



República Federativa do Brasil
Ministério da Indústria, Comércio Exterior
e Serviços
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0717851-4 B1

(22) Data do Depósito: 06/11/2007

(45) Data de Concessão: 23/01/2018



(54) Título: MÉTODO PARA CONTROLAR UMA DOENÇA DE PLANTA

(51) Int.Cl.: A01N 63/02; C12N 1/20; C12R 1/38; A01P 3/00

(52) CPC: A01N 63/02, C12N 1/20, C12R 1/38

(30) Prioridade Unionista: 08/11/2006 JP 2006-302263

(73) Titular(es): NIPPON SODA CO., LTD.

(72) Inventor(es): MITSUNORI MAEDA

“MÉTODO PARA CONTROLAR UMA DOENÇA DE PLANTA”

Campo Técnico

[1] A presente invenção diz respeito a um microorganismo tendo capacidade de controle contra doenças de planta, um agente que controla doença de planta que compreende uma célula bacteriana do microorganismo, e um método para controlar doenças de planta usando o microorganismo.

Fundamentos da Técnica

[2] O presente pedido reivindica prioridade com base no Pedido Japonês Nº 2006-302263 depositado em 8 de novembro de 2006.

[3] Convencionalmente, os agentes de cobre inorgânico ou orgânico, e antibióticos tais como casugamicina, estreptomicina e oxitetraciclina são usados contra doenças bacterianas em várias safras agrícolas e horticólicas. Além disso, o ácido oxolínico foi registrado em 1989 como um agente antibacteriano sintético e tem contribuído amplamente para o aumento de produção de safra. Entretanto, agentes de cobre inorgânico e orgânico tendem a causar dano de safra às safras agrícolas e horticólicas, de modo que determinar o tempo e alvejar as safras são restritos ao uso de agentes inorgânicos e orgânicos. Além disso, os antibióticos têm desvantagens em que como um resultado do uso contínuo de um antibiótico, o patógeno bacteriano ganha resistência ao antibiótico. Também com respeito ao ácido oxolínico, as bactérias resistentes tem emergido recentemente e o seu uso é restrito.

[4] Portanto, de modo a superar os problemas de danos à safra e bactérias resistentes, tem havido um interesse aumentado em pesticidas biológicos como um meio para substituir os fungicidas sintéticos convencionais ou como um meio para o uso em combinação com os fungicidas sintéticos convencionais. Os pesticidas biológicos são vantajosos em que eles causam muito pouca poluição ambiental, harmonizam-se com o ecossistema, e são superiores no efeito controlador quando comparados com

fungicidas sintéticos convencionais. Aqueles conhecidos como um agroquímico bacteriano usado para controlar doença bacteriana em safras agrícolas e horticólicas incluem, por exemplo, *Erwinia carotovora* não patogênica particularmente usada para controlar a podridão mole bacteriana de legumes de folha e de raiz; e *Pseudomonas* sp. CAB-02 ou *Trichoderma atroviride* particularmente usada para controlar a podridão bacteriana do grão e a ferrugem bacteriana das mudas, que são doenças bacterianas contagiosas nas sementes do arroz. As composições bactericidas para a agricultura e horticólicas contendo tais microorganismos foram desenvolvidas e comercializadas. Além disso, O Documento de Patente 1 descreve a cepa G7090 de *Pseudomonas fluorescens* como tendo efeito controlador contra *Pseudomonas cichorii* que é uma bactéria causal da podridão bacteriana da alface.

[5] Agroquímicos bacterianos, entretanto, no geral alvejam apenas números restritos de doenças de planta e frequentemente não exercem efeito satisfatório contra outras doenças de planta. Por exemplo, a *Erwinia carotovora* não patogênica alveja apenas a podridão mole bacteriana de legumes de folha e de raiz, *Pseudomonas* sp. CAB-02 ou *Trichoderma atroviride* alveja apenas doenças do arroz, e *Pseudomonas fluorescens* alveja apenas a podridão bacteriana da alface.

[6] Como tal, as doenças alvo são restritas e quase nenhum efeito pode ser esperado para outras doenças bacterianas. Além disso, porque a *Erwinia carotovora* patogênica é controlada pela bacteriocina que é uma proteína antibacteriana produzida pela *Erwinia carotovora* não patogênica, é preocupante que a *Erwinia carotovora* não patogênica possa adquirir resistência à bacteriocina (por exemplo, referência que não de patente 1).

[7] Referência de Patente 1: Pedido de Patente Aberta ao Público Japonês Nº 2001-247423

[8] Referência que não de Patente 1: Biological control of crop

diseases by antagonistic microorganisms, III-5, Control of vegetable bacterial soft rot by non-pathogenic *Erwinia carotovora*, Kumiai Chemical Industry Co. Ltd., 65-76: 2003

Divulgação da invenção

Objetivo a ser resolvido pela invenção

[9] A presente invenção foi feita em vista da situação mencionada acima. O objetivo da presente invenção é, portanto, fornecer um microorganismo que tem uma capacidade controladora superior contra várias doenças de planta (em particular, a podridão mole bacteriana ou podridão bacteriana de legumes de folha e de raiz, cancro de cítricos, e furo bacteriano dos pêssegos) enquanto tem menos carga sobre o ambiente e uma possibilidade extremamente baixa de uma bactéria patogênica resistente emergir; um agente que controla doença de planta que compreende uma célula bacteriana do microorganismo; e um método para controlar doenças de planta que compreendem aplicar o agente que controla a doença de planta a uma planta e/ou seu solo.

Meios para Resolver o Objetivo

[10] De modo a resolver o objetivo, os presentes inventores focalizaram sobre microorganismos residentes da alface e pesquisaram quanto a microorganismos tendo capacidade de controle contra doenças de planta. Como um resultado, os presentes inventores verificaram um microorganismo tendo efeito controlador superior contra a podridão mole bacteriana da alface. As propriedades micológicas e a sequência base do gene 16SrDNA do microorganismo foram analisadas e o microorganismo foi presumido ser uma nova cepa de *Pseudomonas rhodesiae*. A presente invenção foi feita com base na descoberta como acima.

[11] A presente invenção diz respeito a (1) *Pseudomonas rhodesiae* tendo capacidade de controle contra uma doença de planta; (2) *Pseudomonas rhodesiae* FERM BP-10912 tendo capacidade de controle contra uma doença

de planta; (3) uma variante de *Pseudomonas rhodesiae* FERM BP-10912, em que a variante tem a capacidade de controle contra uma doença de planta; (4) *Pseudomonas rhodesiae*, *Pseudomonas rhodesiae* FERM BP-10912, ou uma variante de *Pseudomonas rhodesiae* FERM BP-10912 de acordo com qualquer um de (1) a (3), em que a doença de planta é uma ou mais doenças selecionadas de cancro, furo bacteriano, podridão mole bacteriana, mancha bacteriana, mancha negra bacteriana, definhamento bacteriano, mancha da folha necrótica, necrose de breu, podridão bacteriana do grão, ferrugem bacteriana das mudas, ferrugem bacteriana das folhas, podridão bacteriana, e podridão negra; e (5) *Pseudomonas rhodesiae*, *Pseudomonas rhodesiae* FERM BP-10912, ou uma variante de *Pseudomonas rhodesiae* FERM BP-10912 de acordo com qualquer um de (1) a (3), em que a doença de planta é uma doença em uma planta causada por uma ou mais bactérias patogênicas selecionadas do gênero *Xanthomonas*, gênero *Erwinia*, gênero *Pseudomonas*, gênero *Ralstonia*, e gênero *Burkholderia* de acordo com qualquer um de (1) a (3).

[12] A presente invenção diz respeito ainda a (6) um agente que controla doença de planta contendo uma célula bacteriana de *Pseudomonas rhodesiae* tendo capacidade de controle contra uma doença de planta; (7) o agente que controla doença de planta de acordo com (6), em que a célula bacteriana de *Pseudomonas rhodesiae* é uma ou mais células bacterianas selecionadas do grupo que consiste de uma célula bacteriana de *Pseudomonas rhodesiae* FERM BP-10912 de acordo com (2), e uma célula bacteriana de uma variante de *Pseudomonas rhodesiae* FERM BP-10912 de acordo com (3); e (8) o agente que controla doença de planta de acordo com (6), em que a doença de planta é uma ou mais doenças de planta selecionadas de cancro, furo bacteriano, podridão mole bacteriana, mancha bacteriana, mancha negra bacteriana, definhamento bacteriano, mancha da folha necrótica, necrose de breu, podridão bacteriana do grão, ferrugem bacteriana das mudas, ferrugem

bacteriana das folhas, podridão bacteriana, e podridão negra.

[13] A presente invenção diz respeito ainda a (9) um método para controlar uma doença de planta, em que *Pseudomonas rhodesiae*, *Pseudomonas rhodesiae* FERM BP-10912, ou uma variante de *Pseudomonas rhodesiae* FERM BP-10912 de acordo com qualquer um de (1) a (3) são aplicados a uma planta e/ou solo da planta.

Efeito da invenção

[14] Um agente que controla doença de planta e um método para controlar doenças de planta da presente invenção coloca pouca carga no ambiente e mostra uma possibilidade extremamente baixa de bactérias patogênicas resistentes emergirem, assim como retém uma capacidade controladora superior contra várias doenças de planta por um período mais longo. Além disso, um agente que controla doença de planta da presente invenção é acentuadamente vantajoso comparado com os agroquímicos bacterianos convencionais em que o mesmo exerce um efeito superior particularmente contra a podridão mole bacteriana, podridão bacteriana ou podridão negra de legumes de folha e de raiz, cancro de cítrico, e furo bacteriano de pêssegos entre as doenças de planta.

Explicação Resumida dos Desenhos

[Figura 1]

[15] A Figura 1 mostra um dendrograma da cepa 050572I9 de *Pseudomonas rhodesiae* (*Pseudomonas rhodesiae*, FERM BP-10912) da presente invenção, que foi preparada com base na sequência de nucleotídeo do gene 16SrDNA.

Melhor Modo de Realizar a Invenção

<Microorganismos da presente invenção>

[16] Um microorganismo da presente invenção não é particularmente limitado contanto que seja *Pseudomonas rhodesiae* tendo capacidade de controle contra uma doença de planta. “Tendo capacidade de

controle contra uma doença de planta” aqui significa ter uma ação antagonística contra a bactéria patogênica de qualquer uma das doenças de planta. Um microorganismo da presente invenção previne ou cura uma doença de planta causada pela bactéria patogênica da doença de planta exercendo uma ação antagonística contra a dita bactéria patogênica. Um microorganismo da presente invenção, entretanto, é particularmente eficaz na prevenção de uma doença de planta.

[17] “Previne uma doença de planta” aqui refere-se a que quando uma planta ou seu solo que não foram infectados com uma bactéria patogênica de uma doença de planta ou não demonstrou nenhum sintoma deste é cultivado sob as condições preferidas mais o tratamento com um microorganismo da presente invenção ou apenas sob as condições preferidas, a planta tratada com um microorganismo da presente invenção mostra um grau mais baixo de doença comparada com a planta não tratada com um microorganismo da presente invenção. Além disso, “cura uma doença de planta” como mencionado acima refere-se a que quando uma planta que foi infectada com a bactéria patogênica de uma doença de planta e apresenta o sintoma desta é cultivada sob as condições preferidas exceto que a planta é tratada ou não tratada com um microorganismo da presente invenção, uma planta tratada com um microorganismo da presente invenção mostra um grau mais baixo de doença comparada com uma planta não tratada com um microorganismo da presente invenção.

[18] “Mostra um grau mais baixo de doença” significa, por exemplo, que a severidade da doença (ou taxa de início) é baixo e o valor preventivo é maior do que 0. Quanto mais alto for o valor preventivo, mais preferido ele é. Por este motivo, o valor preventivo de 30 ou mais é superior, 50 ou mais é mais superior, e 60 ou 70 ou mais é particularmente superior.

[19] Um microorganismo da presente invenção é preferivelmente exemplificado pela cepa 050572I9 de *Pseudomonas rhodesiae*, cepa

JCM11940 *Pseudomonas rhodesiae*, e variantes destes, entre os quais a cepa 050572I9 de *Pseudomonas rhodesiae* e suas variantes são mais preferivelmente exemplificadas por causa de suas melhores propriedades como um agente que controla doença de planta. A cepa 050572I9 de *Pseudomonas rhodesiae* foi domesticamente depositada pelo requerente do presente pedido em 12 de setembro de 2006 no International Patent Organism Depositary (IPOD), National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST) (Tsukuba Central 6, 1-1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki, Japão) sob o número de acesso FERM P-21025, seguido pelo depósito internacional em 25 de setembro de 2007 sob o acesso internacional número FERM BP-10912. A cepa JCM11940 de *Pseudomonas rhodesiae* foi depositada no RIKEN, Ibaraki Institute, BioResource Center (3-1-1 Koyadai, Tsukuba-shi, Ibaraki, Japão) como JCM11940.

[20] “Uma variante de uma certa cepa X” no presente relatório descritivo abrange qualquer variante induzida da cepa X, contanto que tal variante tenha as mesmas propriedades micológicas como aquelas de uma certa cepa X e tendo capacidade de controle contra doenças de planta. A variação inclui uma variação artificial causada tal como por um agente variante químico ou ultravioleta, assim como uma variação que ocorre naturalmente. Uma variante de uma certa cepa X é preferivelmente exemplificada por aquelas variantes tendo as mesmas propriedades micológicas como aquelas de uma certa cepa X com respeito às propriedades descritas na Tabela 1 abaixo, e tendo capacidade de controle contra doenças de planta.

[21] A cepa 050572I9 de *Pseudomonas rhodesiae* (FERM BP-10912) que é preferida entre os microorganismos da presente invenção tem as seguintes propriedades micológicas.

[22] A cepa 050572I9 de *Pseudomonas rhodesiae* é uma bactéria Gram-negativa, na forma de bastão, que não forma esporo. Seu comprimento

de célula total é de 2,0 a 2,5 μm , a largura total é de 0,7 a 0,8 μm , e a motilidade é observada. Esta forma uma colônia circular lisa em um meio de caldo de ágar e produz pigmento fluorescente em um meio King B. O seu crescimento não é observado a 41° C. Ela é positiva quanto a atividade de catalase, oxidada no teste de OF, negativa quanto a redução de sal de nitrato, negativa quanto a produção de indol, negativa quanto a atividade de urease, positiva quanto a degradação de gelatina, negativa quanto a atividade de β -galactosidase, e negativa quanto a atividade de β -glicosidase. Além disso, no teste de LOPAT, ela é positiva quanto a produção de levan, negativo quanto a podridão do tubérculo da batata, negativo quanto a resposta da hipersensibilidade do tabaco, positiva quanto a atividade de oxidase, e positiva quanto a degradação da arginina. Ela é negativa quanto a assimilação de amido. Como para a assimilação de compostos de carbono tais como açúcar e ácidos orgânicos, a mesma é positiva quanto a D-glicose, positiva quanto a L-arabinose, positiva quanto a D-manose, positiva quanto a D-manitol, positiva quanto a N-acetil-D-glicosamina, negativa quanto a maltose, positiva quanto ao gliconato de potássio, positiva quanto ao ácido n-cáprico, negativa quanto ao ácido adípico, positiva quanto ao ácido dL-málico, positiva quanto ao citrato de sódio, negativa quanto ao acetato de fenila, positiva quanto à sacarose, positiva quanto à trealose, negativa quanto a adonit, positiva quanto ao sorbitol, positiva quanto ao ácido butírico, positiva quanto ao ácido propiônico, e positiva quanto ao propileno glicol. O método de determinação e outros para cada item são como descritos posteriormente nos Exemplos.

[23] Um microorganismo da presente invenção será suficiente se o mesmo tiver a capacidade de controle contra pelo menos uma doença de planta, mas é preferido que o mesmo tenha a capacidade de controle contra pelo menos 1 ou mais, preferivelmente 2 ou mais, e mais preferivelmente contra todas as doenças de planta selecionadas de cancro, furo bacteriano,

podridão mole bacteriana, mancha bacteriana, mancha negra bacteriana, definhamento bacteriano, mancha da folha necrótica, necrose de breu, podridão bacteriana do grão, ferrugem bacteriana das mudas, ferrugem bacteriana das folhas, podridão bacteriana, e podridão negra. Além disso, é preferido que um microorganismo da presente invenção especialmente tenha a capacidade de controle contra 1 ou mais, preferivelmente 2 ou mais, e mais preferivelmente todas as doenças de planta dentre podridão mole bacteriana, podridão bacteriana, podridão negra, cancro e furo bacteriano.

[24] Os exemplos da bactéria patogênica destas doenças de planta incluem tais como 1 ou mais bactérias patogênicas que pertencem ao gênero *Xanthomonas*, gênero *Erwinia*, gênero *Pseudomonas*, gênero *Ralstonia*, e gênero *Burkholderia*. Embora outros detalhes sejam mostrados na Tabela 1, as bactérias patológicas relacionadas com a presente invenção não são restrita a estas.

[Tabela 1]

Doença de planta	Bactéria patogênica	Exemplos de plantas alvo
Cancro	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>citri</i>	Cítricos
Furo bacteriano	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>pruni</i>	Pêssego, etc.
Podridão mole bacteriana	<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i>	Legumes de folha tais como alface e acelga; legumes de raiz tais como rabanete japonês e batatas; flores tais como girassol, orquídea e ciclame
Mancha bacteriana	<i>Pseudomonas marginalis</i> pv. <i>marginalis</i> <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>raphani</i> <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>lachrymans</i>	Pepino, etc. Rabanete japonês Melão
Mancha bacteriana das folhas Mancha negra bacteriana	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>maculicola</i> <i>Pseudomonas viridiflava</i>	Rabanete japonês, acelga Tomate
Definhamento bacteriano	<i>Ralstonia solanacearum</i>	Tomate, berinjela, pimentão, etc.
Mancha da folha necrótica	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>cucurbitae</i>	Pepino, etc.
Necrose de Breu	<i>Pseudomonas corrugata</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i>	Tomate, berinjela, etc.
Podridão bacteriana do grão	<i>Burkholderia glumae</i>	Arroz

Ferrugem bacteriana das mudas	<i>Burkholderia plantarii</i>	Arroz
Ferrugem bacteriana das folhas	<i>Xanthomonas oryzae pv. oryzae</i>	Arroz
Mancha bacteriana	<i>Pseudomonas cichorii</i> <i>Pseudomonas marginalis pv. marginalis</i>	Alface, acelga, repolho, etc.
Podridão negra	<i>Xanthomonas campestris pv. campestris</i>	Repolho, etc.

[25] Uma planta aplicável para um microorganismo da presente invenção não é particularmente limitada contanto que o microorganismo da presente invenção possa exercer capacidade de controle para esta planta. Os exemplos da planta aplicável incluem uma planta pertencente às *Brassicaceae*, *Solanaceae*, *Cucurbitaceae*, *Liliaceae*, *Fabaceae*, *Compositae*, *Chenopodiaceae*, *Poaceae*, *Rosaceae*, *Caryophyllaceae*, *Primulaceae*, *Rutaceae*, *Vitaceae*, *Actinidiaceae*, *Ebenaceae*, *Actinidiaceae*, *Convolvulaceae*, ou *Araceae*. Preferivelmente exemplificadas entre estas estão uma planta pertencente à *Brassicaceae* tal como a acelga, uma planta pertencente às *Compositae* tal como a alface, uma planta pertencente às *Solanaceae* tal como batata, uma planta pertencente às *Rutaceae* tal como limão e laranja-da-baía, e uma planta pertencente às *Rosaceae* tal como pêssego.

< 2 > Agente que controla doenças de planta da presente invenção

[26] Um agente que controla doença de planta da presente invenção não é particularmente limitado contanto que o mesmo contenha a célula bacteriana de *Pseudomonas rhodesiae* da presente invenção. Uma cepa de *Pseudomonas rhodesiae* da presente invenção a ser contida em um agente que controla a doença de planta da presente invenção pode ser de 1 tipo ou 2 ou mais tipos.

[27] Um agente que controla doença de planta da presente invenção previne ou cura uma doença de planta causada por uma bactéria patogênica de uma doença de planta através do processo que a célula bacteriana de *Pseudomonas rhodesiae* da presente invenção contida no agente controlador

exerce uma ação antagonística contra a bactéria patogênica. Um agente que controla doença de planta da presente invenção pode ser usado como um agente preventivo de doença de planta ou um agente terapêutico de doença de planta, onde o mesmo é especialmente eficaz como um agente preventivo de doença de planta.

[28] *Pseudomonas rhodesiae* principalmente toma uma forma de trofócito, mas a célula bacteriana de *Pseudomonas rhodesiae* da presente invenção pode tomar qualquer forma celular (por exemplo, célula dormente) que as bactérias viáveis de *Pseudomonas rhodesiae* pode tomar tal como trofócito de *Pseudomonas rhodesiae*. Além disso, uma forma da célula bacteriana de *Pseudomonas rhodesiae* a ser usada para um agente que controla doença de planta da presente invenção pode ser de 1 tipo ou mais do que 2 tipos.

[29] A célula bacteriana de *Pseudomonas rhodesiae* usada para um agente que controla doença de planta da presente invenção é obtida, por exemplo, cultivando-se *Pseudomonas rhodesiae* da presente invenção que foi isolada e obtida usando-se como um índice da sequência de gene 16SrDNA da cepa 050572I9 de *Pseudomonas rhodesiae* (FERM BP-10912) (ver a SEQ ID No. 1) e/ou as propriedades micológicas mencionadas acima da cepa. Um método para cultivar *Pseudomonas rhodesiae* da presente invenção não é particularmente limitado, independente do tipo de meio ou condições de cultura, contanto que o mesmo seja um método em que a célula bacteriana de *Pseudomonas rhodesiae* possa proliferar. Quando da utilização de uma cultura sólida, um método é exemplificado em que a cultura estacionária é realizada de 20 a 35° C usando-se um método de ágar padrão, ágar Nutrient, meio de ágar dextrose de batata, etc., e quando da utilização de uma cultura líquida, um método é exemplificado em que a agitação/cultura agitada é realizada de 20 a 35° C pelo uso de vários meios líquidos, etc. em que ágar foi removido do meios de ágar mencionado acima.

[30] Como para a célula bacteriana de *Pseudomonas rhodesiae*, qualquer forma de célula tal como a célula bacteriana por si de *Pseudomonas rhodesiae*, uma suspensão contendo a célula bacteriana, uma solução de cultura contendo a célula bacteriana, e um concentrado, pasta, substância seca ou diluição desta (a seguir pode ser aludido como “célula bacteriana e outros de *Pseudomonas rhodesiae*”) podem ser usados para um agente que controla doença de planta da presente invenção.

[31] A concentração de uma célula bacteriana de *Pseudomonas rhodesiae* contida em um agente que controla doença de planta da presente invenção não é particularmente limitada contanto que o efeito da presente invenção não seja afetado. Quando um agente que controla doença de planta é diluído de 1.000 a 2.000 vezes, preferivelmente exemplificada é uma concentração em uma faixa de 1×10^2 a 1×10^{11} cfu/ml, preferivelmente de 1×10^4 a 1×10^9 cfu/ml, em termos de concentração de célula bacteriana.

[32] Um agente que controla doença de planta da presente invenção pode conter componentes opcionais outros que não a célula bacteriana de *Pseudomonas rhodesiae* da presente invenção, contanto que o efeito da presente invenção não seja afetado. Não existe nenhuma limitação particular para o componente opcional contanto que o efeito da presente invenção não seja afetado e os exemplos incluem um carreador, tensoativo, dispersante e suplemento. Além disso, um antioxidante, corante, lubrificante, absorvedor de ultravioleta, antiestático e antisséptico podem ser adicionados de acordo com a necessidade.

[33] Os exemplos do carreador incluem sais inorgânicos tais como carbonato de cálcio, cloreto de potássio, sulfato de sódio, sulfato de cálcio, sulfato de amônio; ácidos orgânicos tais como ácido cítrico, ácido málico e ácido esteárico, e sais destes; açúcares tais como glicose, lactose e sacarose; e um carreador sólido tal como pó de alumina, gel de sílica, zeólito, hidroxiapatita, fosfato de zircônio, fosfato de titânio, óxido de titânio, óxido

de zinco, hidrotalcita, caolinita, montmorilonita, talco, argila, diatomita, bentonita, carbono branco, caulim e vermiculita.

[34] Além disso, o tensoativo (também pode ser usado como um dispersante) não é particularmente limitado contanto que o mesmo possa ser usado para uma formulação agrícola e horticultural comum, e os exemplos específicos incluem um tensoativo não iônico, tensoativo aniônico, tensoativo catiônico e tensoativo anfotérico, como descrito abaixo.

[35] Os exemplos do tensoativo não iônico incluem um tensoativo de éster de açúcar tal como éster de ácido graxo sorbitano (C_{12-18}), éster de ácido graxo sorbitano POE (C_{12-18}), e éster de ácido graxo de sacarose; um tensoativo de éster de ácido graxo tal como o éster de ácido graxo POE (C_{12-18}), éster ácido de resina POE, diéster de ácido graxo de POE (C_{12-18}); um tensoativo de álcool tal como éter alquílico de POE (C_{12-18}); um tensoativo de alquilfenol tal como POE alquila (C_{8-12}) feniléter, POE dialquila (C_{8-12}) feniléter, e condensado de formalina POE alquila (C_{8-12}) feniléter; polímero de bloco de polioxietileno·polióxi-propileno; um tensoativo de polímero de bloco de polioxietileno·polioxipropileno tal como éter de polímero de bloco de alquila (C_{12-18}) polioxietileno·polioxipropileno; um tensoativo de alquilamina tal como POE alquilamina (C_{12-18}) e ácido graxo de POE amida (C_{12-18}); um tensoativo de bisfenol tal como bisfeniléter de ácido graxo de POE; um tensoativo de anel multi-aromático tal como éter POA benzilfenila (ou fenilfenila) e éter de POA estirilfenila (ou fenilfenila); um tensoativo de silício ou flúor tal como éter de POE e tensoativos de silício de éster de POE e tensoativos de flúor; um tensoativo de óleo vegetal tal como óleo de mamona POE e óleo de mamona endurecido POE.

[36] Os exemplos do tensoativo aniônico incluem um tensoativo de sulfato tal como alquil sulfato (C_{12-18} , Na, NH_4 , alcanolamina), POE alquil éter sulfato (C_{12-18} , Na, NH_4 , alcanolamina), POE alquilfenil éter sulfato (C_{12-18} , NH_4 , alcanolamina), POE benzila (ou estiril) fenil (ou fenilfenil) éter sulfato

(Na, NH₄, alcanolamina), polioxietileno, polímero de bloco polioxipropileno sulfato (Na, NH₄, alcanolamina); um tensoativo de sulfonato tal como parafina(alcano) sulfonato (C₁₂₋₂₂, Na, Ca, alcanolamina), AOS (C₁₄₋₁₆, Na, alcanolamina), dialquil sulfossuccinato (C₈₋₁₂, Na, Ca, Mg), alquilbenzeno sulfonato (C₁₂, Na, Ca, Mg, NH₄, alquilamina, alcanol, amina, cicloexilamina), mono- ou di-alquila (C₃₋₆) naftaleno sulfonato (Na, NH₄, alcanolamina, Ca, Mg), condensado de naftaleno sulfonato-formalina (Na, NH₄), alquila(C₈₋₁₂)difetil éter dissulfonato (Na, NH₄), ligninsulfonato (Na, Ca), POE alquil(C₈₋₁₂)feniléter sulfonato (Na), e POE alquil(C₁₂₋₁₈)éter, semi éster do ácido sulfossuccínico (Na); um tensoativo de fosfato tal como POE alquil(C₁₂₋₁₈) éter fosfato (Na, alcanolamina) incluindo um sal de ácido graxo do ácido carboxílico(C₁₂₋₁₈, Na, K, NH₄, alcanolamina), sarcossinato de N-metil-ácido graxo (C₁₂₋₁₈, Na) e sal de ácido de resina (Na, K), POE mono- ou di-alquila (C₈₋₁₂) fenil éter fosfato (Na, alcanolamina), POE benzilado (ou estirilado) fenil (ou fenilfenil) éter fosfato (Na, alcanolamina), polímero de bloco polioxietileno·polióxi propileno (Na, alcanolamina), fosfatidilcolina·fosfatidiletanolimina (lecitina) e alquila (C₈₋₁₂) fosfato.

[37] Os exemplos do tensoativo catiônico incluem um tensoativo de amônio tal como cloreto de alquiltrimetilamônio (C₁₂₋₁₈), metil·polioxietileno·cloreto de alquilamônio (C₁₂₋₁₈), alquil·N-brometo de metilpirídio (C₁₂₋₁₈), cloreto de mono- ou di-alquil(C₁₂₋₁₈)amônio metilado e dicloreto de alquil(C₁₂₋₁₈)pentametilpropilenodiamina; e um tensoativo de benzalcônio tal como cloreto de alquildimetilbenzalcônio (C₁₂₋₁₈) e cloreto de benzetônio (cloreto de octilfenoxietóxi etildimetilbenzilamônio).

[38] Os exemplos do tensoativo anfotérico incluem um tensoativo de betaína tal como dialquil(C₈₋₁₂)diaminoetilbetaína e alquil(C₁₂₋₁₈) dimetilbenzilbetaína; um tensoativo de glicina tal como dialquil(C₈₋₁₂) diaminoetilglicina e alquil(C₁₂₋₁₈)dimetilbenzilglicina.

[39] Um tensoativo e/ou um dispersante podem ser usados sozinhos

ou em combinação de 2 ou mais tipos destes.

[40] O suplemento pode ser exemplificado pela carboximetilcelulose, polietileno glicol, goma arábica e amido.

[41] A forma de um agente que controla doença de planta da presente invenção não é particularmente limitada e o mesmo pode tomar qualquer forma que um agente agrícola e horticultural comum pode tomar. O agente de controle pode tomar, por exemplo, a formulação em pó, pó umectável, emulsão, formulação fluível e formulação granular.

[42] Uma doença de planta à qual um agente de controle de planta da presente invenção pode ser aplicado não é particularmente limitado contanto que a doença seja causada quando uma planta é infectada com uma bactéria patogênica para a qual a *Pseudomonas rhodesiae* da presente invenção exerça a sua capacidade de controle. Os exemplos da doença de planta aplicável incluem cancro, furo bacteriano, podridão mole bacteriana, mancha bacteriana, mancha negra bacteriana, definhamento bacteriano, mancha da folha necrótica, necrose de breu, podridão bacteriana do grão, ferrugem bacteriana das mudas, ferrugem bacteriana das folhas, podridão bacteriana e podridão negra.

[43] Além disso, os exemplos da doença de planta à qual um agente de controle da planta da presente invenção pode ser aplicado incluem uma ou mais doenças de planta, preferivelmente 2 ou mais doenças de planta e mais preferivelmente todas as doenças de planta selecionadas de cancro, furo bacteriano, podridão mole bacteriana, mancha bacteriana, mancha negra bacteriana, definhamento bacteriano, mancha da folha necrótica, necrose de breu, podridão bacteriana do grão, ferrugem bacteriana das mudas, ferrugem bacteriana das folhas, podridão bacteriana e podridão negra. Particularmente exemplificados são pelo menos 1 ou mais doenças de planta, preferivelmente 2 ou mais doenças de planta e mais preferivelmente todas as doenças de planta selecionadas de podridão mole bacteriana, podridão bacteriana,

podridão negra, cancro e furo bacteriano.

<3> Método para controlar doenças de planta de acordo com a presente invenção

[44] Um método para controlar doenças de planta de acordo com a presente invenção não é particularmente limitado contanto que o mesmo seja um método que compreenda tratar uma planta e/ou seu solo com um agente que controla doença de planta da presente invenção e este pode ser apropriadamente selecionado dependendo de tal como um tipo da doença de planta e um tipo da planta aplicável em uma maneira similar a quando pesticidas químicos comuns são usados. Por exemplo, uma planta pode ser tratada com um agente que controla doença de planta da presente invenção sendo, por exemplo, diretamente aplicada ou pulverizada com um agente que controla doença de planta da presente invenção. Alternativamente, o solo onde a planta é cultivada (solo da planta) pode ser tratado com um agente que controla doença de planta da presente invenção sendo, por exemplo, misturado, pulverizado ou irrigado com um agente que controla doença de planta da presente invenção. Aqui, quando um agente que controla doença de planta da presente invenção é tratado no solo de uma planta, a planta pode ser plantada depois do solo ter sido tratado com um agente que controla a doença de planta da presente invenção, ou o solo pode ser tratado com um agente que controla doença de planta da presente invenção depois que a planta foi plantada no solo. Além disso, como descrito no Pedido de Patente Aberta ao Público Japonês Nº 2001-302407, um agente que controla doença de planta da presente invenção pode ser colocado na vizinhança de abertura de sopro de um soprador para ar soprado na instalação e o agroquímico é espalhado ao longo com ar soprado da abertura de sopro.

[45] Quando do tratamento de uma planta e/ou do seu solo com um agente que controla doença de planta da presente invenção, o agente que controla doença de planta da presente invenção pode ser usado diluindo-o

com uma quantidade apropriada de água e outros. A quantidade de um agente que controla doença de planta da presente invenção a ser tratado a uma planta e/ou ao seu solo não pode ser no geral definida, visto que a quantidade difere dependendo de um tipo da doença de planta, um tipo da planta aplicável, etc. Quando o agente de controle é espalhado no solo, a quantidade pode ser usualmente definida como estando em uma faixa de 1×10^2 - 1×10^{11} cfu/ml, preferivelmente 1×10^4 - 1×10^9 cfu/ml, em termos da concentração de célula bacteriana de *Pseudomonas rhodesiae*.

[46] O número de tratamentos por pulverização pode ser apropriadamente selecionado de acordo com um tipo da doença de planta, um tipo da planta aplicável e do grau da doença.

[47] A presente invenção é explicada em mais detalhes no que segue, embora o escopo técnico da presente invenção não deva ser limitado a estas exemplificações.

Exemplos

[Exemplo 1]

[48] Identificação das bactérias e preparação de uma composição em pó umectável que controla doença de planta

1. Seleção de uma cepa tendo capacidade de controle contra podridão mole bacteriana da alface

[49] As folhas de alface coletadas no campo da fazenda foram homogeneizadas em uma pequena quantidade de água esterilizada. A suspensão assim obtida foi revestida em um método padrão de ágar (0,5 % (p/v) de Peptona de Caseína, 0,25 % (p/v) de extrato de levedura, 0,1 % (p/v) de glicose, 1,5 % (p/v) de ágar, pH 6,9 a 7,1 depois da esterilização) (NISSUI PHARMACEUTICAL CO. LTD.) e cultivada por 2 dias a 25° C. As colônias dos microorganismos cultivados foram coletados, que foram ainda separados e obtidos como uma colônia única. As cepas plurais dos microorganismos assim obtidos passaram por um teste para avaliar o efeito controlador contra

podridão mole bacteriana da alface (teste interno) como descrito nos Exemplos que seguem, para selecionar as cepas de microorganismos tendo efeito controlador contra uma cepa patogênica da podridão mole bacteriana da alface (*Erwinia carotovora*). As cepas assim selecionadas passaram ainda por um teste para avaliar o efeito controlador contra podridão mole bacteriana da alface (teste de campo) em uma maneira similar ao último teste mencionado para avaliar o efeito controlador contra podridão mole bacteriana em acelga (teste de campo). Como um resultado, a cepa 050572I9 foi selecionada que exerceu efeito controlador contra a podridão mole bacteriana da alface também no teste de campo.

2. Análise do gene 16SrDNA

[50] De modo a analisar a sequência de nucleotídeo do gene 16SrDNA na cepa 050572I9, foi tentado isolar 16SrDNA a partir da cepa 050572I9. Especificamente, o DNA genômico foi isolado da cepa 050572I9 de acordo com um protocolo comum. Pelo uso do DNA genômico assim obtido como um padrão, a amplificação pela PCR foi realizada pelo uso do iniciador 27F (SEQ ID No: 2) e iniciador 1544R (SEQ ID No: 3) que são iniciadores habitualmente usados para isolar 16SrDNA. Depois a presença ou ausência dos produtos da PCR foram confirmadas pela eletroforese usando gel de agarose, cada um dos produtos da PCR incluindo tipos plurais de polinucleotídeos foram sequenciados e tipos plurais de sequências de nucleotídeo foram determinados. A montagem foi realizada com base na informação de tipos plurais assim obtidos de sequências de nucleotídeo para determinar a sequência de nucleotídeo de tamanho natural de 16SrDNA. A sequência de nucleotídeo do gene 16SrDNA da cepa 050572I9 é mostrada abaixo como a SEQ ID No: 1.

[51] A pesquisa por homologia BLAST foi conduzida com base na sequência de nucleotídeo do gene 16SrDNA da cepa 050572I9. Além disso, a sequência de nucleotídeo do gene 16SrDNA da cepa 050572I9 foi analisada

com ClustalW e os resultados de análise assim obtidos foram processados usando-se Tree View para fabricar um dendrograma da cepa 050572I9 (Figura 1). O dendrograma demonstrou a posição taxonômica da cepa 050572I9. Consequentemente, foi fortemente sugerido que a cepa 050572I9 é provável ser *Pseudomonas rhodesiae*.

3. Análise de propriedades bacterianas

[52] Os resultados da análise de sequência para o gene 16SrDNA no “2.” acima sugeriram que a cepa 050572I9 é altamente provável de ser um microorganismo pertencente ao gênero *Pseudomonas*, especialmente ser *Pseudomonas rhodesiae* ou *Pseudomonas fluorescens*. De modo a determinar as espécies da cepa 050572I9, suas propriedades micológicas foram examinadas pelo método dado como descrito mais tarde. As propriedades bacterianas da cepa 050572I9 são como segue. A mesma é uma bactéria Gram-negativa, na forma de bastão, que não forma esporo. O seu comprimento de célula total é de 2,0 a 2,5 μm , a largura total é 0,7 a 0,8 μm e a motilidade é observada. A mesma forma uma colônia circular lisa em um meio de caldo de ágar e produz pigmento fluorescente em um meio King B. O seu crescimento não é observado a 41° C. Ela é positiva quanto a atividade de catalase, oxidada no teste OF, negativa quanto a redução de sal de nitrato, negativa quanto a produção de indol, negativa quanto a atividade de urease, positiva quanto a degradação de gelatina, negativa quanto a atividade de β -galactosidase e negativa quanto a atividade de β -glicosidase. Além disso, no teste de LOPAT, a mesma é positiva quanto a produção de levan, negativa quanto a podridão do tubérculo da batata, negativa quanto a resposta hipersensível do tabaco, positiva quanto a atividade de oxidase e positiva quanto a degradação da arginina. Ela é negativa quanto a assimilação de amido. Como para a assimilação de compostos de carbono tal como açúcar e ácidos orgânicos, é positiva quanto a D-glicose, positiva quanto a L-arabinose, positiva quanto a D-manose, positiva quanto a D-manitol, positiva

quanto a N-acetil-D-glicosamina, negativa quanto a maltose, positiva quanto ao gliconato de potássio, positiva quanto ao ácido n-cáprico, negativa quanto ao ácido adípico, positiva quanto ao ácido dL-málico, positiva quanto ao citrato de sódio, negativa quanto ao acetato de fenila, positiva quanto à sacarose, positiva quanto a trealose, negativa quanto a adonit, positiva quanto ao sorbitol, positiva quanto ao ácido butírico, positiva quanto ao ácido propiônico e positiva quanto ao propileno glicol. Estes resultados estão resumidos em uma tabela como abaixo.

[Tabela 2]

	Cepa 050572I9 FERM BP-10912	<i>Pseudomonas rhodesiae</i> (cepa JCM11940)	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (cepa NRRC14160 cepa)
Forma da célula	Forma de bastão	Forma de bastão	Forma de bastão
Forma da colônia	Circular lisa	Circular lisa	Circular lisa
Tingimento Gram	–	–	–
Formação de esporo	–	–	–
Motilidade	+	+	+
Crescimento a 41°C	–	/	/
Atividade de catalase	+	/	/
Teste OF	Oxidação	Oxidação	Oxidação
Teste em meio King B	+	/	/
Redução de sal de nitrato	–	+	–
Produção de indol	–	–	–
Atividade de urease	–	–	–
Degradação de gelatina	+	+	–
Atividade de β -galactosidase	–	–	–
Atividade de β -glucosidase	–	–	–
Atividade de Levan	+	+	+
Podridão do tubérculo da batata	–	/	/
Resposta à hipersensibilidade do tabaco	–	/	/
Atividade de oxidase	+	+	+
Degradação da arginina	+	+	–
(Assimilação)			

Amido	–	–	–
D-glicose	+	+	+
L-arabinose	+	+	+
D-manose	+	+	+
D-manitol	+		
N-acetil-D-glicosamina	+	+	+
Maltose	–	–	–
Gliconato de potássio	+	+	+
Ácido n-cáprico	+	+	+
Ácido adípico	–	–	–
Ácido dL-málico	+	+	+
Citrato de sódio	+	+	+
Acetato de fenila	–	–	–
Sacarose	+	+	–
Trealose	+	+	+
Adonit	–	–	+
Sorbitol	+	+	+
Ácido butírico	+	+	–
Ácido propiônico	+	+	–
Propileno glicol	+	+	–

[53] Entre os itens na Tabela 2 acima, API20NE (bioMerieux Japan Ltd.) foi usado e o teste foi conduzido de acordo com o protocolo anexo para a redução de sal de nitrato, produção de indol, Teste OF, degradação de arginina, atividade de urease, degradação de gelatina, atividade de β -galactosidase, atividade de β -glicosidase, assimilação de D-glicose, assimilação de L-arabinose, assimilação de D-manose, assimilação de D-manitol, assimilação de N-acetil-D-glicosamina, assimilação de maltose, assimilação de gliconato de potássio, assimilação de ácido n-cáprico, assimilação de ácido adípico, assimilação de ácido dL-málico, assimilação de citrato de sódio e assimilação de acetato de fenila. Atividade de oxidase foi testada pelo uso de Oxidase Reagent (bioMerieux Japan Ltd.) e a atividade de catalase foi testada pelo uso de ID color Catalase (bioMerieux Japan Ltd.). Além disso, um meio King B usado no teste em meio King B foi da EIKEN CHEMICAL CO., LTD. O tingimento Gram foi realizado pelo uso de Color Gram 2 (bioMerieux Japan Ltd.). No teste de produção de levan, a cepa foi transferida riscando-se na placa plana de ágar Nutrient suplementada com 5 % de sacarose e cultivada por 3 dias a 25° C. Aquelas que formam uma colônia

branca e viscosa que foi elevada em uma forma cupuliforme grande foram determinadas como positivas.

[54] O teste da podridão do tubérculo da batata foi conduzido como segue.

[55] As batatas descascadas e fatiadas em rodela de 7 a 8 mm de espessura foram lavadas com água e embebidas em álcool, que foram depois rapidamente submetidas à esterilização em chama e colocadas em placas de Petri e mantidas sob uma condição úmida excessiva. As seções de batata de fatia redonda foram revestidas com uma solução bacteriana espessa e cultivadas por 2 dias a 25° C. Aquelas seções de batata em que a maior parte das seções inoculada com bactérias apodreceram foram determinadas como positivas e aquelas seções de batata em que apenas uma pequena parte da área inoculada apodreceu foram determinadas como negativas. Este teste foi conduzido pelo uso da variedade “Tokachi-kogane” como batatas de teste.

[56] Um teste de resposta hipersensível para tabaco foi conduzido como segue.

[57] Uma solução bacteriana foi injetada em mesófilo de tabaco (White Burley ou Bright Yellow) com uma seringa. Dois tipos de soluções bacterianas foram usados, isto é, soluções bacterianas com a concentração de bactérias de 1×10^8 células/ml e 1×10^9 células/ml, respectivamente. Os tabacos injetados com a respectiva solução bacteriana foram cultivados por 5 dias. Aqueles tabacos em que a parte infiltrada com a solução bacteriana sofreu de desidratação e tornaram-se marrons ou verde escuro foram determinados como positivos. Aqueles tabacos que não apresentaram nenhuma mudança ou que simplesmente tornaram-se amarelados foram determinados como negativos.

[58] O teste de assimilação de amido foi conduzido como segue. Primeiro, uma cepa foi transferida riscando-se em ágar Nutrient (contendo 35 g de ágar e 10 g de amido solúvel em 1 L de água) e cultivada por 2 a 3 dias a

30° C. Depois da cultura, solução de iodo de Lugol (contendo 0,1 g de iodo e 0,2 g de iodeto de potássio em 30 ml de água) foi vertida sobre o meio de ágar mencionado acima e a mesma foi determinada positiva quando uma parte transparente foi observada em torno da colônia bacteriana.

[59] A assimilação de compostos de carbono tais como açúcares e ácidos orgânicos foi testada como segue. 5 ml de um meio basal cuja composição é como descrita abaixo foram adicionados com 0,1 % em peso ou 0,2 % em peso de um composto de carbono (qualquer um de D-glicose, sacarose, trealose, adonit, sorbitol, ácido butírico, ácido propiônico e propileno glicol; 0,2 % em peso para D-glicose, sacarose, trealose, adonit e sorbitol e 0,1 % em peso para ácido butírico, ácido propiônico e propileno glicol), para preparar o meio. A célula bacteriana foi inoculada no meio assim preparado e cultivado por 2 a 3 dias (5 dias para o ácido butírico) a 30° C. Depois da cultura, a mesma foi determinada como positiva quando o crescimento bacteriano foi observado.

• Composição do meio basal (1 L)

Tampão de Na ₂ HPO ₄ 1 M e KH ₂ PO ₄ 1 M (pH 6,8)	40 ml
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,0 g
Solução de sal inorgânico de Hunter	20 ml
Água destilada	O restante

• Composição da solução de inorgânico de Hunter (1 L)

Ácido nitrilotriacético	10 g
MgSO ₄ •7H ₂ O	14,45 g
CaCl ₂ •2H ₂ O	3,335 g
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ •4H ₂ O	9,25 mg
FeSO ₄ •7H ₂ O	99 mg
Solução de estoque de sais (Metais "44")	50 ml

[60] O ácido nitrilotriacético foi dissolvido em água destilada e neutralizado com hidróxido de potássio, depois outros sais foram adicionados a isto.

• Solução de estoque de sais (composição para 100 ml)

EDTA	250 mg
ZnSO ₄ •7H ₂ O	1,095 mg

FeSO ₄ •7H ₂ O	500 mg
MnSO ₄ •H ₂ O	154 mg
CuSO ₄ •5H ₂ O	39,2 mg
Co(NO ₃) ₂ •6H ₂ O	24,8 mg
Na ₂ B ₄ O ₇ •10H ₂ O	17,7 mg

[61] De modo a demonstrar se a cepa 050572I9 é *Pseudomonas rhodesiae* ou *Pseudomonas fluorescens*, cepas conhecidas, a cepa JCM11940 de *Pseudomonas rhodesiae* e a cepa NBRC14160 de *Pseudomonas fluorescens* foram testadas quanto aos itens na Tabela 2 acima em uma maneira similar ao acima. Os resultados são mostrados na Tabela 2.

[62] A *Pseudomonas fluorescens* é conhecida ser patogênica para tomates e causa a necrose da polpa do tomate. Assim, de modo a examinar se a cepa 050572I9 tem tal patogenicidade para os tomates ou não, o seguinte teste foi conduzido.

[63] A cepa 050572I9 foi cultivada em um meio líquido até que A₆₀₀ (absorbância no comprimento de onda de 600 nm) atingisse 1,0 e a solução de cultura foi inoculada pela pulverização no colmo principal e parte do pecíolo concentrando na base do pecíolo de mudas de tomate. Depois de terem sido cultivadas por 7 dias, as mudas foram observadas e não houve nenhum traço de sintoma de necrose da polpa do tomate. As mudas também foram observadas depois de terem sido respectivamente cultivadas por 14 dias e 21 dias e também não houve traço de sintoma de necrose da polpa do tomate. Além disso, a solução de cultura mencionada acima da cepa 050572I9 foi inoculada para as mudas de tomate na parte que foi riscada e um teste similar foi conduzido, mas nenhum sintoma de necrose da polpa de tomate tampouco foi observado. Além disso, a solução de cultura mencionada acima da cepa 050572I9 foi inoculada pela injeção nas mudas de tomate usando uma seringa e um teste similar foi realizado. Do mesmo modo, o sintoma de necrose da polpa de tomate não foi observado.

[64] Os resultados da Tabela 2 revelou que a cepa 050572I9 diferiu da cepa NBRC14160 de *Pseudomonas fluorescens* com respeito da presença

ou ausência da degradação de gelatina, degradação ácida da arginina, assimilação de sacarose, assimilação de adonit, assimilação de ácido propiônico e assimilação de propileno glicol.

[65] Por outro lado, a cepa 050572I9 diferiu da cepa JCM11940 de *Pseudomonas rhodesiae* apenas com respeito da presença ou ausência da capacidade de redução para o sal de nitrato.

[66] Além disso, as formas de célula bacteriana foram observadas e foi revelado que a cepa 050572I9 (comprimento de célula total; 2,0 a 2,5 µm, largura de célula; 0,7 a 0,8 µm) e a cepa JCM11940 de *Pseudomonas rhodesiae* (comprimento de célula total; 2,0 a 2,5 µm, largura de célula; 0,7 a 0,8 µm) foram quase do mesmo tamanho, mas que a cepa NBRC14160 de *Pseudomonas fluorescens* (comprimento de célula total; 2,2 a 2,7 µm, largura de célula; 0,8 a 1,0 µm) foram levemente maiores do que a cepa 050572I9 tanto no comprimento quanto na largura.

[67] Além disso, diferente da cepa 050572I9 de *Pseudomonas fluorescens* não causou a necrose da polpa do tomate.

[68] A partir de uma revisão compreensiva dos resultados acima, a cepa 050572I9 foi considerada ser muito mais homóloga à *Pseudomonas rhodesiae* do que à *Pseudomonas fluorescens*. Portanto, a cepa 050572I9 foi identificada como *Pseudomonas rhodesiae*. Os presentes inventores chamaram a cepa 050572I9 como cepa 050572I9 de *Pseudomonas rhodesiae*. *Pseudomonas rhodesiae* é um microorganismo do Nível 1 de Bio Segurança.

[69] Os resultados de análise para a cepa 050572I9 usando API20NE foram procurados na base de dados do National Institute for Agro-Environmental Sciences. Porque os resultados da pesquisa indicaram a possibilidade da cepa 050572I9 ser *Pseudomonas marginalis* pv. *marginalis* mesmo que em uma probabilidade consideravelmente baixa de 9 %, o teste a seguir foi conduzido para verificar esta possibilidade examinando-se se a cepa 050572I9 é patogênica ou não para a acelga e alface para os quais a

Pseudomonas marginalis pv. *marginalis* é conhecida ser patogênica.

[70] Uma solução de cultura obtida submetendo-se a cepa 050572I9 a uma cultura líquida foi centrifugada e a célula bacteriana foi recuperada. A célula bacteriana coletada foi colocada em suspensão em água e água foi ainda adicionada a esta de modo a ajustar a A_{600} da suspensão de célula bacteriana para ser 1,0. As seções da nervura central das folhas da acelga foram imersas na suspensão de célula bacteriana. As seções foram tiradas da suspensão de célula bacteriana e incubadas por 4 dias a 28° C. As seções de acelga foram depois observadas, mas não houve nenhum traço de sintoma (ocorrência de manchas marrom esverdeadas submergidas) da podridão bacteriana da acelga que é uma doença cuja bactéria patogênica é a *Pseudomonas marginalis* pv. *marginalis*.

[71] Um teste similar foi conduzido pelo uso de alface ao invés de acelga, mas do mesmo modo não houve nenhum traço de sintoma (ocorrência de lesão submergida assim como cor marrom e expansão de nervura da folha) da podridão bacteriana da alface que é uma doença cuja bactéria patogênica é a *Pseudomonas marginalis* pv. *marginalis*. Além disso, como mostrado na Tabela 2 acima, a cepa 050572I9 não causou a podridão do tubérculo em batatas. Foi confirmada a partir destes fatos que a cepa 050572I9 não é da *Pseudomonas marginalis* pv. *marginalis*.

4. Preparação de suspensão de célula bacteriana

[72] A um frasco cônico de 300 ml de volume, 150 ml de um caldo de método padrão (0,25 % de extrato de levedura, 0,5 % de peptona, 0,1 % de glicose, pH 7,0) foram introduzidos e esterilizados por calor. A este, 0,1 ml da pré cultura da cepa 050572I9 de *Pseudomonas rhodesiae* (FERM BP-10912) foi inoculado e cultivados por 3 dias a 100 rpm a 30° C em um agitador com movimento de vaivém. Assim a solução de cultura obtida foi centrifugada para remover o sobrenadante. O precipitado foi lavado com água, para o que a centrifugação foi novamente conduzida, depois que o sobrenadante foi

removido e o precipitado foi lavado com água. A suspensão de célula bacteriana da cepa 050572I9 de *Pseudomonas rhodesiae* foi assim preparada.

5. Preparação de uma composição de pó umectável que controla doença de planta

[73] A suspensão de célula bacteriana preparada em “4.” acima foi secada por congelamento. A contagem de bactérias viáveis do material seco foi de $1,0 \times 10^{11}$ cfu/g. 10 partes em peso da célula bacteriana seca, 9 partes em peso do condensado de naftalenossulfonato formaldeído (sódio) e 81 partes em peso de sulfato de cálcio e um hidrato deste foram uniformemente misturados para se obter uma composição de pó umectável. A composição de pó umectável é um agente farmacêutico tendo a cepa 050572I9 de *Pseudomonas rhodesiae* como um ingrediente ativo.

[Exemplo de Teste 1]

Teste para avaliar o efeito controlador contra podridão mole bacteriana da alface (teste interno)

[74] A suspensão de célula bacteriana obtida em “4.” mencionado acima foi diluída com água para preparar uma solução de tratamento ($A_{600} = 0,1$). A solução de tratamento foi pulverizada sobre o corte de extremidade de uma folha cortada da nervura central da alface. Como um exemplo comparativo, uma diluição de 1000 vezes de pó umectável Biokeeper (marca registrada) (CENTRAL GLASS Co., Ltd.) foi pulverizada de uma maneira similar. Cada alface que foi submetida ao tratamento de pulverização foi incubada por 5 horas a 28° C sob uma condição umidificada. Uma suspensão aquosa ($A_{600} = 0,5$) de bactéria patogênica de podridão mole bacteriana da alface (*Erwinia carotovora*) foi inoculada ao corte de extremidade de cada alface, seguido pela incubação por 4 dias a 28° C. Subsequentemente, o grau de início de doença foi investigado de acordo com os seguintes padrões e a doença severidade e valor preventivo foram calculados com base nas fórmulas 1 e 2 abaixo.

Padrão 0: Nenhuma patologia observada

Padrão 1: A patologia é observada em menos do que 10 % das nervuras centrais das folhas

Padrão 2: A patologia é observada em 10 a 50 % das nervuras centrais das folhas

Padrão 3: A patologia é observada em 50 a 75 % das nervuras centrais das folhas

Padrão 4: A patologia excede 75 % das nervuras centrais das folhas

[Fórmula 1]

$$\text{Severidade da Doença} = \frac{(1 \times n1 + 2 \times n2 + 3 \times n3 + 4 \times n4)}{4 \times (\text{Número total de folhas pesquisadas})} \times 100$$

n1 a n4 representa o número de folhas que respectivamente corresponde aos padrões de 1 a 4.

[Fórmula 2]

$$\text{Valor Preventivo} = (1 - (\text{Severidade da doença na área tratada} / \text{Severidade da doença na área não tratada})) \times 100$$

[75] Os resultados do teste para avaliar o efeito controlador contra a podridão mole bacteriana da alface (teste interno) são mostrados na Tabela 3.

[Tabela 3]

	Inspeção da severidade da doença quanto a podridão mole bacteriana	
	Severidade da Doença	Valor Preventivo
<i>Pseudomonas rhodesiae</i> Cepa 05057219	20,0	72,4
Pó umectável Biokeeper	25,0	65,5
Não tratada	72,5	-

Como está evidente a partir da Tabela 3, a cepa 05057219 de *Pseudomonas rhodesiae* foi confirmada para demonstrar um valor preventivo de 72,4 e ter um efeito controlador superior contra a podridão mole bacteriana da alface. Além disso, a cepa 05057219 de *Pseudomonas rhodesiae* mostrou um valor preventivo mais alto do que aquele do pó umectável Biokeeper

(marca registrada) que usa *Erwinia carotovora* não patogênica.

[Exemplo de Teste 2]

Teste para avaliar o efeito controlador contra podridão mole bacteriana na acelga (teste de campo)

[76] A suspensão de célula bacteriana obtida em “4.” mencionado acima foi diluída com água para preparar uma solução de tratamento ($A_{600} = 0,1$). A solução de tratamento foi pulverizada sobre a acelga plantada fixadamente no campo. Como um exemplo comparativo, uma diluição de 1000 vezes de pó umectável Biokeeper (marca registrada) (CENTRAL GLASS Co., Ltd.) ou uma diluição de 1000 vezes de pó umectável Coppersin (marca registrada) (Meiji Seika Kaisha, Ltd.) foram pulverizados de uma maneira similar. O tratamento de pulverização foi conduzido duas vezes com o intervalo de 1 semana. No dia do primeiro tratamento de pulverização, uma suspensão aquosa ($A_{600} = 0,1$) de bactéria patogênica de podridão mole bacteriana na acelga (*Erwinia carotovora*) foi inoculada pela pulverização. 1 semana depois o segundo tratamento de pulverização, o grau de início de doença foi investigado de acordo com os seguintes padrões e a severidade da doença, taxa de início de cepa e valor preventivo foram calculados com base nas fórmulas 3, 4 e 5 abaixo.

Padrão 0: Nenhum início de doença

Padrão 1: O início de doença é observado em parte da folha externa

Padrão 2: O início de doença é observado em parte da folha externa e folha da ponta

Padrão 3: O início de doença é observado na maior parte da folha da ponta

[Fórmula 3]

$$\text{Severidade da Doença} = \frac{(1 \times n_1 + 2 \times n_2 + 3 \times n_3)}{3 \times (\text{Número total de folhas pesquisadas})} \times 100$$

n1 a n3 representam o número de cepas que respectivamente correspondem aos padrões de 1 a 3.

[Fórmula 4]

Taxa de início de cepa = (Número de cepas doentes/Número total de cepas pesquisadas) x 100

[Fórmula 5]

$$\text{Valor Preventivo} = 1 - \frac{\text{Severidade da doença (ou taxa de início de cepa) na área tratada}}{\text{Severidade da doença (ou taxa de início de cepa) na área não tratada}} \times 100$$

[77] Os resultados do teste para avaliar o efeito controlador contra podridão mole bacteriana em acelga (teste de campo) são mostrados na Tabela 4.

[Tabela 4]

	Inspeção de severidade de doença quanto a podridão mole bacteriana			
	Severidade da doença	Valor preventivo	Taxa de início de cepa	Nível de controle
Cepa 050572I9 de <i>Pseudomonas rhodesiae</i>	3,7	72,2	11,1	72,3
Pó umectável Biokeeper	10,0	25,0	30,0	25,0
Pó umectável Coppersin	3,3	75,0	10,0	75,0
Não tratada	13,3	—	40,0	—

[78] Como está evidente a partir da Tabela 4, a cepa 050572I9 de *Pseudomonas rhodesiae* tem um valor preventivo de 72,2 em relação à severidade da doença e um valor preventivo de 72,3 em relação à taxa de início de cepa, consequentemente a cepa 050572I9 de *Pseudomonas rhodesiae* foi confirmada ter um efeito controlador superior contra a podridão mole bacteriana na acelga. Além disso, o valor preventivo da cepa 050572I9 de *Pseudomonas rhodesiae* foi igual àquela do pó umectável Coppersin (marca registrada), um agente controlador químico tendo cloreto de cobre básico como um componente principal e foi muito mais alto do que aquele do pó umectável Biokeeper (marca registrada) usando *Erwinia carotovora* não patogênica.

[Exemplo de Teste 3]

Teste para avaliar o efeito controlador contra cancro cítrico (teste interno)

[79] A suspensão de célula bacteriana obtida no “4.” mencionado acima foi diluído com água para preparar uma solução de tratamento ($A_{600} = 0,1$). A solução de tratamento foi pulverizada nas folhas de cítrico (limão) que foram riscadas com uma faca cirúrgica. Como um exemplo comparativo, uma diluição de 1000 vezes de pó umectável (marca registrada) (Meiji Seika Kaisha, Ltd.) foi pulverizada em uma maneira similar e as folhas foram incubadas por 5 horas a 28° C sob uma condição umidificada. Uma suspensão aquosa ($A_{600} = 0,5$) de bactéria patogênica de cancro cítrico (*Xanthomonas campestris* pv. *citri*) foi inoculado no local de corte, seguido pela incubação por 7 dias a 28° C. Subsequentemente, o grau do início de doença foi investigado de acordo com os seguintes padrões e a gravidade da doença e o valor preventivo foram calculados com base nas fórmulas 6 e 7 abaixo.

Padrão 0: Nenhuma lesão é observada

Padrão 1: A lesão é raramente observada

Padrão 2: A lesão é observada

Padrão 3: a lesão é acetuadamente observada

[Fórmula 6]

$$\text{Severidade da Doença} = \frac{(1 \times n_1 + 2 \times n_2 + 3 \times n_3)}{3 \times (\text{Número pesquisado total})} \times 100$$

n_1 a n_3 representam o número de lesões que correspondem respectivamente aos padrões de 1 a 3.

[Fórmula 7]

Valor Preventivo = $(1 - (\text{Severidade da doença na área tratada} / \text{Severidade da doença na área não tratada})) \times 100$

[80] Os resultados do teste para avaliar o efeito controlador contra cancro cítrico (teste interno) são mostrados na Tabela 5.

[Tabela 5]

	Inspeção da severidade de doença para cancro cítrico
--	--

	Severidade da doença	Valor preventivo
<i>Pseudomonas rhodesiae</i> Cepa 050572I9	16,7	81,8
Pó umectável Agrept	54,2	40,9
Não tratada	91,7	—

[81] Como está evidente a partir da Tabela 5, a cepa 050572I9 de *Pseudomonas rhodesiae* foi confirmada demonstrar um valor preventivo de 81,8 e ter um efeito controlador superior contra cancro cítrico. Além disso, a cepa 050572I9 de *Pseudomonas rhodesiae* mostrou um valor preventivo acentuadamente mais alto do que o do pó umectável Agrept (marca registrada) que é um agente controlador químico que compreende sulfato de estreptomicina como um componente principal.

[Exemplo de Teste 4]

Teste para avaliar o efeito controlador contra cancro cítrico (teste de campo)

[82] A suspensão de célula bacteriana obtida no “4.” mencionado acima foi diluída com água para preparar uma solução de tratamento ($A_{600} = 0,05$). A solução de tratamento foi pulverizada completamente sobre uma árvore de laranja-da-baía. Como um exemplo comparativo, uma diluição de 1000 vezes de pó umectável Coppersin (marca registrada) (Meiji Seika Kaisha, Ltd.) foi pulverizada em uma maneira similar. O tratamento de pulverização foi ainda conduzido 10 dias depois que as flores caíram e uma vez depois de 2 a 3 semanas disto, isto é, 3 tratamentos de pulverização no total. 7 dias depois do tratamento de pulverização final, o grau do início de doença das folhas e frutas da laranja-da-baía foi investigado de acordo com os seguintes padrões e a severidade da doença, taxa de início de folha, taxa de início de fruta jovem e valor preventivo foram calculados com base nas fórmulas 8, 9, 10 e 11 abaixo.

Padrão 0: Nenhuma lesão é observada

Padrão 1: O número de lesões é de 1 a 3

Padrão 2: O número de lesões é de 4 a 10

Padrão 3: O número de lesões é de 11 a 20

Padrão 4: O número de lesões é de 21 ou mais

[Fórmula 8]

$$\text{Severidade da Doença} = \left| \frac{(1 \times n1 + 2 \times n2 + 3 \times n3 + 4 \times n4)}{4 \times (\text{Número total de folhas e frutas jovens pesquisadas})} \right| \times 100$$

$n1$ a $n4$ representam número de folhas e frutas jovens respectivamente que correspondem aos padrões de 1 a 4.

[Fórmula 9]

Taxa de início de folha = (número de folhas doentes/número total de folhas pesquisadas) x 100

[Fórmula 10]

Taxa de início de fruta jovem = (número de frutas jovens doentes/ número total de frutas jovens pesquisadas) x 100

[Fórmula 11]

$$\text{Valor Preventivo} = 1 - \frac{\text{Severidade da doença (ou taxa de início de cepa) na área tratada}}{\text{Severidade da doença (ou taxa de início de cepa) na área não tratada}} \times 100$$

[83] Os valores preventivos relativos à taxa de início de folha e à taxa de início de fruta jovem foram calculados em uma maneira similar.

[84] Os resultados do teste para avaliar o efeito controlador contra cancro cítrico (teste de campo) são mostrados na Tabela 6 (folha de cítrico) e Tabela 7 (fruta jovem de cítrico).

[Tabela 6]

	Folha de cítrico			
	Severidade da doença	Valor preventivo	Taxa de início de folha	Valor preventivo
<i>Pseudomonas rhodesiae</i> Cepa 05057219	4,1	72,5	12,5	67,5
Não tratada	15,0	—	38,6	—

[Tabela 7]

	Fruta jovem de cítrico			
	Severidade da doença	Valor preventivo	taxa de início de fruta jovem	Valor preventivo
<i>Pseudomonas rhodesiae</i> Cepa 05057219	13,3	77,5	32,1	60,7
Não tratada	59,2	—	81,8	—

[85] Como está evidente a partir das Tabelas 6 e 7, a cepa 05057219 de *Pseudomonas rhodesiae* foi confirmada demonstrar um valor preventivo

alto, em que o valor preventivo relativo à severidade da doença em folhas foi de 72,5 e o valor preventivo relativo à taxa de início de folha foi de 67,5. Além disso, a cepa 050572I9 de *Pseudomonas rhodesiae* foi confirmada demonstrar um alto valor preventivo, em que o valor preventivo relativo à severidade da doença em frutas jovens foi de 77,5 e o valor preventivo relativo à taxa de início de fruta jovem foi de 60,7.

[Exemplo de Teste 5]

Teste para avaliar o efeito controlador contra podridão mole bacteriana de alface (teste interno)

[86] A suspensão de célula bacteriana obtida no “4.” mencionado acima foi diluída com água para preparar uma solução de tratamento ($A_{600} = 0,05$). Além disso, uma suspensão de célula bacteriana foi preparada cultivando-se *Pseudomonas rhodesiae* JCM11940 em uma maneira similar ao “4.” mencionado acima. A partir desta suspensão de célula bacteriana, um pó umectável foi formulado e preparado em uma maneira similar ao “5.” mencionado acima. Este pó umectável foi diluído com água para preparar uma solução de tratamento ($A_{600} = 0,05$). Além disso ainda, uma suspensão de célula bacteriana foi preparada cultivando-se *Pseudomonas fluorescens* NBRC14160 em uma maneira similar ao “4.” mencionado acima, suspensão de célula bacteriana esta que foi depois diluída com água para preparar uma solução de tratamento ($A_{600} = 0,05$).

[87] A solução de tratamento na qual a suspensão de célula bacteriana obtida em “4.” foi diluída foi pulverizada na extremidade de corte de um corte de folha da nervura central das folhas de alface. Além disso, a solução de tratamento em que uma suspensão de célula bacteriana contendo *Pseudomonas rhodesiae* JCM11940 foi diluída foi pulverizada em uma maneira similar na extremidade de corte de um corte de folha da nervura central das folhas de alface. Além disso ainda, como um exemplo comparativo, a solução de tratamento na qual uma suspensão de célula

bacteriana contendo *Pseudomonas fluorescens* NBRC14160 foi diluída foi pulverizada em uma maneira similar na extremidade de corte de um corte de folha da nervura central das folhas de alface.

[88] Cada uma das alfaces tratadas por pulverização foi incubada por 5 horas a 25° C sob uma condição umidificada. Depois uma suspensão aquosa ($A_{600} = 0,5$) de bactéria patogênica de podridão mole bacteriana de alface (*Erwinia carotovora*) foi inoculada no local de corte, seguida por incubação por 5 dias a 25° C. Subsequentemente, o grau do início de doença foi investigado de acordo com os seguintes padrões e a severidade da doença e o valor preventivo foi calculado com base nas fórmulas 12 e 13 abaixo.

Padrão 0: Nenhuma patologia observada

Padrão 1: A patologia é observada em menos do que 10 % das nervuras centrais das folhas

Padrão 2: A patologia é observado em 10 a 50 % das nervuras centrais das folhas

Padrão 3: A patologia é observada em 50 a 75 % das nervuras centrais das folhas

Padrão 4: A patologia excede 75 % das nervuras centrais das folhas

[Fórmula 12]

$$\text{Severidade da Doença} = \left| \frac{(1 \times n1 + 2 \times n2 + 3 \times n3 + 4 \times n4)}{4 \times (\text{número total de folhas pesquisadas})} \right| \times 100$$

$n1$ a $n4$ representam o número de folhas respectivamente que correspondem aos padrões de 1 a 4.

[Fórmula 13]

Valor preventivo = $(1 - (\text{severidade da doença na área tratada} / \text{severidade da doença na área tratada})) \times 100$

[89] Os resultados do teste para avaliar o efeito controlador contra a podridão mole bacteriana de alface (teste interno) são mostrados na Tabela 8.

[Tabela 8]

	Inspeção da severidade da doença quanto a podridão mole bacteriana	
	Severidade da doença	Valor preventivo
<i>Pseudomonas rhodesiae</i> Cepa 05057219	15,0	82,9
<i>Pseudomonas rhodesiae</i> Cepa JCM11940	37,5	57,1
<i>Pseudomonas fluorescense</i> , Cepa NBRC14160	95,0	0,0
Não tratada	87,5	—

[90] Como está evidente a partir da Tabela 8, a cepa JCM11940 de *Pseudomonas rhodesiae* foi confirmada para demonstrar um valor preventivo de 57,1 e ter um efeito controlador contra podridão mole bacteriana de alface, embora o efeito seja inferior àquele da cepa 05057219 de *Pseudomonas rhodesiae*. Ao contrário, *Pseudomonas fluorescense*, que é uma espécie relacionada de *Pseudomonas rhodesiae*, demonstrou um valor preventivo de 0,0 e foi confirmada não ter nenhum efeito controlador contra a podridão mole bacteriana de alface.

[Exemplo de Teste 6]

Teste para avaliar o efeito controlador contra podridão bacteriana de alface (teste interno)

[91] A suspensão de célula bacteriana obtida no “4.” mencionado acima foi diluída com água para preparar uma solução de tratamento ($A_{600} = 0,05$). Nesta solução de tratamento, uma folha cortada centralizando na nervura central das folhas de alface foi imersa por 10 min. Como um exemplo comparativo, um tratamento de imersão similar foi conduzido pelo uso de uma diluição de 1000 vezes de pó umectável Vegikeeper (marca registrada) (CENTRAL GLASS Co., Ltd.). Cada folha de alface quimicamente tratada foi incubada por 5 horas a 25° C sob uma condição umidificada. Uma suspensão aquosa ($A_{600} = 0,01$) da bactéria patogênica da podridão bacteriana de alface (*Pseudomonas cichorii* PCL2001) foi inoculada em ambos os lados da seção transversal da seção de folha em 20 µl cada, seguida pela incubação por 5 dias a 25° C. Subsequentemente, a severidade da doença foi investigada

de acordo com os seguintes padrões.

Padrão 0: Nenhuma patologia observada

Padrão 1: O sintoma é observado em menos do que 10 % das nervuras centrais das folhas

Padrão 2: O sintoma é observado em 10 a 50 % das nervuras centrais das folhas

Padrão 3: O sintoma é observado em 50 a 75 % das nervuras centrais das folhas

Padrão 4: O sintoma excede 75 % das nervuras centrais das folhas

[Fórmula 14]

$$\text{Severidade da Doença} = \frac{(1 \times n_1 + 2 \times n_2 + 3 \times n_3 + 4 \times n_4)}{4 \times (\text{número total de folhas pesquisadas})} \times 100$$

n_1 a n_4 representam o número de folhas respectivamente que correspondem aos padrões de 1 a 4.

[Fórmula 15]

Valor preventivo = $(1 - (\text{Severidade da doença na área tratada} / \text{Severidade da doença na área não tratada})) \times 100$

[Tabela 9]

	Inspeção da severidade da doença quanto a podridão mole bacteriana	
	Severidade da doença	Valor preventivo
<i>Pseudomonas rhodesiae</i> Cepa 050572I9	2,5	87,5
Pó umectável Vegikeeper	5,0	75,0
Não tratada	20,0	—

[92] Como está evidente a partir da Tabela 9, a cepa 050572I9 de *Pseudomonas rhodesiae* foi confirmada demonstrar um valor preventivo de 87,5 e ter um alto efeito controlador contra podridão bacteriana de alface. Além disso, a cepa 050572I9 de *Pseudomonas rhodesiae* demonstrou um valor preventivo mais alto do que aquele do pó umectável Vegikeeper (marca

registrada).

[Exemplo de Teste 7]

Teste para avaliar o efeito controlador contra podridão negra em repolho (teste interno)

[93] A suspensão de célula bacteriana obtida no “4.” mencionado acima foi diluído com água para preparar uma solução de tratamento ($A_{600} = 0,05$). Nesta solução de tratamento, um corte de seção de folha da folha de repolho centrado na veia de folha foi imersa por 10 min. Como um exemplo comparativo, um tratamento de imersão similar foi conduzido pelo uso de uma diluição de 1000 vezes de pó umectável Vegikeeper (marca registrada) (CENTRAL GLASS Co., Ltd.). Cada folha de repolho quimicamente tratada foi incubada por 5 horas a 25° C sob uma condição umidificada. Uma suspensão aquosa ($A_{600} = 1,0$) da bactéria patogênica de podridão negra no repolho (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris* CAX303) foi inoculada em ambos os lados da seção transversal da seção de folha por 20 µl cada, seguida pela incubação por 8 dias a 25° C. Subsequentemente, o grau de severidade da doença foi investigado de acordo com os seguintes padrões.

Padrão 0: Nenhuma patologia observada

Padrão 1: O sintoma apenas emerge em uma parte da extremidade de corte

Padrão 2: O sintoma emerge até uma parte da nervura da folha

Padrão 3: O sintoma emerge por toda a nervura da folha

Padrão 4: O sintoma emerge por toda a nervura da folha e até a superfície da folha

[Fórmula 16]

$$\text{Severidade da Doença} = \frac{(1 \times n1 + 2 \times n2 + 3 \times n3 + 4 \times n4)}{4 \times (\text{número total de folhas pesquisadas})} \times 100$$

$n1$ a $n4$ representam o número de folhas respectivamente que correspondem aos padrões de 1 a 4.

[Fórmula 17]

Valor preventivo = $(1 - (\text{severidade da doença na área tratada} / \text{severidade da doença na área não tratada})) \times 100$

[Tabela 10]

Pó umectável sob teste	Inspeção da severidade da doença para a podridão mole bacteriana	
	Severidade da doença	Valor preventivo
<i>Pseudomonas rhodesiae</i> Cepa 050572I9	25,0	60,0
pó umectável Vegikeeper	45,0	28,0
Não tratada	62,5	—

[94] Como está evidente a partir da Tabela 10, a cepa 050572I9 de *Pseudomonas rhodesiae* demonstrou um valor preventivo de 60,0 e ter um alto efeito controlador contra podridão negra no repolho. Além disso, a cepa 050572I9 de *Pseudomonas rhodesiae* demonstrou um valor preventivo mais alto do que aquele do pó umectável Vegikeeper (marca registrada).

[Exemplo de Teste 8]

Teste para avaliar o efeito controlador contra o furo bacteriano do pêssgo (teste de campo)

[95] A suspensão de célula bacteriana obtida no “4.” mencionado acima foi diluído com água para preparar uma solução de tratamento ($A_{600} = 0,1$). A solução de tratamento foi pulverizada em toda uma árvore de pêssgo. O primeiro tratamento de pulverização foi conduzido exatamente depois que as flores caíram, os tratamentos de pulverização foram subsequentemente conduzidos nos 7 dias, 22 dias, 34 dias e 49 dias depois do primeiro tratamento, que resulta em 5 tratamentos de pulverização no total. 15 dias depois do segundo tratamento de pulverização, 6 dias depois do quarto tratamento de pulverização e 8 dias depois do último tratamento de pulverização, novos brotos em torno de GL-1 m das árvores foram investigados quanto aos números de folhas saudáveis e folhas doentes e o valor preventivo foi calculado.

[Tabela 11]

	Primeira inspeção		Segunda inspeção		Terceira inspeção	
	Taxa de início de folha (%)	Valor preventivo	Taxa de início de folha (%)	Valor preventivo	Taxa de início de folha (%)	Valor preventivo
<i>Pseudomonas rhodesiae</i> Cepa 05057219	13,3	64,9	27,4	55,3	15,3	50,4
Não tratada	38,0	—	61,2	—	30,8	—

[96] Como está evidente a partir da Tabela 11, a cepa 05057219 de *Pseudomonas rhodesiae* demonstrou um valor preventivo de cerca de 50 a 65 e ter um efeito controlador alto para pêssegos na estação de crescimento contra o furo bacteriano do pêssego.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para controlar uma doença de planta, caracterizado pelo fato de que uma formulação em pó, pó umectável, emulsão, formulação fluível ou formulação granular contendo *Pseudomonas rhodesiae* FERM BP-10912, ou uma variante de *Pseudomonas rhodesiae* FERM BP-10912 que tem as mesmas propriedades micológicas de *Pseudomonas rhodesiae* FERM BP-10912 e tem uma capacidade de controle contra doenças de plantas, é aplicada a uma planta e/ou solo da planta, e

em que a doença de planta é uma ou mais doenças de plantas selecionadas dentre cancro, furo bacteriano, podridão mole bacteriana, mancha bacteriana, mancha negra bacteriana, definhamento bacteriano, mancha da folha necrótica, necrose de breu, podridão bacteriana do grão, ferrugem bacteriana das mudas, ferrugem bacteriana das folhas, podridão bacteriana, e podridão negra.

FIG. 1

