse en semillas de abono verde para la mejora biológica del suelo y la descontaminación, así como para desinfectar y para el tratamiento por inmersión de patatas. En todas estas aplicaciones Proradix ha mostrado una mejora de la calidad en comparación con grupos de control sin tratar, así como parcialmente también en comparación con fungicidas químicos.

55 La invención se consigue además esencialmente mediante un procedimiento para la preparación de una solución para el tratamiento de plantas y/o semilla con las etapas de:

- 60 a) Proporcionar una cepa aislada de bacterias del género *Pseudomonas* que presentan la cepa de *Pseudomonas proradix*,
- b) Proporcionar un medio de cultivo en el que están contenidos compuestos de fósforo y de nitrógeno, así como ácido succínico,
- 65 c) Inocular el medio de cultivo con la cepa aislada, e
- d) Incubación del medio de cultivo a aproximadamente 26-32°C con agitación suave durante al menos 50 horas.

El inventor ha observado que una solución preparada de esta forma conduce a un acondicionamiento de las bacterias útiles que contribuye a una acción protectora mejorada en las plantas tratadas con ella/la semilla tratada con ella. Este acondicionamiento consiste según la estimación provisional del inventor en la inducción de la formación de exopolisacáridos debido a los productos de degradación de ácido succínico. Los exopolisacáridos son una sustancia protectora que forman una mucosa por la que las bacterias pueden almacenarse especialmente bien sobre la semilla/las plantas.

A este respecto se prefiere especialmente que el medio de cultivo de las bacterias contenga K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , $(NH_4)_2SO_4$, $MgSO_4$ y ácido succínico estando contenidos preferiblemente 6,0 g de K_2HPO_4 , 3,0 g de KH_2PO_4 , 1,0 g de $(NH_4)_2SO_4$, 0,2 g de $MgSO_4$ y 4,0 g de ácido succínico en 1000 ml de H_2O desionizada.

El inventor ha observado que en este medio se forman de manera especialmente rápida exopolisacáridos, no siendo la densidad celular para el tratamiento de semilla en una solución preparada según este procedimiento tan decisiva como el acondicionamiento previamente mencionado.

Por otra parte, se prefiere que el medio de cultivo contenga glucosa, estando contenidos preferiblemente 6,0 g de K_2HPO_4 , 3,0 g de KH_2PO_4 , 1,5 g de $(NH_4)_2SO_4$, 0,2 g de $MgSO_4$, 2,0 g de glucosa y 4 g de ácido succínico en 1000 ml de agua desionizada.

En esta composición del medio de cultivo puede alcanzarse una mayor densidad celular porque está presente una fuente de C en mayor concentración. Sin embargo, el inventor ha observado que sólo debido a la glucosa en el medio de cultivo se formó rápidamente un valor de pH ácido que no hizo posible otro cultivo.

Por esto se elige una mezcla de glucosa y ácido succínico como fuente de C de manera que primero reacciona la glucosa, por lo que se forma una alta densidad celular, pero un valor de pH más bajo. Después del consumo de la glucosa, el ácido succínico reacciona, por lo que sube el valor de pH de manera que resulta una supervivencia, pero un crecimiento más lento, de bacterias. Esto conduce a la formación de exopolisacáridos ya mencionada con la acción mejorada asociada de los microorganismos cultivados en una solución de este tipo.

A este respecto se usa una cepa aislada de la especie Proradix.

La invención se refiere además a una solución preparada según el procedimiento descrito a este respecto que presenta bacterias del género *Pseudomonas* en un medio de cultivo en el que están contenidos compuestos de fósforo y de nitrógeno, así como ácido succínico. Según una configuración preferida, el medio de cultivo contiene K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , $(NH_4)_2SO_4$, $MgSO_4$ y ácido succínico. Según otra configuración preferida, el medio de cultivo contiene glucosa. Según otra configuración preferida, el medio de cultivo contiene 6,0 g de K_2HPO_4 , 3,0 g de KH_2PO_4 , 1,0 g de $(NH_4)_2SO_4$, 0,2 g de $MgSO_4$ y 4,0 g de ácido succínico en 1000 ml de agua desionizada. Según otra configuración preferida, el medio de cultivo contiene 6,0 g de K_2HPO_4 , 3,0 g de KH_2PO_4 , 1,5 g de $(NH_4)_2SO_4$, 0,2 g de $MgSO_4$, 2,0 g de glucosa y 4,0 g de ácido succínico en 1000 ml de agua desionizada. A este respecto, en el caso de la bacteria del género *Pseudomonas* se trata de la cepa *Pseudomonas* con el nombre Proradix que se depositó el 03/11/1999 con el número de entrada PRORADIX - DSM 13134 en la DSMZ, 38124 Braunschweig, según el Tratado de Budapest.

Por otra parte, también es posible secar la solución al vacío, lo que resulta después especialmente ventajoso si el medio de cultivo contiene glucosa de manera que el polvo formado contiene una alta densidad de bacterias. Este polvo puede disolverse luego en agua al usarlo en el campo, pudiendo usarse el agua así tratada para pulverizar la semilla, patatas, etc.

En vista de lo anterior, la presente invención también se refiere a un polvo preparado de esta forma que presenta bacterias del género *Pseudomonas* y dado el caso coadyuvantes de formulación con leche desnatada en polvo y goma arábiga, tratándose en el caso de la bacteria del género *Pseudomonas* de la cepa de *Pseudomonas* con el nombre Proradix que se depositó el 03/11/1999 con el número de entrada PRORADIX - DSM 13134 en la DSMZ, 38124 Braunschweig, según el Tratado de Budapest.

Además, la invención se refiere a un procedimiento para el tratamiento de semilla en el que con la nueva solución la semilla humedecida se expone temporalmente a una presión negativa.

El inventor de la presente solicitud ha observado concretamente que las bacterias de la especie Proradix acondicionadas especialmente según el nuevo procedimiento son adecuadas para un tratamiento al vacío de semilla y conducen a resultados protectores excelentes.

Por otra parte, la invención también se refiere a un procedimiento en el que la semilla/las plantas se pulverizan con una solución del nuevo polvo en agua. Este sencillo procedimiento también conduce a una protección eficaz de las plantas tratadas.

Finalmente, la invención todavía se refiere al uso de la cepa de *Pseudomonas proradix* para el tratamiento de plantas, así como semilla, que se trató según el nuevo procedimiento o según el nuevo uso y contiene la cepa de *Pseudomonas proradix*.

ES 2 343 163 T3

Otras ventajas resultan de la siguiente descripción de ejemplos del cultivo y el uso del nuevo procedimiento, así como de la especie *Proradix*.

Se entiende que las características anteriormente mencionadas y las que todavía van a explicarse más adelante no sólo pueden usarse en las combinaciones respectivamente especificadas, sino también en otras combinaciones o solas, sin abandonar el marco de la presente invención.

Ejemplo 1

Aislamiento de la especie Proradix

Se suspendieron muestras de tierra y raíces y se sembraron en series de dilución sobre un medio selectivo de manera que se obtuvieron colonias individuales. Las colonias fluorescentes se usaron para un cribado *in vitro* en el que más de 500 cepas aisladas se probaron para ver la inhibición del crecimiento de hongos fitopatógenos, especialmente el hongo del suelo *Rhizoctonia*. Se eligieron candidatos interesantes, se probaron en plantas, así como a continuación en el ensayo de campo.

En estas pruebas, el inventor de la presente solicitud ha aislado la especie *Proradix* (DSM 13134) del género *Pseudomonas* que según la identificación de la DSMZ es una nueva especie dentro del grupo I de ARN de las *Pseudomonadaceae*. Sin embargo, no pudo realizarse una clasificación definitiva ya que sólo existe una similitud de secuencias relativamente baja con especies válidamente descritas, sin embargo se trata sin duda de un representante fluorescente del grupo I de ARN de las *Pseudomonas*.

Ejemplo 2

Cultivo de la cepa aislada

a) Para el tratamiento de semilla, una cepa aislada de *Pseudomonas*, preferiblemente de la especie *Proradix*, se inocula en el siguiente medio de cultivo:

K_2HPO_4	6,0 g
KH_2PO_4	3,0 g
$(NH_4)_2SO_4$	1,0 g
$MgSO_4$	0,2 g
Ácido succínico	4,0 g

enrasado hasta 1.000 ml con H_2O desionizada.

El medio de cultivo inoculado se incubó a 28°C/100 rpm durante 72 horas, se forma un “desinfectante líquido”.

b) Para producir una formulación en polvo, una cepa aislada de *Pseudomonas*, preferiblemente de la especie *Proradix*, se cultiva en el siguiente medio de cultivo:

K_2HPO_4	6,0 g
KH_2PO_4	3,0 g
$(NH_4)_2SO_4$	1,5 g
$MgSO_4$	0,2 g
Glucosa	2,0 g
Ácido succínico	4,0 g

enrasado hasta 1.000 ml con H_2O desionizada.

El medio de cultivo así inoculado se incubó a 28-30°C/100 rpm dependiendo de la concentración del inóculo durante 65-70 horas.

A continuación, la solución se pulveriza en una estufa de secado al vacío. Coadyuvantes de formulación: leche desnatada en polvo y goma arábiga.

c) La formación de exopolisacáridos se induce por ambos medios de cultivo, realizándose esta formación muy rápidamente en el medio de cultivo descrito en a) cuya densidad celular no es aquí decisiva ya que para el tratamiento de semilla no se necesitan grandes cantidades de bacterias.

Sin embargo, en el medio descrito en b) se necesita una alta densidad celular, debiendo inducirse no obstante la formación de exopolisacáridos. Esto se consigue mediante la mezcla de glucosa y ácido succínico. Primero reacciona la glucosa, lo que conduce a una reducción del valor de pH, pero a una alta densidad celular. Cuando la glucosa se ha consumido, el ácido succínico se usa como fuente de C, conduciendo sus productos de degradación a un aumento del valor de pH y a una formación de exopolisacáridos.

Ejemplo 3

Tratamiento de semilla con Proradix

Una posibilidad de tratamiento consiste en disolver en agua el polvo preparado según el Ejemplo 2b) y pulverizar con él la semilla o las plantas jóvenes antes de plantarse.

Además, también es posible pulverizar la solución preparada con el medio de cultivo descrito en el Ejemplo 2a) directamente sobre la semilla/plantas antes de plantarse.

Si la semilla tratada todavía debe almacenarse temporalmente, inicialmente se humedece con la solución descrita en el Ejemplo 2a), luego se introduce en una cámara que puede cerrarse en la que luego se produce temporalmente una presión negativa.

De esta manera, las bacterias penetran en la semilla y todavía pueden desarrollar eficazmente su acción protectora incluso después de un almacenamiento prolongado.

Ejemplo 4

Tratamiento de plantas jóvenes de lechuga de la variedad Garunda

Sobre plantas jóvenes de la variedad Garunda que deberán plantarse en una hectárea de tierra de cultivo se vierte una solución de 50 ml de Proradix (10^7 ufc/ml) por planta (según el Ejemplo 2b) antes de plantarse las plantas jóvenes en el campo.

Después de la cosecha, sólo el 50% de las plantas no eran comercializables, mientras que en los controles sin tratar el 70% de las plantas recolectadas no eran comercializables.

En un tratamiento realizado para la comparación con los fungicidas químicos Switsch (NOVARTIS) (0,8 kg/ha) y Risolex (Spiess Urania) (3 l/ha), el 58 o el 48% no eran comercializables.

Este resultado muestra que la lechuga es claramente menos susceptible a la roña negra mediante el tratamiento con Proradix, siendo los resultados al menos tan buenos como en el tratamiento con fungicidas químicos.

Ejemplo 5

Tratamiento de patatas

Proradix se formula en forma de polvo como se describe en el Ejemplo 2b) y el polvo se disuelve en agua del siguiente modo:

60 g de polvo en 80 l de agua

para 1 ha de patatas de siembra

60 g de polvo = 4×10^{12} ufc

Los tubérculos de patata se pulverizan automáticamente con esta solución y a continuación se plantan directamente. Alternativamente, los tubérculos de patata se espolvorean directamente con el polvo.

Los experimentos comparativos entre patatas sin tratar (control), tratadas con Proradix y con FZB24 (Bayer Leverkusen, base: *Bacillus subtilis*) dieron aproximadamente la misma cosecha por hectárea de productos comerciales. Sin embargo, la calidad mostró en un tratamiento con Proradix una protección eficaz contra la enfermedad de manchas negras (infestación por *Rhizoctonia*), aproximadamente el 45% de las patatas recolectadas estaban sin infestación y otro aproximadamente el 45% con una ligera infestación. En el grupo de control, los números correspondientes ascendieron al 10% y al 50%, con FZB24 al 25% y al 50%.

Aquí también se muestra la superioridad de Proradix en comparación con productos fitosanitarios convencionales.

ES 2 343 163 T3

Ejemplo 6

Tratamiento de zanahorias lavadas

5 La semilla de zanahorias se humedece como se describe en el Ejemplo 3 con desinfectante de Proradix del Ejemplo 2a) y se trata al vacío (infiltración en la semilla), se almacena temporalmente y se siembra.

10 Las zanahorias recolectadas se almacenaron durante cuatro meses a 4°C, luego - como es habitual en la venta - se almacenaron dos semanas a temperatura ambiente y finalmente se evaluaron.

La calidad demostró el 50% sin imperfecciones en la variedad Nerac (control sin tratar: 18%) y el 27% de zanahorias inservibles (control: 58%). En la variedad Mocum, los números ascendieron al 36% (control: 14%) o al 46% (control: 54%).

15 El tratamiento de zanahorias lavadas con Proradix también condujo a un claro aumento de la calidad de la cosecha.

En resumen, también puede decirse que para el tratamiento de plantas y/o semilla se proporciona una cepa aislada de bacterias útiles, preferiblemente del género *Pseudomonas*, preferiblemente de la especie *Proradix*, y se incuba en un medio de cultivo que contiene compuestos de fósforo y de nitrógeno, así como ácido succínico. La solución puede usarse inmediatamente para pulverizar plantas y/o semilla, pudiendo conectarse posteriormente opcionalmente un tratamiento al vacío. Además, la solución puede secarse al vacío, disolviéndose el polvo en agua antes de la aplicación.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Cepa de *Pseudomonas* con el nombre Proradix que se depositó el 03/11/1999 con el número de entrada PRORADIX - DSM 13134 en la DSMZ, 38124 Braunschweig, conforme al Tratado de Budapest.

2. Procedimiento para la preparación de una solución para el tratamiento de plantas y/o semilla con las etapas de:

- a) Proporcionar una cepa aislada de bacterias del género *Pseudomonas*
- b) Proporcionar un medio de cultivo que contenga compuestos de fósforo y de nitrógeno, así como ácido succínico,
- c) Inocular el medio de cultivo con la cepa aislada, e
- d) Incubación del medio de cultivo aproximadamente a 26-32°C con agitación durante al menos 50 horas.

caracterizado porque las bacterias presentan la cepa de *Pseudomonas* según la reivindicación 1.

3. Procedimiento según la reivindicación 2, **caracterizado** porque el medio de cultivo contiene K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , $(NH_4)_2SO_4$, $MgSO_4$ y ácido succínico.

4. Procedimiento según la reivindicación 2 ó 3, **caracterizado** porque el medio de cultivo contiene glucosa.

5. Procedimiento según la reivindicación 3, **caracterizado** porque el medio de cultivo contiene 6,0 g de K_2HPO_4 , 3,0 g de KH_2PO_4 , 1,0 g de $(NH_4)_2SO_4$, 0,2 g de $MgSO_4$ y 4,0 g de ácido succínico en 1.000 ml de agua desionizada.

6. Procedimiento según la reivindicación 4, **caracterizado** porque el medio de cultivo contiene 6,0 g de K_2HPO_4 , 3,0 g de KH_2PO_4 , 1,5 g de $(NH_4)_2SO_4$, 0,2 g de $MgSO_4$, 2,0 g de glucosa y 4,0 g de ácido succínico en 1000 ml de agua desionizada.

7. Procedimiento según la reivindicación 6, **caracterizado** porque la solución se seca al vacío después de la incubación para preparar un polvo.

8. Solución para el tratamiento de plantas y/o semilla que presenta bacterias del género *Pseudomonas* en un medio de cultivo que contiene compuestos de fósforo y de nitrógeno, así como ácido succínico, **caracterizada** porque las bacterias presentan la cepa de *Pseudomonas* según la reivindicación 1.

9. Solución según la reivindicación 8, **caracterizada** porque el medio de cultivo contiene K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , $(NH_4)_2SO_4$, $MgSO_4$ y ácido succínico.

10. Solución según la reivindicación 8 ó 9, **caracterizada** porque el medio de cultivo contiene glucosa.

11. Solución según la reivindicación 10, **caracterizada** porque el medio de cultivo contiene 6,0 g de K_2HPO_4 , 3,0 g de KH_2PO_4 , 1,0 g de $(NH_4)_2SO_4$, 0,2 g de $MgSO_4$ y 4,0 g de ácido succínico en 1.000 ml de agua desionizada.

12. Solución según la reivindicación 11, **caracterizada** porque el medio de cultivo contiene 6,0 g de K_2HPO_4 , 3,0 g de KH_2PO_4 , 1,5 g de $(NH_4)_2SO_4$, 0,2 g de $MgSO_4$, 2,0 g de glucosa y 4,0 g de ácido succínico en 1.000 ml de agua desionizada.

13. Polvo para el tratamiento de plantas y/o semilla que presenta la cepa de *Pseudomonas* según la reivindicación 1.

14. Polvo según la reivindicación 13, **caracterizado** porque el polvo presenta coadyuvantes de formulación.

15. Polvo según la reivindicación 14, **caracterizado** porque los coadyuvantes de formulación presentan leche desnatada en polvo y goma arábica.

16. Procedimiento para el tratamiento de semilla/plantas con las etapas de:

- a) Humedecer la semilla/las plantas con la solución según una de las reivindicaciones 8 a 12,
- b) Aplicar una presión negativa a la semilla así humedecida/las plantas así humedecidas, y
- c) suprimir la presión negativa.

17. Procedimiento para el tratamiento de semilla/plantas con las etapas de:

- a) Disolver el polvo según una de las reivindicaciones 13 a 15 en agua, y

ES 2 343 163 T3

b) Pulverizar o tratar mediante inmersión la semilla/las patatas de siembra o verter sobre las plantas jóvenes la solución de la etapa a).

18. Uso de la cepa de *Pseudomonas proradix* de la reivindicación 1 para el tratamiento de plantas y/o semilla.

5

19. Semilla tratada según el procedimiento de la reivindicación 16 o la reivindicación 17 o según el uso de la reivindicación 18 que contiene la cepa de *Pseudomonas* de la reivindicación 1.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65