

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
16 de diciembre de 2010 (16.12.2010)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2010/142055 A2

(51) Clasificación Internacional de Patentes:
A01N 63/00 (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/CL2010/000021

(22) Fecha de presentación internacional:
10 de junio de 2010 (10.06.2010)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
1395-2009 11 de junio de 2009 (11.06.2009) CL

(71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US): **BIO INSUMOS NATIVA LIMITADA** [CL/CL]; Chacra el Peral, Lote A 1, San Javier (CL).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): **ESCOBAR VALDES, Paulo Andrés** [CL/CL]; Loteo Lomas de Rauquén, Sitio 4-A, Pencahue, Talca (CL). **LOBOS PRATS, Gustavo Adolfo** [CL/CL]; Fundo Santa Cecilia s/n, San Javier (CL). **DONOSO CUEVAS, Eduardo Patricio** [CL/CL]; Parque las Rastras 6, 1/2 Norte n° 3512, Talca (CL).

(74) Mandatario: **PAIVA HANTKE, Gabriela Fresia Lorena**; Mardoqueo Fernández 128, Oficina 1001, Providencia, Santiago, 7510059 (CL).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR,

BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declaraciones según la Regla 4.17:

- sobre el derecho del solicitante para solicitar y que le sea concedida una patente (Regla 4.17(ii))
- sobre el derecho del solicitante a reivindicar la prioridad de la solicitud anterior (Regla 4.17(iii))
- sobre la calidad de inventor (Regla 4.17(iv))

Publicada:

- sin informe de búsqueda internacional, será publicada nuevamente cuando se reciba dicho informe (Regla 48.2(g))

(54) Title: COMPOSITION FOR PRODUCING A FUNGICIDE AND A BIOLOGICAL BACTERICIDE

(54) Título : COMPOSICIÓN PARA OBTENER FUNGICIDA Y BACTERICIDA BIOLÓGICO

(57) Abstract: The invention relates to a composition for producing a fungicide and a biological bactericide, without using antibiotics for controlling diseases in plants. Said composition consists of native strains and is characterised in that it comprises biologically controlling strains *Bacillus spp* and *Brevibacillus parabrevis* in a concentration of ten to the power of eight spores/gr, in a proportion of 1 : 1 : 1 : 1 for each strain, with a wide-spectrum action on phytopathogenic bacteria and late blight.

(57) Resumen: Una composición para obtener un fungicida y bactericida biológico, sin el uso de antibióticos para el control de enfermedades en plantas, compuesta por cepas nativas, caracterizada por que dicha composición comprende cepas biocontroladores *Bacillus spp* y *Brevibacillus parabrevis* en una concentración de diez elevado a ocho esporas/gr., en una proporción de 1 : 1 : 1 : 1 para cada una de las cepas, con acción de amplio espectro sobre bacterias fitopatógenas y tizón tardío.



WO 2010/142055 A2

TITULO

Composición para obtener fungicida y bactericida biológico.

MEMORIA DESCRIPTIVAAntecedentes de la invención

La invención que se desea patentar se refiere a una composición para obtener un fungicida y bactericida biológica, para el control de enfermedades en plantas, compuesta por cepas nativas de los biocontroladores *Bacillus* spp y *Brevibacillus parabrevis* en una concentración de 10^8 esporas/gr., en una proporción de 1:1:1:1, con acción de amplio espectro sobre bacterias fitopatógenas y tizón tardío causado por *Phytophthora infestans*.

La composición de la invención, permite el control de enfermedades bacterianas y fúngicas sin el uso de antibióticos o compuestos cúpricos y por sus características no presenta restricciones ambientales y puede ser utilizado en producción orgánica.

En lo que se refiere al estado de la técnica podemos citar la patente de invención ES N° 2 307 870, la que describe una composición que comprende dos o más especies de trichoderma, naturales o genéticamente modificadas, mediante métodos radiactivos o de otra forma, cepas originales de especies y/o subespecies de *Trichoderma*, naturales o de laboratorio, a los que se añade un extracto hidroalcohólico total de una especie de *Rubus*, o algunos de sus componentes, en una mezcla con

sustancias naturales o químicas destinadas a obtener un bacteriostático bactericida y/o un conservante; siendo esa composición:

a) Una composición formulada sobre la base de dos o más cepas de *Trichoderma*, con la adición de cualquier sustancia sintética, orgánica o inorgánica, incluyendo los conservantes y propulsores de estas sustancias, destinada a dar una característica bactericida bacteriostática, y/o cualquier sustancia fungicida en dosis menores que las necesarias para destruir el cultivo de *Trichoderma*, o sustancias fungicidas a las que las especies de *Trichoderma* seleccionadas se vuelven inmunes, pero suficientemente fuertes para dar a dicha preparación un carácter fungicida, así como la incorporación de sustancias de cualquier origen y naturaleza, y/o instigadores de la acción bactericida bacteriostática (incluyendo penicilina como extracto impuro del hongo propulsor y/o de origen comercial, macrólidos, neomacrólidos, ciclosporina, y cualquier otra familia terapéutica de bactericida bacteriostático fungicida.

b. Una composición formulada sobre la base de dos o más especies vivas y activas de *Trichoderma* que debido a su carácter antagonista deben tener una presentación comercial separada, pero deben mezclarse en el momento en el que van a usarse de forma inmediata o en un plazo no mayor de 45 días después de la aplicación de la primera especie, todo esto con el objetivo de alcanzar un espectro de acción más amplio que el dado por cualquier especie y de cualquier origen posible en cualquier fase de crecimiento vegetativo, que podrían o no contener agentes que les dan las propiedades añadidas como bactericida bacteriostático.

Además, se refiere a una formulación de bactericida bacteriostático fungicida de amplio espectro con acción sobre hongos y/o bacterias que son

responsables de enfermedades fúngicas y/o bacteriosis en seres humanos y/o animales, así como sobre bacteriosis y/u hongos que pueden infectar alimentos, evitando de ese modo su crecimiento, y/o en fase curativa sobre bacterias y/u hongos ya instalados, usada en fase preventiva y/o curativa, que consiste en una presentación comercial para repostería que permite introducir una o más cepas vivas de *Trichoderma* y/o un extracto de ellas, que tienen lactonas como principio activo en una concentración suficiente para permitir la inhibición del crecimiento fúngico (como ejemplo, *penicillium* y otros) sobre pan en particular y sobre masa en general, una vez cocinados, prolongando así su vida útil.

Otra patente de invención es la ES N° 2 246 834 y se refiere ampliamente al campo del crecimiento y el desarrollo de plantas, particularmente a procedimientos y composiciones para mejorar el crecimiento y la resistencia a enfermedades de plantas. La invención se refiere a la iniciación y la promoción del crecimiento de la planta usando una combinación de estrategias múltiples de control biológico en el suelo o en un medio de crecimiento de plantas sin suelo para controlar los nematodos y los patógenos foliares.

La invención también se refiere a una nueva composición de un medio de crecimiento de plantas que comprende quitina y rizobacterias no quitinolíticas promotoras del crecimiento de plantas (PGPR) que crean una sinergia en el crecimiento y la resistencia a enfermedades en la planta. Adicionalmente, la invención se refiere a un nuevo procedimiento sinérgico de uso de bien un tratamiento de la semilla o bien la aplicación de una composición de un medio de plantación sin suelo de un elemento quitinoso y de elementos bacterianos para la preparación y el desarrollo de plantas y transplantes.

Además se proporciona una composición que comprende al menos dos cepas de bacterias PGPR y un

compuesto quitinoso elegido entre quitina, quitina en copos, quitosana y precursores de los mismos, en un intervalo del 0,1% al 10,0% o un compuesto con un efecto equivalente. Las rizobacterias promotoras del crecimiento de plantas (PGPR) comprenden al menos una cepa bacteriana que pueda inducir una resistencia sistémica en la planta ante enfermedades vegetales. La composición comprende además un quitinoso: un compuesto que puede tener una actividad de control sobre los nematodos. En una forma de realización preferible, al menos una de las cepas bacterianas de las PGPR no es quitinolítica. El compuesto quitinoso es preferiblemente un compuesto orgánico aminado o bien un polisacárido aminado.

La presente invención tiene como objetivo proporcionar una composición fungicida y bactericida biológico, destinada al control de enfermedades en plantas cultivadas, como cáncer bacterial en carozos (*Pseudomonas syringae* pv. *syringae*); Peca bacteriana del tomate (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*); Mancha bacteriana del tomate (*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*), Tizón bacteriano del Avellano Europeo (*Xanthomonas campestris* pv. *coralina*) Peste negra del nogal (*Xanthomonas juglandis*); Cancro bacteriano del tomate (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*), Pudrición ácida (*Acetobacter* sp); Pudrición acuosa (*Erwinia carotovora*) y Tizon tardio (*Phytophthora infestans*), pero la composición posee un rango amplio de control de enfermedades.

La composición está conformada en proporciones similares con cepas bacterianas, del tipo *Brevibacillus parabrevis* cepa N° 4; *Bacillus subtilis* cepa N° 5; *Bacillus cereus* cepa N° 6 y *Bacillus cereus* cepa N° 7.

La presente composición permite el control de enfermedades bacterianas y fúngicas en plantas cultivadas, sin el uso de antibióticos o compuestos cúpricos y no presentan restricciones ambientales y pueden ser utilizados en la producción orgánica, lo que no ocurre con los fungicidas existentes en la actualidad.

Descripción de los cuadros

Para demostrar los resultados e incidencia obtenidos con el uso o aplicación en plantas cultivadas con la composición obtenida con las cepas bacterianas antes mencionadas, lo haremos en parte a los dibujos que forman parte integral de la invención, en donde:

El cuadro 1. muestra un cuadro con la incidencia de pudrición ácida en *Vitis vinífera* L. cv. Syrah, en racimos tratados con la composición de la invención el biocontrolador (Nacillus Pro) T1; Nacillus Pro + Tratamiento químico (Switch + BC 1000) T2; Tratamiento químico (Switch + BC 1000) T3; Testigo T4. Temporada 2006 - 2007. Evaluación 11/04/07. Columnas con igual letra no difieren estadísticamente según el test de Tukey ($p < 0.01$).

Cuadro 1

Tratamientos	Incidencia (%)
T1	28.6
T2	34.0
T3	56.6
T4	70.6

El cuadro 2. muestra un cuadro con la severidad de pudrición ácida en *Vitis vinífera* L. cv. Syrah, en racimos tratados con el biocontrolador Nacillus Pro T1; Nacillus Pro + Tratamiento químico (Switch + BC 1000) T2; Tratamiento químico (Switch + BC 1000) T3; Testigo T4. Temporada 2006 - 2007. Evaluación 11/04/07. Columnas con igual letra no difieren estadísticamente según el test de Tukey ($p < 0.01$).

Categoría	Nivel de Daño en el racimo.	Tratamientos	Severidad
		T1	0.43
0	Sin bayas infectadas.	T2	0.67
1	Una a dos bayas infectadas.	T3	1.23
		T4	1.4
2	Tres a cinco bayas infectadas.		
3	Sobre cinco bayas infectadas.		

El cuadro 3. muestra el Porcentaje de incidencia de daño en dardos de peral Abbate, bajo distintos manejos de control de *Pseudomonas*.

Tratamientos	Incidencia (%)
Control	9.4
Químico	7.2
Nacillus Pro	1.4

El cuadro 4. muestra frutos por planta de peral Abbate, bajo distintos manejos de control de *Pseudomonas*.

Tratamientos	Frutos/plant
Control	26.5
Químico	30.1
Nacillus Pro	57.4

El cuadro 5. muestra la incidencia como porcentaje de árboles de peral Abbate dañados, bajo distintos manejos de control de *Pseudomonas*. Bajo los tratamientos Control: sin aplicaciones, Químico: aplicaciones de productos cúpricos y antibióticos en dosis comercial y tratamiento Nacillus Pro, a una dosis de 150g/hl. Columnas con igual letra no difieren estadísticamente según el test de Tukey ($p < 0.01$).

Tratamientos	Frutos/plant
Control	9.2
Químico	7.5
Nacillus Pro	1.3

DETERMINACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES MÍNIMAS INHIBITORIAS (CMI)
DE LAS CEPAS CON CAPACIDAD INHIBITORIA

-. Para cada cepa de las BFE (Bacteria Formadora de endosporas, correspondientes a las cepas biocontroladoras) se inoculó un tubo con 6 ml de caldo nutritivo (CN) con una colonia obtenida desde un cultivo puro, dejándose crecer en agitación constante por 24 hrs. a 20 °C.

-. Para las bacterias fitopatógenas, se tomó con el asa de siembra una colonia de la placa de agar y se inoculó un matraz con 200 ml de medio de cultivo CN líquido, dejándose crecer en agitación constante por 24 hrs. a 20 °C

-. Sobre placas Petrí con 30 ml de agar nutriente, se agregó un ml del cultivo de la bacteria patógena, la que fue esparcida homogéneamente sobre la placa. Después de 30 minutos se retiró el sobrante.

-. Una vez retirado el sobrante del patógeno, se procedió a realizar orificios en el agar con un sacabocado de 0,5 cm., en un número de 9 por placa Petrí. En cada uno de

éstos, se agregaron 50 µl del cultivo de las cepas de los biocontroladores a las siguientes concentraciones 1×10^{8P} , 1×10^{7P} , 1×10^{6P} , 1×10^{5P} , 1×10^{4P} , 1×10^{3P} y 1×10^{2P} UFC/ml.

-. Las placas con el patógeno y las cepas de *BFE.*, fueron puestas a 4 °C por dos horas, luego de lo cual, se pusieron a incubar a 25 °C, observándose la presencia de halos de inhibición hasta 72 hrs. después de la inoculación.

Para cada combinación bacteria patógena / cepa de *BFE.*, se utilizaron tres repeticiones, incluyendo además placas control con solo la bacteria patógena y la cepa de *Bs.* De esta forma fueron seleccionadas aquellas cepas de *BFE.*, que produjeron un halo de inhibición significativo alrededor del orificio donde fueron sembradas y cuya presencia fue consistente en las repeticiones realizadas.

La medición consistió en el diámetro del halo de inhibición formado por cada cepa, en cada una de las diluciones utilizadas, considerándose además como expresión de inhibición sobre el patógeno.

Los resultados se muestran en el cuadro 1, indicando las concentraciones mínimas, a las que cada una de las cepas, muestra actividad inhibitoria, sobre los distintos patógenos. Siendo interesante notar, que las cepas mostraron concentraciones mínimas, similares para patógenos, del mismo genero, no existiendo diferencias, en la capacidad de control sobre patovares distintos e incluso especies distintas.

CUADRO N° 1

CONCENTRACIONES MÍNIMAS INHIBITORIAS (UFC/ML),
 ALCANZADAS POR 4 CEPAS DE BFE SOBRE CUATRO BACTERIAS
 FITOPATÓGENAS.

Cepa/Patogé- no	<i>Clavibac- ter michigan- ensis subsp. michigan- ensis</i>	<i>Xanthomonas campestris pv. vesicatoria</i>	<i>Xanthomonas campestris pv. corylina</i>	<i>Xanthomonas juglandis</i>	<i>Pseudomonas syringae pv. tomato</i>	<i>Pseudomonas syringae pv. syringae</i>
<i>Brevibacillus parabrevis</i> cepa N4	10 ⁶ a	10 ⁶ a	10 ⁶ a	10 ⁶ a	10 ⁶ a	10P ⁴
<i>Bacillus subtilis</i> cepa N5	10 ⁶ a	10 ⁵ b	10 ⁵ b	10 ⁵ b	10 ⁵ b	10 ⁵ b
<i>Bacillus cereus</i> cepa N6	10 ⁵ b	10 ³ c	10 ³ c	10 ³ c	10 ³ c	10 ³ c
<i>Bacillus cereus</i> cepa N7	10 ⁵ b	10 ² d	10 ² d	10 ² d	10 ⁴ c	10 ⁴ c

DETERMINACIÓN DE LA COMPATIBILIDAD ENTRE CEPAS NATIVAS DE BFE
PARA EL CONTROL DE ENFERMEDADES.

Utilizando la misma metodología que en el ensayo 1, se evaluó todas las mezclas de las 4 cepas de BFE por patógeno y fueron comparadas en su inhibición con las cepas individuales.

CUADRO N° 2

DIÁMETRO DE HALO INHIBITORIO, DE 4 CEPAS DE BFE Y SU MEZCLA,
SOBRE 6 BACTERIAS FITOPATÓGENAS.

Cepas	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>corylina</i>	<i>Xanthomonas juglandis</i>	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>
4	1, 6 b	2,6 b	2,8 b	2,7 b	2,3 bc	2,4 bc
5	1, 4 b	2,8 b	2,4 b	3,1 b	3,2 b	2,9 b
6	1, 5 b	2,3 b	2,1 b	2,5 bc	1,5 c	1,4 c
7	2, 1 b	1,4 c	1,5 c	1,6 c	1,8 c	1,9 bc
MEZCLA	6, 4 a	6,9 a	7,1 a	7,2 a	6,4 a	6,5 a

DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD DE CONTROL DE LAS CEPAS DE BFE, EN BASE A COMPETENCIA.

En placas Petrí con agar nutriente, se realizó la siembra del patógeno en estudio, en forma de líneas paralelas, las que eran de 5,5 cm. de longitud, en un número de cuatro por placa. En forma perpendicular y en uno de los extremos de estas líneas, se realizó la siembra de las cepas de BFE también en forma de línea, luego de lo cual las placas fueron puestas a incubación a 26° C por 7 días, luego de lo cual se procedió a medir tanto la inhibición del patógeno, como el nivel de crecimiento que las cepas de BFE, eran capaces de realizar sobre el patógeno, lo que se evaluó en forma del porcentaje de la línea de patógeno cubierta o inhibida por la cepa de BFE, para luego estos datos ser sometidos a un análisis de varianza y a ser significativo a una test de separación de medias. Se utilizaron 12 repeticiones por tratamiento.

CUADRO 3

DIÁMETRO DE HALO INHIBITORIO, Y SOBRE CRECIMIENTO POR
COMPETENCIA DE 4 CEPAS DE BFE Y SU MEZCLA, SOBRE 6 BACTERIAS
FITOPATÓGENAS.

Patógeno	<i>Clavibacter</i> <i>michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>		<i>Xanthomonas</i> <i>campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>		<i>Xanthomonas</i> <i>campestris</i> pv. <i>corylina</i>		<i>Xanthomonas</i> <i>juglandis</i>		<i>Pseudomonas</i> <i>syringae</i> pv. <i>tomato</i>		<i>Pseudomonas</i> <i>syringae</i> pv. <i>syringae</i>	
Cepa	I mm	C mm	I mm	C mm	I mm	C mm	I mm	C mm	I mm	C mm	I mm	C mm
<i>Brevibacillus</i> <i>parabrevis</i> cepa N4	1,6	4,8	2,6	31,2	2,8	5,6	2,7	3,24	2,3	2,53	0,4	2,16
<i>Bacillus</i> <i>subtilis</i> cepa N5	1,4	2,8	2,8	14	2,4	4,8	3,1	4,34	3,2	3,84	2,9	2,581
<i>Bacillus</i> <i>cereus</i> cepa N6	1,5	4,5	2,3	52,9	2,1	71,4	2,5	70	1,5	36	1,4	47,6
<i>Bacillus</i> <i>cereus</i> cepa N7	2,1	7,35	1,5	67,5	1,5	72	1,8	59,4	1,8	46,8	1,9	53,2

EVALUACIÓN IN VIVO DE LA CAPACIDAD BIOCONTROLADORA CON
LA COMPOSICIÓN DE LA INVENCION (NACILLUS PRO.) EN EL CONTROL
DE ENFERMEDADES BACTERIANAS EN TOMATE

En bolsas de 400 ml de capacidad, conteniendo sustrato de perlita, tierra de hoja y arena (1:2:1), fueron transplantadas plantas de tomate var. María Italia con dos hojas verdaderas. Un mes después del transplante, un grupo de plantas fue inoculada con *Clavibacter michiganense* subsp. *michiganense*, otro con *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, y el tercero con *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, a una dosis de 60 ml/planta con una concentración de $10P^{6P}$ bacterias/ml.

Cada grupo de plantas fue sometido a una inoculación manual. Los tratamientos fueron realizados con 2 aplicaciones previo a inoculación, en almácigo y luego en transplante y dos a los 5 y 10 días después de realizada la inoculación.

Los ensayos se realizaron en forma independiente en una cámara de cultivo de plantas con un régimen de temperaturas medias de 26°C día y 20°C noche, con un régimen de luz de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad. Cada 3 días después de aplicados los tratamientos, se realizaron observaciones para detectar la presencia de síntomas y signos, hasta los 40 días post inoculación.

El tratamiento control, consistió en plantas inoculadas sin tratamiento, un tratamiento en base a la alternativa química disponible, el que se realizó también con 4 aplicaciones en los momentos ya mencionados y con la dosis recomendada en su etiqueta y adicionalmente se dejaron plantas, sin inoculación y sin aplicación de los tratamientos, para comprobar la eficacia de la inoculación.

Las mediciones, consistieron en incidencia (porcentaje de plantas con presencia de síntomas) y severidad dadas por el porcentaje de la planta con síntomas de la enfermedad, para *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, porcentaje de folíolos

marchitos para *Clavibacter michiganensis* Subs.. *michiganensis* y porcentaje de área foliar con mancha bacteriana, para el caso de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*.

Adicionalmente se midieron parámetros de vigor, como altura, peso aéreo y de raíces.

Los tratamientos para estos ensayos fueron dispuestos en un diseño completamente al azar, con 5 replicas de 10 plantas cada una por tratamiento.

T0: control Absoluto

T1: Control con Inoculación

T2: Nacillus Pro 3 g/l 4 aplicaciones.

T3: control Químico, Streptoplus 4 aplicaciones 120 g/100 l.

RESULTADOS

Para el caso de *P. syringae* pv. *tomato*, el tratamiento con la composición de la invención (Nacillus Pro), logro una disminución significativa tanto de la incidencia, como de la severidad, diferenciándose, tanto del tratamiento control inoculado, como del tratamiento químico, en cuanto a los parámetros de vigor, pese a que logro una altura y pesos mayores, a los del control absoluto, solo se diferencio estadísticamente, del control inoculado. Algo similar se observo en el ensayo de control de *Clavibacter*, con un efecto interesante sobre la variable severidad, donde el tratamiento con Nacillus Pro, logro un nivel de severidad, estadísticamente similar al del control sin inoculación. En *Xanthomonas*, Nacillus Pro, sigue siendo el mejor tratamiento, tanto para incidencia como severidad, con un comportamiento similar al observado en *Pseudomonas*, en relación a las variables de vigor.

CUADRO 4

EFFECTO DE NACILLUS PRO, SOBRE INCIDENCIA, SEVERIDAD Y
PARÁMETROS DE VIGOR DE PLANTAS DE TOMATE, INOCULADAS
ARTIFICIALMENTE CON *P. SYRINGAE* PV. TOMATO.

Tratamiento	Inciden cia (%)	Severid ad (%)	Altu ra (cm)	Peso seco aéreo (g)	Peso seco raíces (g)
T0: control Absoluto	0 c	0 c	123 a	37,3 ab	6,4 ab
T1: Control con Inoculación	100 a	73 a	102 b	30,1 b	5,8 b
T2: Nacillus Pro 3 g/l	34,4 b	7,5 c	132 a	38,2 a	6,8 a
T3: control Químico, Streptoplus	86,7 a	64 b	105 b	32,1 ab	6,2 ab

CUADRO N° 5

EFFECTO DE NACILLUS PRO, SOBRE INCIDENCIA, SEVERIDAD Y
PARÁMETROS DE VIGOR DE PLANTAS DE TOMATE, INOCULADAS
ARTIFICIALMENTE CON *C. MICHIGANENSIS* SUBS.. *MICHIGANENSIS*.

Tratamiento	Inciden cia (%)	Severid ad (%)	Altu ra (cm)	Peso seco aéreo (g)	Peso seco raíces (g)
T0: control Absoluto	0 d	0 c	123a	37,3 a	6,4 ab
T1: Control con Inoculación	100 a	83,8 a	98 b	25,1 b	4,1 b
T2: Nacillus Pro 3 g/l	38,3 c	8,5 c	126 a	32,72 a	5,8 a
T3: control	64,1 b	54,4 b	115	28,4 ab	5,6 ab

Químico, Streptopplus			ab		
--------------------------	--	--	----	--	--

CUADRO N° 6

EFFECTO DE NACILLUS PRO, SOBRE INCIDENCIA, SEVERIDAD Y PARÁMETROS DE VIGOR DE PLANTAS DE TOMATE, INOCULADAS ARTIFICIALMENTE CON *X. CAMPESTRES PV. VESICATORIA*.

Tratamiento	Inciden cia (%)	Severid ad (%)	Altu ra (cm)	Peso seco aéreo (g)	Peso seco raíces (g)
T0: control Absoluto	0 d	0 d	123a	37,3 a	6,4 ab
T1: Control con Inoculación	100 a	83,8 a	108 b	29,2 b	4,7 b
T2: Nacillus Pro 3 g/l	18,3 c	6,5 c	129 a	34,72 a	5,9 a
T3: control Químico, Streptopplus	64,1 b	54,4 b	117 ab	27,4 ab	5,3 ab

EVALUACIÓN IN VIVO DE LA CAPACIDAD BIOCONTROLADORA NACILLUS PRO.
EN EL CONTROL DE ENFERMEDADES BACTERIANAS EN CEREZOS Y PERAL.

En bolsas de 4 litros de capacidad, conteniendo sustrato de perlita, tierra de hoja y arena (1:2:1), fueron transplantadas plantas de cerezo, variedad Bin y peral var. Abbate de un año de edad. Un mes después del transplante, un grupo de plantas fueron inoculadas con *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, a una dosis de 60 ml/planta con una concentración de $10P^{6P}$ bacterias/ml. Asperjado previo a la caída de hojas.

Los tratamientos consistieron en

T0: control Absoluto sin inoculación y sin aplicaciones

T1: Control con Inoculación

T2: Nacillus Pro 1,5 g/l 5 aplicaciones, siendo la primera en febrero, dos aplicaciones en caída de hojas (5 y 80%), una en pleno invierno (ultima semana de julio), una en inicio de brotación y la ultima en plena flor.

T3: control Químico: Consistente en Nordox 60g/100 l con 3 aplicaciones en caída de hojas (5, 50 y 100%), dos en pleno invierno y Streptoplus, en brotación y floración, a una dosis de 60 g/100 l.

Los ensayos se realizaron en la parcela experimental de Bio Insumos Nativa Ltda.

Las mediciones, consistieron en incidencia medida, como porcentaje de yemas atizonadas.

Los tratamientos para este ensayo fueron dispuestos en un diseño completamente al azar, con 5 replicas de 10 plantas cada una por tratamiento.

RESULTADOS.

En ambos frutales, el tratamiento con Nacillus Pro, logro disminuir en forma significativa la incidencia, de yemas atizonadas por el patógeno. Superando incluso al control químico estándar.

CUADRO N° 7

EFFECTO DE NACILLUS PRO, SOBRE INCIDENCIA Y SEVERIDAD
EN PLANTAS DE CEREZO Y PERALES INOCULADAS ARTIFICIALMENTE CON
P. SYRINGAE PV. SYRINGAE.

Tratamiento	Incidencia cerezos (%)	Incidencia perales (%)
T0: control Absoluto	0 c	0 c
T1: Control con Inoculación	64,3 a	73 a
T2: Nacillus Pro	24,4 c	11,5 c

T3: Control Químico,	46,7 b	52,3 b
----------------------	-----------	-----------

ENSAYO PUDRICIÓN ACIDA

3.1.1 Ubicación del ensayo

Este ensayo se sitúo en la localidad de Santa Cruz perteneciente a la provincia de Colchagua, VI región Chile, en el predio San Francisco de propiedad de la empresa Viña MontGras. Su localización geográfica es 34° 33' 18.48'' Sur y 71° 23' 55.98'' Oeste; altitud 153 metros.

3.2- Material Vegetal

La investigación se realizó durante la temporada agrícola 2006/2007, usando como material vegetal uva vinífera de la variedad Syrah. Esta fue plantada en el año 1997 estando formada en Lyra, distancia entre hilera 2.2 m. y distancia sobre hilera 2.0 m. Presenta un sistema de riego por goteo.

3.4.- Diseño Experimental

El ensayo estuvo dispuesto en un diseño de bloques al azar, constituido de cuatro tratamientos, y tres repeticiones (tres hileras) de 50 plantas cada uno.

3.4.1.- Tratamientos

Cuadro N° 8

Tratamientos evaluados en el control de pudrición ácida en uva vinífera cv. Syrah temporada 2006/2007.

Tratamiento 1	Nacillus Pro ®
Tratamiento 2	Nacillus Pro ®. + Tratamiento del huerto (Switch (Cyprodinil + Fludioxonil) y BC 1000 (Extracto de semilla y pulpa de toronja (ácidos orgánicos más Bioflavonoides)) sólo en presencia de síntomas de la enfermedad.
Tratamiento 3	Tratamiento del huerto (Switch (Cyprodinil + Fludioxonil) y BC 1000 (Extracto de semilla y pulpa de toronja (ácidos orgánicos más Bioflavonoides)) sólo en presencia la

	enfermedad.
Tratamiento 4	Testigo.

T1: Dos aplicación de Nacillus Pro . (3 Kg. / ha.) última semana de Enero y primera semana de Febrero apriete de racimos y envero respectivamente; y una aplicación de precosecha tercera semana de Marzo.

T2: Aplicación de Switch (1 Kg. / ha.) última semana de Enero y primera semana de Febrero apriete de racimos y envero respectivamente y tres aplicaciones de precosecha de BC 1000 (20 Kg. / ha.) tercera y cuarta semana de Marzo y primera semana de Abril.

T3: Dos aplicación de Nacillus Pro (3 Kg. / ha.) y Switch (1 Kg. / ha.) última semana de Enero y primera semana de Febrero apriete de racimos y envero respectivamente. Una aplicación de precosecha de Nacillus Pro ®. (3 Kg. / ha.), tercera semana de Marzo y tres aplicaciones de precosecha de BC 1000 (20 Kg. / ha.) tercera y cuarta semana de Marzo y primera semana de Abril.

T4: Testigo. Sin aplicaciones.

3.5.- Recolección y análisis de muestras

La medición se realizó cinco días antes de cosecha, se procedió a cosechar 50 plantas por repetición. Se midió incidencia, como porcentaje de frutos afectados, del total de frutos de cada repetición y severidad medida de acuerdo a una escala según, el número de bayas infectadas por racimo.

CUADRO 9

ESCALA UTILIZADA PARA MEDIR SEVERIDAD DE PUDRICIÓN ÁCIDA EN UVA VINÍFERA CV. SYRAH TEMPORADA 2006/2007.

Categoría	Nivel de Daño en el racimo.
0	Sin bayas infectadas.
1	Una a dos bayas infectadas.
2	Tres a cinco bayas infectadas.
3	Sobre cinco bayas infectadas.

4.1.-EVALUACIÓN DE LA INCIDENCIA DE PUDRICIÓN ÁCIDA EN DIFERENTES TRATAMIENTOS APLICADOS EN EL HUERTO.

A partir de los resultados obtenidos en este ensayo fue posible determinar con que nivel de incidencia está presente la enfermedad, en el huerto pudiendo luego definir claramente cual tratamiento es el que actúa de mejor forma.

En base a los datos obtenidos en el ANDEVA, que arrojaron diferencias altamente significativas, se procedió a realizar la separación de medias, a través del método de Tukey (HSD). En base a esto se determinó que los mejores tratamientos fueron Nacillus Pro y Nacillus Pro asociado a control químico demostrando que la acción biocontroladora de esta bacteria es eficaz con porcentajes de incidencia 28.6% y 34.0% respectivamente. El tratamiento químico (tratamiento del huerto) por sí sólo no fue efectivo en la prevención y control de pudrición ácida, debido a que, su porcentaje de incidencia fue 56.6%, mientras que el testigo fue de 70.6% siendo ambos estadísticamente similares.

4.2.-EVALUACIÓN DE LA SEVERIDAD DE PUDRICIÓN ÁCIDA EN LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS APLICADOS EN EL HUERTO.

Categoría	Nivel de Daño en el racimo.
0	Sin bayas infectadas.
1	Una a dos bayas infectadas.
2	Tres a cinco bayas infectadas.
3	Sobre cinco bayas infectadas.

Tratamientos	Severidad
T1	0.43
T2	0.67
T3	1.23
T4	1.4

El cuadro 4.2 confirma que el biocontrolador Nacillus Pro no sólo disminuye la aparición de la enfermedad en el viñedo, sino que además, el ataque es más débil, ya que claramente la severidad es inferior con valores de 0.43 en el T1; 0.67 en el T2; 1.23 en el T3; 1.40 en el T4. Se observó diferencias altamente significativas entre el tratamiento propuesto "Nacillus Pro " y el tratamiento químico utilizado en el huerto donde se realizó el ensayo.

De acuerdo a lo anterior, el producto Nacillus Pro, tiene un efecto biocontrolador sobre los agentes causantes de la pudrición ácida en *Vitis vinífera* L. cv. Syrah. De esta forma el uso de estos formulados antagonistas microbianos como agentes biocontroladores, permitiría la reducción en el uso de sustancias químicas, y con esto se ayudaría a retardar el riesgo

de desarrollo de cepas resistentes de los patógenos en el campo (Gullino et al, 1995). Esta es una de las principales ventajas del control biológico de patógenos vegetales, que ha llevado al actual interés por parte de los científicos, en busca de nuevas alternativas en cuanto a microorganismos antagonistas.

ENSAYOS CONTROL DE *PSEUDOMONAS SYRINGAE* PV. *SYRINGAE* EN PERALES.

El presente ensayo busco, definir la acción controladora de la composición de la invención (Nacillus pro.) sobre tizón de flor en perales, causado por *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, para esto se realizaron dos ensayos, en la ciudad de Longaví.

METODOLOGÍA

Huerto de var. Abbate Fettel, con alta incidencia y severidad en temporadas anteriores.

Tratamientos:

- T1: Control sin aplicaciones.
- T2: Manejo del huerto (3 Streptoplus + 3 Citocur)
- T3: Manejo combinado (3 Streptoplus + 3 Nacillus)
- T4: Manejo Biológico: (4 Nacillus Pro).
- Aplicaciones en 10, 25, 50 y 100% de floración.

Dosis

- Estreptomicina 60 g/100 l de P.C.
- Sulfato de cobre: 1.5 Kg./ 1000lt agua/ ha.
- Nacillus Pro: 2.4 Kg/1200 lt agua/ha.

Cada tratamiento consto de 5 repeticiones, cada una compuesta por 10 plantas, en un diseño de bloques al azar.

RESULTADOS

Plantas con presencia de síntomas, como se ve en la figura 5, todos, los tratamientos, se diferenciaron del tratamiento control, siendo los tratamientos con la presencia con la composición de la invención Nacillus Pro, los que presentaron el menor nivel de daño. Siendo el tratamiento con solo Nacillus Pro, el que presento el menor porcentaje de árboles afectados, diferenciándose estadísticamente del manejo netamente químico.

El porcentaje de daño, fue de un 8% en el tratamiento control, diferenciándose estadísticamente, solo de los tratamientos que incluían, la aplicación de Nacillus Pro. Así tenemos que mientras el manejo químico, no se diferencio del control, la aplicación de Nacillus Pro, con o sin antibióticos, presento un nivel de daño, estadísticamente inferior que el control y solo el tratamiento de Nacillus Pro, en forma aislada, se diferencio del manejo químico, lo que nos indica un nivel de incompatibilidad de Nacillus Pro, con antibióticos.

En cuanto al porcentaje de cuaja y frutos por árbol, los únicos tratamientos que se diferenciaron, del control, fueron los que incluyeron el producto Nacillus Pro, siendo el tratamiento con solo Nacillus Pro , superior al manejo químico ver figuras 3 y 4.

Descripción de la invención

Una composición fungicida y bactericida biológico, destinada al control de enfermedades en plantas cultivadas, como cáncer bacterial en carozos (*Pseudomonas syringae* pv. *syringae*); Peca bacteriana del tomate (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*); Mancha bacteriana del tomate (*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*), Tizón bacteriano del Avellano Europeo (*Xanthomonas campestris* pv. *coralina*) Peste negra del nogal (*Xanthomonas juglandis*); Cancro bacteriano del tomate (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*), Pudrición ácida (*Acetobacter* sp); Pudrición acuosa (*Erwinia carotovora*) y Tizón tardío (*Phytophthora infestans*), pero la composición posee un rango amplio de control de enfermedades. La composición está conformada con bacterias, *Brevibacillus parabrevis* cepa N° 4; *Bacillus subtilis* cepa N° 5; *Bacillus cereus* cepa N° 6 y *Bacillus cereus* cepa N° 7.

La composición comprende una relación en peso de la mezcla de las cepas de 0,01% al 30%.

Ejemplos de Realización.

Ejemplo 1.-

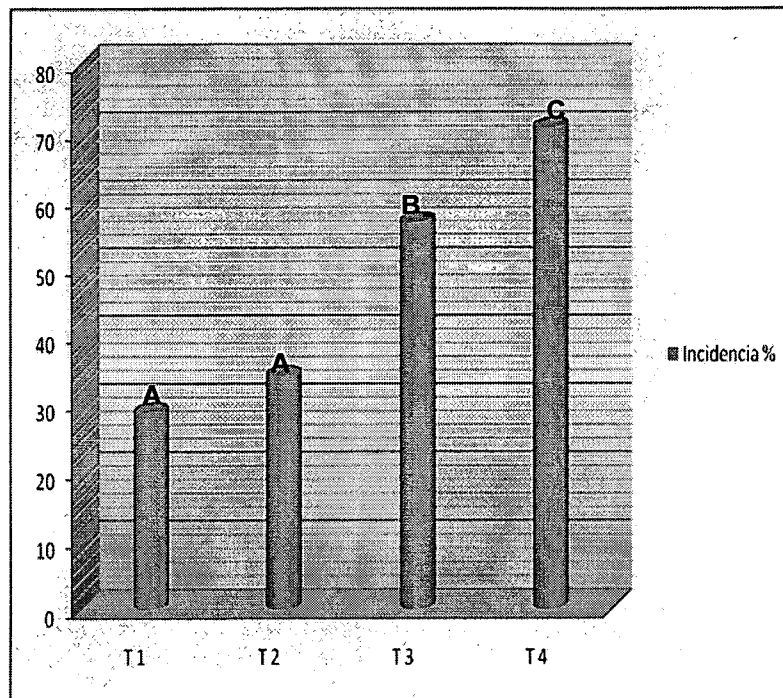
De 0,25% a 25% de Bacterias, *Brevibacillus parabrevis* cepa N° 4; de 0,25% a 25% p/p de *Bacillus subtilis* cepa N° 5; de 0,25% a 25% p/p *Bacillus cereus* cepa N° 6 y de 0,25% a 25% p/p *Bacillus cereus* cepa N° 7.

REIVINDICACIONES

1.- Una composición para obtener un fungicida y bactericida biológico, sin el uso de antibióticos, para el control de enfermedades en plantas, compuesta por cepas nativas, CARACTERIZADA porque dicha composición comprende cepas biocontroladores *Bacillus* spp y *Brevibacillus parabrevis* en una concentración de 10^8 esporas/gr., en una proporción de 1:1:1:1, para cada una de las cepas., con acción de amplio espectro sobre bacterias fitopatógenas y tizón tardío.

2. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1, CARACTERIZADA porque la composición comprende la mezcla de cepas, *Brevibacillus parabrevis* cepa N° 4; *Bacillus subtilis* cepa N° 5; *Bacillus cereus* cepa N° 6 y *Bacillus cereus* cepa N° 7, cuyo acarreador es zeolita, cualquiera de los miembros de este grupo de minerales.

3. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1, CARACTERIZADA porque la relación en peso de las cepas es de 0,01% a 30%.



tratamientos	Incidencia (%)
T1	28.6
T2	34.0
T3	56.6
T4	70.6

FIG. 1

Categoría	Nivel de Daño en el racimo.	Tratamientos	Severidad
0	Sin bayas infectadas.	T1	0.43
		T2	0.67
1	Una a dos bayas infectadas.	T3	1.23
		T4	1.4
2	Tres a cinco bayas infectadas.		
3	Sobre cinco bayas infectadas.		

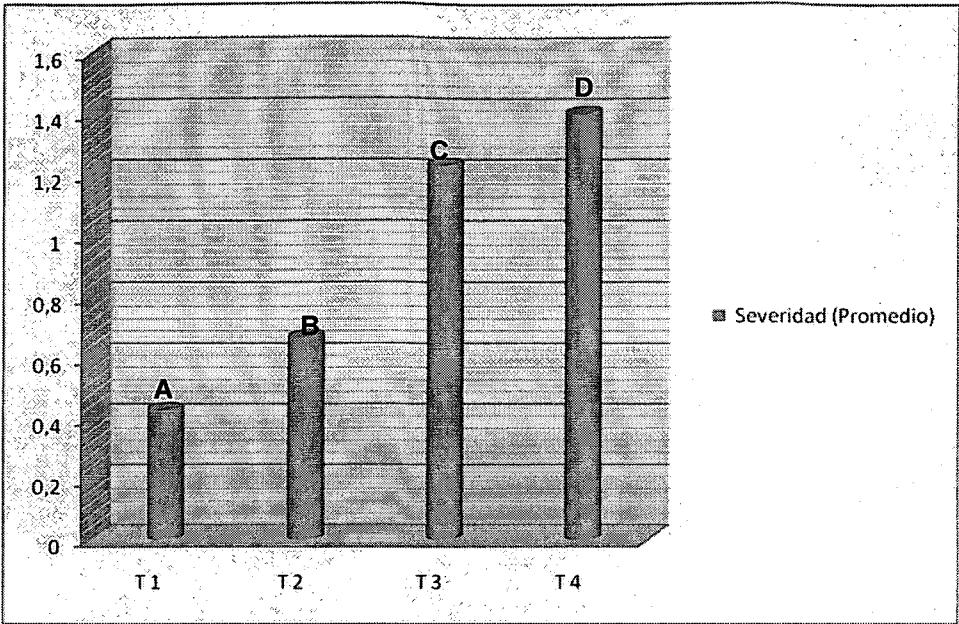


FIG. 2

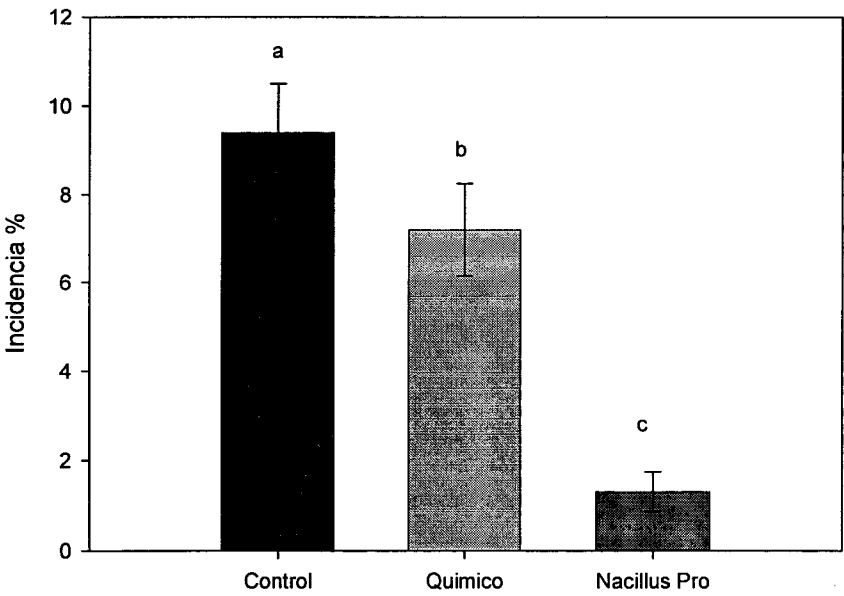


FIG. 3

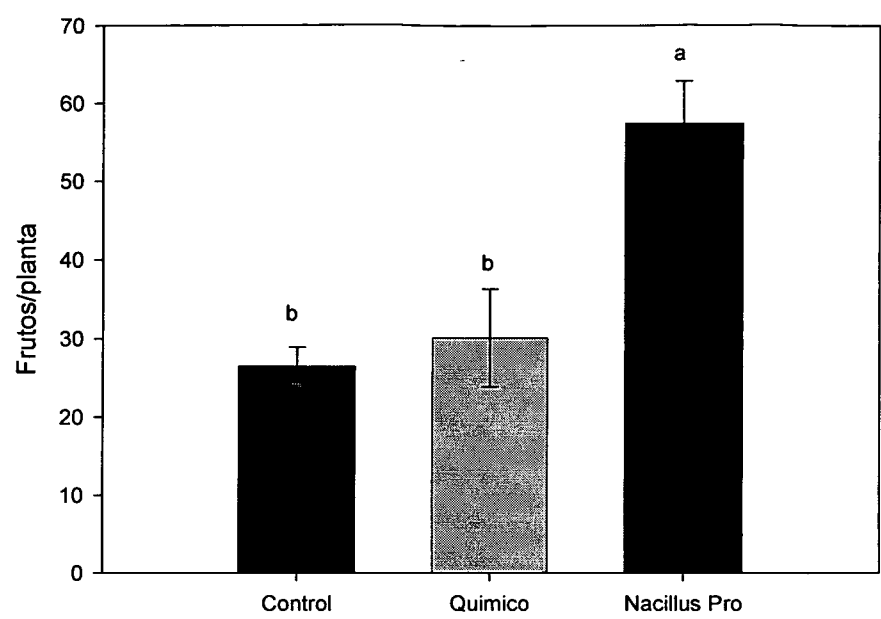


FIG. 4

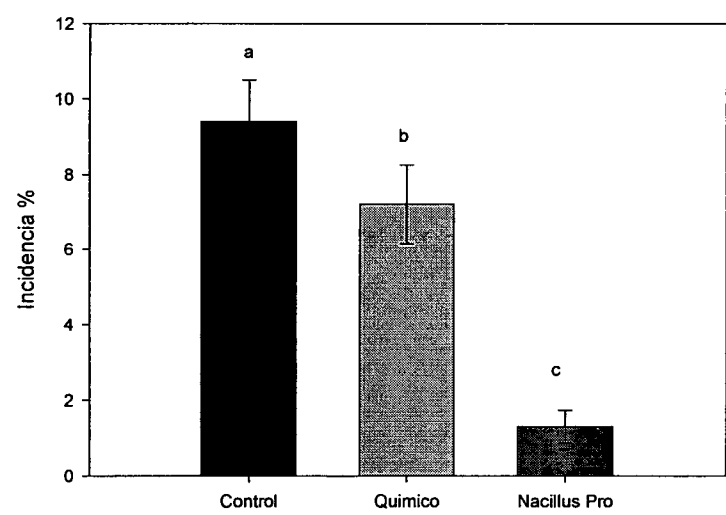


FIG. 5