

COMPOSICIÓN NEMATICIDA QUE COMPRENDE BACILLUS SUBTILIS

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere en general a composiciones que comprenden *Bacillus subtilis* con efecto nematicida contra fitonematodos en plantas y/o su hábitat, a su uso, a un proceso para su preparación, al uso de *Bacillus subtilis*, a prevenir, controlar, combatir y/o conferir inducción de resistencia hacia fitonematodos y a un kit. En particular, la invención se refiere a *Bacillus subtilis* (DSM 32324).

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La intensificación de la actividad agrícola ha provocado un desequilibrio ecológico que hace necesario el uso de productos selectivos que no afecten al equilibrio entre las plagas y sus depredadores, parasitoides y patógenos, responsables de gran parte del control biológico natural, ya que mantienen aceptables los niveles de población de las plagas (DENT, D., Insect pest management. Cambridge: Cabi Bioscience 2000).

Para revertir esta situación, se recomienda desarrollar programas de gestión integrada de plagas, definidos como un sistema de decisión para el uso de tácticas de control, aisladas o combinadas armónicamente en una estrategia de gestión basada en la relación coste/beneficio que tenga en

cuenta el interés y/o el impacto sobre los agricultores, la sociedad y el medio ambiente. Entre las medidas de control disponibles para estos sistemas de gestión se encuentran los nematodos entomopatógenos y los parasitoides de insectos, que cubren diferentes áreas del control biológico de plagas.

En el contexto actual de una sociedad moderna y ecológica, preocupada por la preservación del medio ambiente, el control biológico se considera una alternativa atractiva y/o un complemento a los métodos de control convencionales. El control biológico es el uso de un organismo (depredador, parásito o patógeno) que ataca a otro organismo que está causando daños económicos a los cultivos. Se trata de una estrategia muy común en los sistemas agro-ecológicos, así como en la agricultura convencional que se basa en el Manejo Integrado de Plagas (MIP).

Aunque el control biológico aporta respuestas positivas en la reducción o retirada del uso de pesticidas y en la mejora de los ingresos de los agricultores, el análisis del conjunto de experimentos en todo el mundo muestra que los resultados siguen concentrándose en sólo unos pocos cultivos. Aún queda mucho por desarrollar en las áreas de control de plagas y enfermedades.

Las enfermedades causadas por nematodos son muy difíciles de controlar y durante las últimas décadas se han probado diversos métodos, como variedades resistentes, rotación con cultivos no hospederos y aplicación de productos químicos

nematicidas. Sin embargo, las herramientas de gestión disponibles tienen una eficacia baja o no consiguen controlar las diferentes especies de nematodos que suelen encontrarse en una mezcla en el suelo. Los nematicidas químicos son compuestos
5 altamente tóxicos, que pueden causar graves daños al medio ambiente tras su uso excesivo. Las limitaciones en el uso de pesticidas químicos han aumentado el interés por los estudios sobre métodos alternativos de control de nematodos.

Ha habido un gran énfasis en la investigación sobre el
10 control biológico con el uso de bacterias que colonizan las raíces de las plantas, denominadas rizobacterias. Las rizobacterias beneficiosas para promover el crecimiento y/o actuar en el control biológico de las bacterias fitopatógenas se denominan rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal
15 o PGPR. Las PGPR aumentan la disponibilidad de nutrientes para la planta y pueden producir combinaciones y concentraciones de sustancias que favorecen el crecimiento.

La presión de la sociedad para que se sustituyan los nematicidas por productos aceptables para el medio ambiente o
20 prácticas ecológicas ha fomentado la búsqueda de métodos alternativos para controlar los nematodos. En este contexto, el control biológico se ha considerado una de las alternativas dentro de un enfoque integrado, en el que se busca garantizar el desarrollo sostenible de la agricultura. El uso de enemigos
25 naturales se ha convertido en un campo de investigación, que

puede actuar para reducir las poblaciones de nematodos por debajo del umbral de daños económicos.

Los riesgos que presenta el uso de pesticidas sintéticos para los seres humanos y el medio ambiente subrayan la necesidad de herramientas como el control biológico para optimizar los sistemas agrícolas sostenibles.

La solicitud de patente europea EP 0705807A1 se refiere a un preparado bacteriano para el acondicionamiento del suelo que comprende bacterias pertenecientes al género *Bacillus*, tales como *Bacillus subtilis* y *Bacillus licheniformis*. El preparado puede prevenir las lesiones en las raíces de los cultivos causadas por los nematodos.

La solicitud de patente brasileña BR PI 0604602-9A se refiere al uso de un *Bacillus subtilis* junto con *Bacillus licheniformes* para el control de los fitonematodos.

Siddiqui y Mahmood (1999) describen el papel de las bacterias en la gestión de los nematodos parásitos de las plantas demostrando que *Bacillus subtilis* y *Bacillus licheniformis* pueden ser útiles contra fitonematodos, tales como *Meloidogyne* spp., *Heterodera* spp. y *Rotylenchulus*.

WO2012/020014 se refiere a una composición que comprende *Bacillus subtilis* y *Bacillus licheniformis* con efecto nematocida contra los fitonematodos.

Sikora, R.A. (Interrelationship between plant health promoting rhizobacteria, plant parasitic nematodes and soil

microorganisms. Medicine Faculty Landbouww Rijksuniv Gent, Landbouww, v.53, n.2b, p. 867-878, 1988) observaron reducciones de la infección de *Meloidogyne arenaria*, *M. incognita* y *Rotylenchulus reniformis* de aproximadamente 60-65 % con el tratamiento de semillas de diversos cultivos con una cepa de *Bacillus*.

Aún se necesitan nuevos nematicidas con mayor seguridad y eficacia para proteger los cultivos de la infestación de nematodos.

Los inventores de la presente invención han procedido a un amplio análisis e investigación para resolver el objeto de proporcionar métodos biológicos de control de nematodos basados en la identificación de una cepa novedosa de *Bacillus subtilis*, que muestran diferentes modos de acción nematicida y tienen una eficacia probada en la disminución de la enfermedad por nematodos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención proporciona una composición para su uso como agente nematicida que comprende como principio activo un *Bacillus subtilis* que tiene las características de la cepa depositada en Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen con el número de acceso DSM 32324, o una variante de la misma, en donde la variante se obtiene utilizando la cepa depositada como material de partida, y en donde la variante ha conservado o mejorado aún más las propiedades nematicidas de

DSM 32324, y excipientes y/o portadores agroquímicamente aceptables.

Las composiciones que comprenden el *Bacillus subtilis* de la presente invención pueden presentarse en forma de un polvo
5 mojable o en forma de una formulación líquida y pueden tener un efecto nematicida contra los fitonematodos en las plantas y/o su hábitat, previniendo, controlando, combatiendo y/o confiriendo inducción de resistencia a los fitonematodos.

El objetivo de los estudios descritos en los ejemplos era
10 investigar el efecto de DSM 32324 sobre la penetración de los juveniles de nematodos en las raíces de las plantas basándose en la medición de la capacidad de formación de biopelículas y el efecto sobre el número de gales y huevos en las raíces de las plantas tras la inoculación de los nematodos y la
15 administración de la composición de la invención.

La invención describe y demuestra los beneficios de la cepa de *Bacillus subtilis* DSM 32324 en la mejora de la salud de las plantas a las que se ha administrado, demostrando efectos nematicidas.

20 **DEFINICIONES**

En general, los términos y frases utilizados en la presente tienen su significado reconocido en la técnica, el cual puede encontrarse consultando libros de texto estándar, referencias de revistas y contextos conocidos por los expertos
25 en la técnica. Las siguientes definiciones se proporcionan para

aclarar su uso específico en el contexto de la presente divulgación.

Tal y como se utilizan en la presente, las formas singulares "un", "una", "el" y "la" pretenden incluir también
5 las formas plurales, a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

Tal como se utiliza en la presente, el término "y/o" pretende significar el uso combinado ("y") y exclusivo ("o"), es decir, "A y/o B" pretende significar "A solo, o B solo, o A
10 y B juntos".

Composición: Tal como se utiliza en la presente, el término "composición" se refiere a una composición que comprende un portador y al menos una cepa bacteriana tal como se describe en la presente.

15 Control de las infecciones por fitonematodos: Tal como se utiliza en la presente, el término "control de las infecciones por fitonematodos" se refiere a un método y/o composición que inhibe parcial o totalmente las infecciones por fitonematodos en una planta. Por consiguiente, el término "control de las
20 infecciones por fitonematodos" significa que las infecciones por fitonematodos se reducen o se eliminan por completo y que mejora la salud general de la planta.

Cantidad efectiva/concentración/dosificación: Tal como se utilizan en la presente, los términos "cantidad efectiva",
25 "concentración efectiva" o "dosificación efectiva" se definen

como la cantidad, concentración o dosificación de la cepa o cepas bacterianas suficiente para mejorar la salud general de la planta y conferir beneficios similares a los demostrados en los ejemplos.

5 La dosificación efectiva real en cifras absolutas depende de factores que incluyen: el estado de salud de la planta en cuestión, otros ingredientes presentes. La "cantidad efectiva", la "concentración efectiva" o la "dosificación efectiva" de las cepas bacterianas pueden determinarse mediante ensayos
10 rutinarios conocidos por los expertos en la técnica. En los Ejemplos 3 y 4 se da un ejemplo de cantidad efectiva.

 Aislado: Tal y como se utiliza en la presente, el término "aislado" significa que las cepas bacterianas descritas en la presente se encuentran en una forma o entorno que no se da en
15 la naturaleza; es decir, la cepa está al menos parcialmente separada de uno o varios, o de todos, los componentes naturales con los que está asociada en la naturaleza.

 Nematodos parásitos de las plantas: Tal y como se utiliza en la presente, el término "nematodos parásitos de las plantas"
20 se refiere a los nematodos que viven como parásitos en las plantas y causan graves daños a una amplia variedad de cultivos, provocando un bajo rendimiento e importantes pérdidas económicas anuales. La palabra fitonematodos tiene el mismo significado, y los términos fitonematodos y nematodos parásitos
25 de plantas se utilizan indistintamente en esta solicitud.

Algunos ejemplos de nematodos parásitos de las plantas son, entre otros, los nematodos de nódulos de la raíz (*Meloidogyne* spp.), los nematodos del quiste (*Heterodera* y *Globodera* spp.) y los nematodos lesionadores (*Pratylenchus* spp.).

5 **BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS**

FIGURA 1

La Figura 1 muestra la formación de biopelículas y la cuantificación de DSM 33113 y DSM 32324. Las esporas se añadieron a MSgg a una OD₆₀₀ final de 0.05 y se incubaron a 30 °C durante 3 días en condiciones estáticas. A) Formación de la película después de 3 días de incubación. B) Cuantificación de la matriz de la biopelícula (película) con cristal violeta y absorbancia medida a 570 nm.

FIGURA 2

La Figura 2 muestra imágenes microscópicas de raíces de *A. thaliana* colonizadas por DSM 33113 y DSM 32324 a las 24 horas de la inoculación. Se inocularon células vegetativas con una OD₆₀₀ final de 0.05 a ½ Murashigue y Skoog que contenían una plántula de *Arabidopsis* de 7 días de edad y se incubaron a 22 °C durante 24 horas. A continuación, las raíces de las plantas se montaron en una almohadilla de agarosa con un cubreobjetos encima antes de la imagenología de microscopía.

FIGURA 3

La Figura 3 muestra el número de agallas incitadas por *M. incognita* en las raíces de *Arabidopsis* siete días después de

que las plantas fueran tratadas con células vegetativas de la cepa DSM 32324. Las plantas se sometieron a exposición con juveniles del segundo estadio del nematodo. A: Las barras representan la media de diez réplicas. ($p=0.07$)

5 FIGURA 4

La Figura 4 divulga: A) Número de huevos de *M. incognita* extraídos de las raíces de tomate cinco semanas después del tratamiento con DSM 32324 y de la inoculación del nematodo. B) Peso de la raíz fresca de las plantas de tomate.

10 FIGURA 5

La Figura 5 muestra el número de huevos de *M. incognita* extraídos de las raíces de tomate cinco semanas después del tratamiento con las cepas *B. paralicheniformis* DSM 33113 y *B. subtilis* DSM 32324 aplicadas solas o en combinación, y la
15 inoculación del nematodo.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS SECUENCIAS

SEQ ID NO: 1

SEQ ID NO: 1 es la secuencia del gen *purL* de *B. subtilis* DSM32324.

20 **DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION**

Rizobacterias

Los suelos albergan una compleja comunidad biológica, la mayoría de la cual está formada por microorganismos, procariotas y eucariotas, tanto en número como en diversidad.
25 Algunos procariotas tienen nichos ecológicos como la rizosfera

y/o el rizoplasma de las plantas, en donde se multiplican, sobreviven y se protegen de la acción antagonista de la microflora del suelo. Estos organismos se han denominado genéricamente rizobacterias.

5 En asociación con las plantas, las rizobacterias pueden tener un efecto deletéreo, nulo o beneficioso. Las que ejercen un efecto beneficioso, promoción del crecimiento y control biológico de enfermedades, se denominan PGPR ("rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal"). Se estima que sólo el
10 0.6 % de las rizobacterias tienen algún efecto beneficioso para la planta a la que están asociadas.

Las PGPR se han utilizado para el control biológico de las enfermedades de las plantas y aumentar así la productividad de los cultivos. Cómo y por qué se ejerce este control biológico,
15 sigue siendo un tema que necesita estudios complementarios.

En algunas situaciones, es posible que el control biológico se produzca por el antagonismo directo que ejercen las PGPR contra el patógeno, con participación de los mecanismos conocidos de antibiosis: producción de sustancias
20 antimicrobianas, parasitismo directo, competencia por nutrientes y nichos ecológicos. Las investigaciones han demostrado que ciertas PGPR parecen actuar como elicitores de la ISR (resistencia sistémica inducida), en el sentido de que la planta queda protegida sistémicamente contra más de un

patógeno, a diferencia del control biológico clásico, que pretende implementar el control de forma más específica.

Algunas rizobacterias producen metabolitos secundarios antagonistas que afectan al movimiento de los nematodos *in vitro*, mientras que otras inhiben la eclosión de los juveniles y el proceso por el que penetran en las raíces.

Un parámetro importante que afecta a la capacidad de las PGPR para infectar y colonizar la superficie de la planta es su capacidad para formar biopelículas.

La presente invención proporciona una excelente cepa de *Bacillus* formadora de biopelículas que produce un conjunto de metabolitos secundarios con efectos nematocidas que se han descrito en el estado de la técnica.

Las rizobacterias pueden inhibir a los nematodos parásitos de las plantas a través de diferentes métodos, tanto directos como indirectos. El antagonismo directo se basa en la síntesis de enzimas líticas, proteínas tóxicas, compuestos volátiles o parasitismo. El antagonismo indirecto se expresa a través de la competencia por los nutrientes, la inducción de resistencia sistémica (ISR) o la liberación de moléculas que modulan el comportamiento de los nematodos, incluyendo el reconocimiento, la alimentación y la relación de sexos.

Por lo tanto, el control que las rizobacterias ejercen sobre los nematodos puede aplicarse de diversas formas y afectar a distintas fases del ciclo vital de los nematodos:

- Huevo: los antibióticos y toxinas producidos por las bacterias de la rizosfera se difunden en el suelo y pueden ser absorbidos por los huevos de los nematodos, destruyendo las células e impidiendo su desarrollo embrionario.

5 - Incubación: las rizobacterias degradan los exudados radiculares que actúan como factor de incubación para muchas especies de nematodos, y existe la posibilidad de que los compuestos absorbidos por el huevo del nematodo lo inactiven o causen deformaciones durante el desarrollo que impidan la
10 eclosión.

- Objetivo y movilidad: La transformación de los exudados de la raíz en subproductos metabólicos de las rizobacterias puede hacer que el nematodo simplemente no reconozca el estímulo quimiotrópico, por lo que seguiría moviéndose
15 aleatoriamente y, finalmente, agotaría sus reservas de energía y moriría sin entrar en la raíz. Si el nematodo reconoce los exudados radiculares y se desplaza hacia las raíces, algunos compuestos bacterianos pueden presentar características nematostáticas y reducir la movilidad del nematodo para impedir
20 que alcance la raíz.

- Reconocimiento del hospedero: Las sustancias producidas por las rizobacterias son absorbidas por las raíces y pueden alterar su composición química, haciendo que los nematodos no reconozcan a su hospedero. También se cree que
25 las rizobacterias se unen a las lectinas de la superficie de

las raíces, que se caracterizan por ser el lugar de unión entre el nematodo y su hospedero vegetal, impidiendo así su reconocimiento.

- Penetración en la raíz: la toxina o repelente producido por las rizobacterias en alta concentración en la región del rizoplasma o en el contenido celular de la epidermis de las raíces, puede desalentar la penetración de los nematodos en la planta hospedera.

- Alimento: las rizobacterias, o sus productos metabólicos, pueden ser absorbidos por la planta y ésta, al percibir la presencia del nematodo, puede desencadenar una reacción de hipersensibilidad en las células gigantes, que es el principal mecanismo de resistencia del hospedero a los nematodos del género *Meloidogyne*. Esta resistencia, denominada resistencia sistémica, no es intrínseca a la planta, es decir, una reacción que se induce en ella por la presencia de PGPR.

- Reproducción: Algunas rizobacterias tienen un mayor efecto en la reducción de huevos que en la reducción del número de agallas, este puede ser uno de los mecanismos de funcionamiento.

La presente invención da a conocer una cepa de *Bacillus* que se ha identificado por albergar un conjunto de estas cualidades, lo que la convierte en un potente agente para el manejo de los nematodos parásitos de las plantas. Las principales características identificadas son, junto con la

capacidad de formar una biopelícula resistente, la capacidad de sintetizar surfactina, disulfuro de dimetilo y proteasas extracelulares, todos ellos metabolitos secundarios y actividades enzimáticas con efecto inhibidor demostrado contra los nematodos parásitos de las plantas. La combinación única de estos modos de acción en un único microorganismo tiene un gran potencial para interferir en el comportamiento de los nematodos alrededor de la rizosfera, reduciendo la penetración de los nematodos y su reproducción en el interior de la planta hospedera, como se muestra en los Ejemplos 3 y 4.

Bacterias del género *Bacillus*

Las rizobacterias formadoras de esporas tienen varias ventajas sobre los pesticidas químicos o incluso sobre otros agentes de control biológico: son fáciles de producir en masa, son fáciles de almacenar, son adaptables a la tecnología de formulación y no requieren manipulación genética.

Las rizobacterias formadoras de esporas pueden aplicarse tratando el sustrato, sumergiendo los sistemas radiculares de las plántulas en suspensiones bacterianas, regando la planta con suspensión bacteriana sumergiendo las semillas en suspensión de rizobacterias, o aplicando PGPR con el granulado de las semillas.

Un ejemplo de rizobacteria formadora de esporas es *Bacillus* spp. que ha atraído una gran atención en los últimos años debido a su inocuidad para el medio ambiente y a su

capacidad de ofrecer diferentes modos de acción para la supresión de la población de nematodos en el suelo.

Las especies de *Bacillus* son bacterias grampositivas que se caracterizan por tener paredes celulares gruesas y por la
5 ausencia de membranas externas, lo que las diferencia de las bacterias gramnegativas. Gran parte de las paredes de las bacterias grampositivas están compuestas de peptidoglicano.

Las especies grampositivas se dividen en grupos de acuerdo con sus características morfológicas y bioquímicas. El género
10 *Bacillus* pertenece al grupo de las bacterias formadoras de esporas. Las especies que forman estructuras de esporas resistentes a los cambios ambientales, soportan el calor seco y ciertos desinfectantes químicos durante periodos de tiempo moderados. Persisten durante años en tierra firme.

15 El efecto beneficioso de los bacilos, tales como, por ejemplo, *B. subtilis*, cuando se aplican cerca de la semilla o del suelo, no se debe únicamente al antagonismo que ofrecen a los patógenos. Las PGPR influyen positivamente en la germinación, el desarrollo y el rendimiento de los cultivos
20 debido a la producción de sustancias que favorecen el crecimiento vegetal (por ejemplo, compuestos orgánicos volátiles, fitohormonas) y la mejora de la nutrición vegetal (por ejemplo, solubilización del fósforo).

Uso de *Bacillus* spp. en el control de nematodos

Los nematodos parásitos de las plantas causan graves daños a una amplia gama de cultivos en todo el mundo, provocando un bajo rendimiento e importantes pérdidas económicas en la producción agrícola. Las pérdidas estimadas son de aproximadamente 100 mil millones de dólares anuales en todo el mundo en cultivos de importancia económica. Los nematodos de nódulos de la raíz (*Meloidogyne* spp.), los nematodos del quiste (*Heterodera* y *Globodera* spp.) y los nematodos lesionadores (*Pratylenchus* spp.) encabezan la lista de las especies más importantes desde el punto de vista económico y científico debido a su intrincada relación con las plantas hospedadoras, su amplio rango de hospedadores y el nivel de daños que produce la infección.

El uso de cultivares resistentes a los nematodos no siempre es posible debido a la falta de fuentes de resistencia para el fitomejoramiento, a la falta de adaptabilidad de los cultivares resistentes a determinadas regiones y temporadas de plantación, o a la ruptura de la resistencia en condiciones de campo. En general, no se recomienda el control químico de los nematodos porque no es muy eficaz; es caro, por los residuos que deja en los alimentos, y por la contaminación ambiental que provoca. Debido a estas desventajas, existe una creciente presión por parte de la sociedad para restringir el uso de productos químicos, lo que se traduce en una demanda por parte

de los agricultores de productos que sean, al mismo tiempo, no tóxicos para las personas y los animales, baratos, y que controlen de forma muy efectiva los nematodos.

5 Muchos microorganismos del suelo son conocidos como parásitos o depredadores de nematodos. La acción de estos microorganismos puede ser el resultado de un efecto directo o indirecto a través de la interferencia con los pasos del ciclo vital del patógeno.

Género *Meloidogyne*

10 Los nematodos del género *Meloidogyne* (nematodos de nódulos de la raíz) presentan una gran diversidad en los hospederos de plantas y están presentes en varias regiones del planeta, causando pérdidas en diferentes cultivos. El síntoma principal es la presencia de agallas en las raíces de las plantas. Estas
15 agallas son malformaciones o engrosamientos del sistema radicular. Las plantas afectadas están poco desarrolladas, tienen baja producción, defoliación precoz y decaimiento prematuro, y ocasionalmente puede producirse la muerte de la planta, con síntomas potenciados en condiciones de estrés por
20 nutrientes y sequía.

Inicialmente, los juveniles de segundo estadio (J2) de *Meloidogyne* penetran en las raíces y establecen un sitio de alimentación en la región del cilindro central de las raíces. A través del desarrollo de los nematodos, los J2 se diferencian
25 en machos o hembras adultos. Los machos adultos, abandonan el

sistema radicular, y las hembras permanecen en las raíces. Durante el desarrollo de la hembra de *Meloidogyne*, se ponen aproximadamente 500 huevos. Se depositan en una matriz gelatinosa fuera de las raíces de la que eclosionan los J2, con lo que reinfectan el sistema radicular. El ciclo vital de los nematodos de nódulos de la raíz es de aproximadamente cuatro semanas y puede prolongarse en condiciones de temperatura menos favorables. Las temperaturas inferiores a 20 °C o superiores a 35 °C y las condiciones de sequía o anegamiento del suelo reducen el desarrollo y la supervivencia del nematodo.

El control de *Meloidogyne incognita* y *M. javanica* puede realizarse con el uso de productos químicos que contengan determinados principios activos, tales como carbofurano, etoprosfos, aldicarb, metam-sodio o fenamifos, entre otros, dependiendo del cultivo de que se trate. La práctica de la rotación de cultivos también es importante en el control debido a la implantación de cultivos no hospederos, tales como el cacahuete, la piña, el arroz, o utilizar especies vegetales como cubierta vegetal también no hospedera, tal como la avena.

El nematodo *Meloidogyne exigua* es muy agresivo y está muy extendido en las plantaciones. Los diferentes métodos de control químico en zonas infestadas por *M. exigua*, incluyen el uso de productos químicos que contengan alguno de los principios activos terbufos o carbofurano, dependiendo del tipo

de cultivo. Entre los cultivos no hospederos destacan el algodón, los cacahuates, el arroz y la avena.

Al igual que *M. exigua*, *M. paranaensis* está muy extendido en los cafetales, pero no supone un gran problema en otros
5 cultivos. En cuanto a su control, se han obtenido resultados positivos con el hongo *Paecilomyces lilacinus*, que redujo las poblaciones de nematodos en las raíces del tomate "Santa Clara" en el invernadero.

El uso de rizobacterias en relación con el control
10 biológico ya es conocido. Sin embargo, el solicitante ha desarrollado actualmente una composición que comprende *Bacillus subtilis* DSM 32324, o una variante del mismo, con efecto nematicida contra los fitonematodos.

Por lo tanto, el primer aspecto de la invención se refiere
15 a la cepa novedosa descrita en la presente o a variantes de la misma para su uso como agente nematicida.

Es evidente para el experto en la técnica que, utilizando las cepas depositadas como material de partida, el lector experto puede, mediante métodos naturales de mejora de las
20 cepas o técnicas de re-aislamiento, obtener de forma rutinaria otras variantes o derivados de las mismas que conserven las características y ventajas relevantes descritas en la presente. Por consiguiente, el término "una variante de la misma" del primer aspecto se refiere a las cepas variantes obtenidas por
25 métodos naturales de mejora de las cepas utilizando la cepa

depositada como material de partida.

Los fitonematodos y/o los nematodos parásitos de las plantas se consideran en general cualquier nematodo que tenga un impacto negativo en los cultivos comerciales. Los nematodos que pueden combatirse utilizando la composición de la presente invención incluyen nematodos del género: *Meloidogyne*, *Pratylenchus*, *Heterodera*, *Globodera*, *Ditylenchus*, *Tylenchulus*, *Xiphinema*, *Radopholus*, *Rotylenchulus*, *Helicotylenchus* y *Belonolaimus*. Las especies del género *Meloidogyne* se consideran de especial relevancia, ya que son responsables de aproximadamente 95 % de todas las infestaciones en los cultivos, causando aproximadamente el 5 % de todas las pérdidas de cosechas en todo el mundo. La composición de la presente invención puede contener, además de los componentes activos, excipientes agroquímicos aceptables y/o vehículos de los mismos. La composición de la invención comprende además portadores, vehículos y/o adyuvantes agroquímicamente aceptables.

Los portadores, vehículos y/o adyuvantes agroquímicamente aceptables se consideran conocidos por el lector experto y pueden seleccionarse del grupo que consiste en, pero no se limita a, maltodextrina, dióxido de silicio, zeolita modificada, caolinita, lignina, almidón, quitosano y carbonato de calcio. En una realización preferida, los portadores, vehículos y/o adyuvantes agroquímicamente aceptables son maltodextrina y dióxido de silicio.

La composición de esta invención sirve particularmente para combatir los nematodos en las plantas de cultivo.

En una realización, la composición de la presente invención puede mezclarse con otros ingredientes relevantes en el campo agroquímico, incluyendo pero sin limitarse a un insecticida, fungicida, nematicida, bactericida, herbicida microbiano, biológico y/o químico, extracto de planta, regulador del crecimiento vegetal y/o fertilizante, presentes en una cantidad adecuada para beneficiar el crecimiento vegetal y/o conferir protección contra una infección patógena en una planta susceptible, un portador, un tensoactivo, un dispersante, enzima(s) y/o un extracto de levadura.

Entre los principales cultivos de plantas se encuentran: caña de azúcar, café, soya, algodón, maíz, papa, tomate, tabaco, plátano, arroz, trigo, aguacate, piña, calabacita, cacao, coco, avena, cebolla, lechuga, remolacha, zanahoria, yuca, frijol, girasol, pimiento, nabo, manzana, fresa, oca, rábano y cebolla.

En cuanto a la fruticultura, destacan: cítricos, uva, guayaba, papaya, higo, melocotón, ciruela y níspero; y en cuanto a la horticultura: berenjena y crucíferas.

En cuanto a la floricultura: rosa, crisantemo, lisianthus, gerbera, amarilis, begonia y celosia.

La presente invención se refiere a una composición que comprende *Bacillus subtilis* DSM 32324, o una variante del mismo, y a un kit que comprende la composición, o que se prepara

mediante el proceso de preparación de la composición, así como instrucciones y un recipiente adecuado.

También se proporciona un proceso para preparar una composición que comprende *Bacillus subtilis* DSM 32324, o una
5 variante del mismo, junto con portadores, vehículos y/o adyuvantes agroquímicamente aceptables, y el uso de dicha composición para controlar, combatir y/o conferir resistencia específica a los fitonematodos.

Además, la invención se refiere al uso de cantidades
10 efectivas de *Bacillus subtilis* DSM 32324, o una variante del mismo, en la fabricación de una composición agroquímica con efecto nematicida contra los fitonematodos en un cultivo vegetal, así como a procesos para controlar, combatir y/o conferir resistencia específica a los fitonematodos.

15 Las cepas de *Bacillus* relevantes de la presente invención se suministran en una forma comercialmente relevante conocida por el experto en la técnica. Por consiguiente, en una realización, las cepas de *Bacillus* de la composición están presentes en forma seca (por ejemplo, secada por aspersión) o
20 congelada.

La composición de la presente invención puede recubrir la semilla de la planta y puede incluir una cantidad de *Bacillus*, tal como, por ejemplo, esporas de *Bacillus subtilis* DSM 32324, de aproximadamente 1.0×10^2 UFC/semilla a aproximadamente 1.0×10^9 UFC/semilla. En otra realización de la presente invención,
25

la composición puede recubrirse sobre la semilla de la planta en una cantidad de *Bacillus*, tal como, por ejemplo, esporas de *Bacillus subtilis* DSM 32324, de aproximadamente 1.0×10^6 UFC/g de semilla a aproximadamente 1.0×10^{11} UFC/g de semilla.

5 La semilla vegetal puede incluir, pero no se limita a, la semilla de monocotiledóneas y dicotiledóneas, tales como la semilla de Cereales, Maíz, Maíz Dulce, Maíz Palomero, Maíz de Siembra, Maíz de Ensilaje, Maíz de Campo, Arroz, Trigo, Cebada, Sorgo, Hortalizas Brásicas, Brócoli, Col, Coliflor, Coles de
10 Bruselas, Repollo, Berzas, Hojas de Mostaza, Colirrábanos, Hortalizas de Bulbo, Cebolla, Ajo, Chalotes, Hortalizas de Fruto, Pimiento, tomate, Berenjena, Alquequenje, Tomatillo, Ocra, Uva, Hierbas/Especias, Hortalizas Cucurbitáceas, Pepino, Melón Cantalupo, Melón, Sandía, Calabacita, Sandía, Calabaza,
15 Berenjena, Hortalizas de Hoja, Lechuga, Apio, Espinacas, Perejil, Achicoria, Legumbres/Verduras (frijoles y chícharos suculentos y secos), Frijoles, Judías Verdes, Ejotes, Legumbres con Cáscara, Soya, Frijoles Secos, Garbanzos, Frijol Ancho, Chícharos, Garbanzos, Guisantes Partidos, Lentejas, Cultivos
20 de Semillas Oleaginosas, Canola, Ricino, Algodón, Lino, Cacahuete, Colza, Cártamo, Sésamo, Girasol, Soya, Hortalizas de Raíz, Tubérculo y Cormo, Zanahoria, Papa, Camote, Remolacha, Jengibre, Rábano Picante, Rábano, Ginseng, Nabo, Caña de Azúcar, Remolacha Azucarera, Hierba o Césped.

25 En una o más realizaciones, la semilla vegetal puede

incluir semillas de un grano seco, un maíz, un trigo, una soya, una canola, un arroz, un algodón, una hierba y un césped.

En una realización alternativa, el *Bacillus*, o la composición de la presente invención que comprende *Bacillus subtilis* DSM 32324, puede añadirse a: la tierra o el medio de crecimiento que rodea a la planta; la tierra o el medio de crecimiento antes de sembrar la semilla de la planta en la tierra o el medio de crecimiento; o la tierra o el medio de crecimiento antes de plantar la planta, el esqueje de la planta, el injerto de la planta o el tejido del callo de la planta en la tierra o el medio de crecimiento.

En una realización preferida, el *Bacillus*, o la composición de la presente invención que comprende *Bacillus subtilis* DSM 32324, se añade al suelo o al medio de crecimiento que rodea a la planta.

Cuando la composición de la presente invención se añade al suelo o al medio de crecimiento que rodea a la planta; al suelo o al medio de crecimiento antes de sembrar la semilla de la planta en el suelo o en el medio de crecimiento; o al suelo o al medio de crecimiento antes de plantar la planta, el esqueje de la planta, el injerto de la planta o el tejido del callo de la planta en el suelo o en el medio de crecimiento, la composición puede incluir una cantidad de *Bacillus*, tal como, por ejemplo, esporas de *Bacillus subtilis* DSM 32324, de aproximadamente 1.0×10^6 UFC/ml a aproximadamente 1.0×10^9

UFC/ml.

En una o más realizaciones, la planta, el esqueje vegetal, el injerto vegetal o el tejido del callo vegetal pueden incluir soya, frijol, ejote, trigo, algodón, maíz, pimiento, tomate, 5 papa, yuca, uva, fresa, plátano, cacahuate, calabacita, calabaza, berenjena, caña de azúcar y pepino.

Las composiciones que incluyen la cepa de *Bacillus* descrita en la presente pueden presentarse en forma de un líquido, un dispersión oleosa, un polvo, un polvo seco 10 humectable, un gránulo unttable o un gránulo seco humectable. Más específicamente, la composición puede ser, por ejemplo, un concentrado en emulsión (EC), un concentrado en suspensión (SC), una suspo-emulsión (SE), una suspensión en cápsula (CS), un gránulo dispersable en agua (WG), un gránulo emulsionable (EG), 15 una emulsión de agua en aceite (EO), una emulsión de aceite en agua (EW), una microemulsión (ME), una dispersión oleosa (OD), un fluido miscible en aceite (OF), un líquido miscible en aceite (OL), un concentrado soluble (SL), una suspensión de volumen ultrabajo (SU), un líquido de volumen ultrabajo (UL), 20 un concentrado dispersable (DC), un polvo mojable (WP), o cualquier formulación técnicamente viable en combinación con adyuvantes agrícolaemente aceptables.

La presente invención se refiere a una composición que comprende *Bacillus subtilis* DSM 32324, o variantes del mismo, 25 y a un kit que comprende la composición, o que se prepara

mediante el proceso de preparación de la composición, así como instrucciones y un recipiente adecuado.

También se proporciona un proceso para preparar una composición que comprende *Bacillus subtilis* DSM 32324, o
5 variantes del mismo, junto con portadores, vehículos y/o adyuvantes agroquímicamente aceptables, y el uso de dicha composición para controlar, combatir y/o conferir resistencia específica a los fitonematodos.

Además, la invención se refiere al uso de cantidades
10 efectivas de *Bacillus subtilis* DSM 32324, o variantes del mismo, en la fabricación de una composición agroquímica con efecto nematicida en un cultivo de plantas, así como procesos para promover la salud de las plantas.

En el contexto de la presente invención, por "variante de
15 la misma" debe entenderse un *Bacillus subtilis* con una alteración en los nucleótidos de tipo silvestre del genoma de un organismo (por ejemplo, *Bacillus subtilis* DSM 32324) que da lugar a cambios en el fenotipo de dicho organismo, en donde la alteración puede ser una delección de uno o más nucleótidos,
20 una sustitución de uno o más nucleótidos, una inserción de uno o más nucleótidos y/o una modificación de uno o más nucleótidos. En el contexto de la presente invención, una delección debe entenderse como una mutación genética que da lugar a la eliminación de uno o dos nucleótidos de la secuencia de
25 nucleótidos de tipo silvestre del genoma de un organismo; una

inserción debe entenderse como la adición de uno o más nucleótidos a la secuencia de nucleótidos de tipo silvestre; una sustitución (o mutación puntual) debe entenderse como una mutación genética en la que un nucleótido de la secuencia de nucleótidos de tipo silvestre se cambia por otro nucleótido; debe entenderse por desplazamiento del marco de lectura una mutación genética causada por la inserción o delección de un número de nucleótidos en una secuencia de nucleótidos de tipo silvestre que no es divisible por tres, cambiando por lo tanto el marco de lectura y dando lugar a una traducción completamente diferente del marco de lectura original; una introducción de un codón de parada debe entenderse como una mutación puntual en la secuencia de ADN que da lugar a un codón de parada prematuro; una inhibición de la unión de sustrato de la proteína codificada debe entenderse como cualquier mutación en la secuencia de nucleótidos que dé lugar a un cambio en la secuencia de la proteína responsable de impedir la unión de un sustrato a su sitio catalítico de la proteína. Además, debe entenderse por mutante con genes inactivados la mutación genética que da lugar a la eliminación o delección de un gen, tal como un gen entero o un marco de lectura abierto entero del genoma de un organismo.

Los algoritmos para alinear secuencias y determinar el grado de identidad de secuencia entre ellas son bien conocidos en la técnica. A efectos de la presente invención y a modo de

ejemplo, uno de estos algoritmos se basa en el alineamiento de ambas secuencias con el blastp proporcionado por el Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI) en <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov> aplicando unos ajustes de parámetros estándar (Matriz: BLOSUM62, Costes de hueco: Existencia: 11 Extensión:1, Ajuste condicional de la matriz de puntaje composicional) y posterior cuantificación de pares de aminoácidos idénticos en posiciones idénticas sobre las secuencias de aminoácidos alineadas. Se puede llevar a cabo un proceso similar para el alineamiento de secuencias de nucleótidos utilizando, en este caso, blastn tal y como lo proporciona el Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) en <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov> aplicando el parámetro estándar.

En una realización, la presente invención se refiere a una variante de *Bacillus subtilis* DSM 32324, en donde la identidad nucleotídica media (ANI) de la variante de *Bacillus subtilis* es al menos 99%, tal como, por ejemplo, al menos 99.5%, tal como, por ejemplo, al menos 99.8%, tal como, por ejemplo, al menos 99.9% idéntica al genoma de la cepa depositada en Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen con el número de acceso DSM 32324.

La presente invención comprende además los siguientes aspectos enumerados:

Aspecto 1. Un *Bacillus subtilis* que exprese el gen *purL*, en donde dicho gen *purL* está codificado por una secuencia que comparta al menos 95%, tal como, por ejemplo, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % de identidad de
5 secuencia con SEQ ID NO:1.

Aspecto 2. Un *Bacillus subtilis* de acuerdo con cualquiera de los aspectos anteriores, en donde el genoma de la cepa es al menos 99 %, tal como, por ejemplo, al menos 99.5 %, tal como, por ejemplo, al menos 99.8 %, como por ejemplo al menos
10 99.9 % idéntico al genoma de la cepa depositado en Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen con el número de acceso DSM 32324.

Aspecto 3. Un *Bacillus subtilis* de acuerdo con cualquiera de los aspectos anteriores que produce los metabolitos secundarios surfactina, fengicina, dimetil disulfuro y que
15 muestra actividad proteasa extracelular.

Aspecto 4. Un *Bacillus subtilis* de acuerdo con cualquiera de los aspectos anteriores que muestra una supresión mejor o igual de la enfermedad por nematodos en las plantas en
20 comparación con el efecto de la cepa de *Bacillus paralicheniformis* depositada en Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen con la el número de acceso DSM 33113, ya sea solo o en combinación con dicho *Bacillus subtilis*.

Aspecto 5. Una composición que comprende un *Bacillus subtilis* de acuerdo con cualquiera de los aspectos anteriores.

Aspecto 6. Una composición que comprende un *Bacillus subtilis* de acuerdo con cualquiera de los aspectos anteriores
5 1 a 5, y excipientes y/o portadores agroquímicamente aceptables.

Aspecto 7. Una composición que comprende un *Bacillus subtilis* de acuerdo con cualquiera de los aspectos anteriores
1 a 6 para su uso como nematicida que comprende como principio
10 la cepa depositada en Deutsche Sammlung von Mikroorganismen
und Zellkulturen con el número de acceso DSM 32324, o una
variante de la misma, en donde la variante se obtiene
utilizando la cepa depositada como material de partida, y en
donde la variante ha conservado o mejorado aún más las
15 propiedades nematicidas de DSM 32324, y excipientes y/o
portadores agroquímicamente aceptables.

Aspecto 8. La composición de acuerdo con cualquiera de los
aspectos anteriores 6 a 7, en donde dichos excipientes y/o
portadores agroquímicamente aceptables se seleccionan del
20 grupo que consiste en maltodextrina, dióxido de silicio,
zeolita modificada, caolinita, lignina, almidón, quitosano y
carbonato de calcio.

Aspecto 9. La composición de acuerdo con cualquiera de los
aspectos anteriores 5 a 8, en donde dicha composición se
25 presenta en forma de polvo humectable.

Aspecto 10. La composición de acuerdo con cualquiera de los aspectos anteriores 5 a 8, en donde dicha composición se presenta en forma de una formulación líquida.

Aspecto 11. La composición de acuerdo con cualquiera
5 de los aspectos anteriores 5 a 10, en donde dicha composición comprende un mínimo de 1×10^9 UFC/gramo de dicho *Bacillus subtilis*.

Aspecto 12. La composición de acuerdo con cualquiera de los aspectos anteriores 5 a 11, comprende además uno o una
10 combinación de un insecticida, fungicida, nematocida, bactericida, herbicida microbiano, biológico y/o químico, extracto de planta, regulador del crecimiento vegetal, y/o fertilizante, presente en una cantidad adecuada para beneficiar el crecimiento de la planta y/o conferir protección contra una
15 infección patógena en una planta susceptible, un portador, un tensoactivo, un dispersante, enzima(s) y/o un extracto de levadura, preferiblemente en donde el agente microbiano es una cepa de *Bacillus*.

Aspecto 13. Uso de una composición de acuerdo con
20 cualquiera de los aspectos 5 a 12 o de un *Bacillus* de acuerdo con cualquiera de los aspectos 1 a 4 como bionematocida y/o potenciador del crecimiento vegetal y/o promotor de la sanidad vegetal y/o controlador de enfermedades o plagas vegetales.

Aspecto 14. Uso de una composición, de acuerdo con el
25 aspecto 13, o de un *Bacillus* de acuerdo con cualquiera de los

aspectos 1 a 4, para controlar, combatir y/o conferir resistencia específica a los fitonematodos.

Aspecto 15. Uso de acuerdo con cualquiera de los aspectos 13 o 14, en donde los fitonematodos se seleccionan del grupo que consiste en *Meloidogyne*, *Pratylenchus*, *Heterodera*,
 5 *Globodera*, *Ditylenchus*, *Tylenchulus*, *Xiphinema*, *Radopholus*, *Rotylenchulus*, *Helicotylenchus* y *Belonolaimus*.

Aspecto 16. Uso de acuerdo con cualquiera de los aspectos 13 a 15, en donde el fitonematodo se selecciona del
 10 grupo que consiste en *Meloidogyne incognita*, *Meloidogyne javanica*, *Meloidogyne exigua*, *Meloidogyne paranaensis*, *Heterodera glycines* y *Pratylenchus zeae*.

Aspecto 17. Uso de acuerdo con cualquiera de los aspectos 13 a 16, en donde la composición de acuerdo con
 15 cualquiera de los aspectos 5 a 12, o el *Bacillus* de acuerdo con cualquiera de los aspectos 1 a 4, se aplica sobre una planta, una semilla o en el hábitat de una planta.

Aspecto 18. Uso de acuerdo con el aspecto 17, en donde la planta se selecciona del grupo que consiste en maíz, arroz,
 20 caña de azúcar, soya, papa, remolacha, zanahoria, café, tomate y plátano.

Aspecto 19. Proceso para prevenir, controlar y/o combatir fitonematodos en plantas y/o su hábitat, que comprende aplicar una cantidad efectiva de un *Bacillus* de cualquiera de

los aspectos 1 a 4, o una composición de acuerdo con cualquiera de los aspectos 5 a 12, en plantas y/o su hábitat.

Aspecto 20. Proceso para prevenir, controlar y/o combatir fitonematodos en plantas y/o su hábitat, que comprende
5 aplicar una cantidad efectiva de un *Bacillus* de cualquiera de los aspectos 1 a 4, o una composición de acuerdo con cualquiera de los aspectos 5 a 12, en los fitonematodos y/o su hábitat.

Aspecto 21. El proceso del aspecto 19 o 20, en donde la composición actúa disminuyendo la tasa de infestación de
10 los fitonematodos.

Aspecto 22. El proceso del aspecto 19 o 20, en donde la composición actúa reduciendo la penetración de los fitonematodos en las raíces de la planta.

Aspecto 23. Kit, que comprende la composición definida
15 en cualquiera de los aspectos 5 a 12, instrucciones de uso y un recipiente adecuado.

Aspecto 24. Una semilla de planta recubierta con una composición de acuerdo con cualquiera de los aspectos 5 a 12, presente en una cantidad adecuada para beneficiar el
20 crecimiento vegetal y/o conferir protección contra una infección patógena en una planta susceptible.

Aspecto 25. La semilla vegetal del aspecto 24, en donde la composición comprende una cantidad de esporas de *Bacillus subtilis* de acuerdo con cualquiera de los aspectos 1 a 4 de

aproximadamente 1.0×10^2 UFC/semilla a aproximadamente 1.0×10^9 UFC/semilla.

Aspecto 26. La semilla vegetal del aspecto 24, en donde la composición comprende una cantidad de esporas de *Bacillus subtilis* de acuerdo con cualquiera de los aspectos 1 a 4 de
5 aproximadamente 1.0×10^6 UFC/g de semilla a aproximadamente 1.0×10^{11} UFC/g de semilla.

Aspecto 27. La semilla vegetal del aspecto 24, en donde la composición comprende además uno o una combinación de un
10 insecticida, fungicida, nematocida, bactericida o regulador del crecimiento vegetal microbiano, biológico o químico, presente en una cantidad adecuada para beneficiar el crecimiento vegetal y/o conferir protección contra una infección patógena en una planta susceptible, preferiblemente
15 en donde el agente microbiano es una cepa de *Bacillus*.

Aspecto 28. Un *Bacillus* de acuerdo con cualquiera de los aspectos anteriores, en donde *purL* está codificado por SEQ ID NO:1 u homólogos de la misma.

Aspecto 29. Un método de tratamiento de una planta para
20 potenciar el crecimiento vegetal y/o promover la sanidad vegetal y/o controlar una enfermedad vegetal, en donde el método comprende el paso de aplicar una cepa de *Bacillus* de acuerdo con cualquiera de los aspectos anteriores 1 a 4, o el paso de aplicar una composición de acuerdo con cualquiera de
25 los aspectos anteriores 5 a 12, en donde dicho paso conduce a

una formación de biopelícula similar o a una formación de biopelícula similar cuando se compara con un método a) que comprende un paso de aplicación de una cepa de *Bacillus* depositada en Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen con el número de acceso DSM 33113, o b) que comprende un paso de aplicación de una composición que tiene una cepa de *Bacillus* depositada en Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen con el número de acceso DSM 33113.

10 Aspecto 30. El método de acuerdo con el aspecto 29 anterior, comprende además un paso de aplicación al suelo de una cepa de *Bacillus* de acuerdo con cualquiera de los aspectos 1 a 4 anteriores, o de la composición de acuerdo con cualquiera de los aspectos 5 a 12 anteriores.

15 Aspecto 31. El método de acuerdo con cualquiera de los aspectos 29 a 30 anteriores, en donde el paso de aplicar una cepa de *Bacillus* de acuerdo con cualquiera de los aspectos 1 a 4 anteriores, o la composición de acuerdo con cualquiera de los aspectos 5 a 12 anteriores, se aplica antes, durante o
20 después de que la planta o parte de la planta entre en contacto con el suelo.

 Aspecto 32. El método de acuerdo con cualquiera de los aspectos 29 a 31 anteriores, en donde la parte de la planta se selecciona del grupo que consiste en una semilla, una raíz, un cormo, un tubérculo, un bulbo y un rizoma.
25

Aspecto 33. Proceso para preparar una composición, como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende mezclar, en las relaciones deseadas, cantidades efectivas del *Bacillus subtilis* para aplicar, junto con
5 portadores, vehículos y/o adyuvantes agroquímicamente aceptables.

Los ejemplos ilustrativos que se presentan a continuación sirven para describir mejor la presente invención. Sin embargo, las formulaciones descritas se refieren meramente a algunos
10 medios para algunas realizaciones de la presente invención y no deben tomarse como limitativas del alcance de la misma.

EJEMPLOS

Se han realizado ensayos para evaluar los efectos nematocidas de la cepa de *Bacillus* de la invención tanto *in*
15 *vitro* como en condiciones de invernadero.

EJEMPLO 1

Colonización de raíces y formación de biopelícula:

El *Bacillus subtilis* DSM 32324 tiene la capacidad de formar una biopelícula resistente en la superficie de las
20 raíces de las plantas. La formación de biopelículas se analizó tanto *in vitro* en placas multipocillos como *in vivo* en las raíces de las plantas. La capacidad de la cepa *Bacillus subtilis* DSM 32324 para formar biopelículas se comparó con la cepa *Bacillus paralicheniformis* DSM 33113, otra rizobacteria
25 con capacidad para colonizar las raíces de las plantas. La

capacidad de formar biopelículas en condiciones *in vitro* del *Bacillus subtilis* DSM 32324 fue mayor que la del *Bacillus paralicheniformis* DSM 33113 (Figura 1). En la Figura 2 puede verse cómo se observó al microscopio la colonización de *Bacillus subtilis* DSM 32324 en la raíz de la planta *in vivo* y cómo se compara con la colonización de *Bacillus paralicheniformis* DSM 33113.

EJEMPLO 2

Producción de metabolitos secundarios:

Junto con la capacidad de formación de biopelículas de *B. subtilis* DSM 32324 de la invención es relevante investigar la producción de un conjunto de metabolitos secundarios cuyos efectos nematocidas ya han sido descritos en diferentes estudios científicos. Los principales efectos de estos metabolitos secundarios sobre los nematodos se describen aquí y también se resumen en la Tabla 1.

La surfactina es un compuesto lipopéptido cíclico con propiedades para la inhibición de la eclosión de huevos y el aumento de la mortalidad juvenil de *Meloidogyne* sp. (Kavitha et al., 2012). Cuando son producidas por bacterias que viven en asociación con las plantas, las surfactinas y las fengicinas desencadenan la respuesta inmunitaria de las plantas mediada por la inducción de hidroperóxidos y lipoxigenasa (Ongena et al., 2007).

El disulfuro de dimetilo puede reducir la movilidad de los juveniles de *M. incognita*, la incidencia de agallas y la reproducción del nematodo (Bui & Desaeger, 2021). El disulfuro de dimetilo está considerado como uno de los principales
 5 compuestos orgánicos volátiles (COV) con propiedades nematicidas y se ha explorado su uso como fumigante (Yin et al., 2021).

B. subtilis DSM 32324 también muestra actividad proteasa extracelular, que está ampliamente distribuida en las cepas de
 10 *Bacillus* con actividad nematicida, lo que sugiere que estas enzimas probablemente desempeñan un papel importante en las interacciones bacteria-nematodo-planta-entorno y que pueden servir como factores nematicidas importantes para equilibrar las poblaciones de nematodos en el suelo (Lian et al., 2007).
 15 Su función principal está vinculada a la degradación de la cutícula de los nematodos.

La cepa *B. subtilis* DSM 32324 alberga además el gen *purL* (99 % de identidad) que ha sido identificado como el gen responsable de mediar la actividad nematicida contra diferentes
 20 nematodos parásitos de las plantas como *Ditylenchus destructor*, *Bursaphelenchus xylophilus* y *Meloidogyne javanica* (Xia et al., 2011).

Metabolito bioactivo o	DSM 32324	Mecanismo descrito (referencia)
---------------------------	--------------	---------------------------------

	actividad enzimática		
5	Otros compuestos volátiles (es decir, disulfuro de dimetilo (DMDS), decanal, nonanona, metilbenceno, undecanona, etc.)	+++	Se ha demostrado que varios compuestos volátiles reducen el movimiento de los nematodos o tienen efectos nematocidas (Gu et al., 2007) DMDS muestra actividad nematocida al inducir estrés oxidativo en los nematodos (Bui & Desaegeer, 2021 y Yin et al., 2021)
10			
15	Familia de fengicinas LP	+++	Desencadenar la resistencia sistémica inducida (ISR), que protege a las plantas contra los ataques de microbios patógenos, virus y nematodos (Ongena et al., 2007)
20	Familia de surfactinas LP	+++	Desencadenar la resistencia sistémica inducida (ISR), que protege a las plantas contra los ataques de microbios patógenos, virus y nematodos (Ongena et al., 2007)

	Actividad proteasa	+++	Las proteasas que degradan la cutícula producidas por cepas de <i>Bacillus</i> mostraron actividad nematocida (Lian et al., 2007)
5	Vía de la biosíntesis de purinas (es decir, gen <i>purL</i>)	OK	La producción de intermediarios de la biosíntesis de purinas es importante para mantener la actividad nematocida (Xia et al., 2011)

10

Tabla 1. Lista de metabolitos y actividades enzimáticas de *B. subtilis* DSM 32324 con actividad bionematocida y mecanismos descritos relevantes. + significa que la actividad enzimática o el metabolito se producen en una concentración

15 baja, ++ significa que la actividad enzimática o el metabolito se producen en una concentración media, y +++ significa que la actividad enzimática o el metabolito se producen en una concentración alta en comparación con cepas de *Bacillus subtilis* previamente descritas.

20 EJEMPLO 3

Supresión de enfermedades por nematodos:

La supresión de nematodos en las plantas se evaluó en dos condiciones diferentes. En el primer experimento, las raíces de *Arabidopsis* se trataron con células vegetativas de DSM32324

25 que luego se inocularon con juveniles de *M. incognita*. El

objetivo del experimento era medir la capacidad de las bacterias para reducir la penetración del nematodo en las raíces en comparación con las raíces no tratadas. El *Bacillus subtilis* DSM 32324 reduce la penetración del nematodo en la planta, lo que sugiere que la capacidad de la cepa para formar una biopelícula resistente y su capacidad para producir metabolitos ayuda a proteger las raíces de la penetración de los nematodos y, por lo tanto, de la infección por nematodos (Figura 3).

Se realizó un segundo experimento en condiciones de invernadero. Se transfirió una plántula de tomate, de dos semanas de edad, a cada maceta y se empapó el área alrededor del tallo con 50 ml de suspensión de esporas DSM 32324 a una concentración de 10^6 esporas/ml. Cada planta se inoculó con 3000 huevos de *M. incognita* a través de dos orificios alrededor del tallo. Las plantas se mantuvieron en condiciones de invernadero, a 26 °C, durante cinco semanas. Para la evaluación del experimento, se levantaron las raíces, se limpiaron, se pesaron y se tomaron para las extracciones de nematodos. Las plantas tratadas con DSM 32324 presentaban una infestación menor y raíces más desarrolladas que las no tratadas (Figura 4).

EJEMPLO 4

Se estableció un experimento en invernadero para evaluar la eficacia de las cepas *B. paralicheniformis* DSM 33113 y *B.*

subtilis DSM 32324 en el control de nematodos cuando se aplican solas o en combinación. Las plántulas de tomate (variante "Tiny Tim" de *Solanum lycopersicum*), de dos semanas de edad, se transfirieron a macetas llenas de dos litros de tierra no estéril (una plántula por maceta). Tras trasplantar la plántula, se empapó el área alrededor del tallo de la planta con 50 ml de cada tratamiento. Los tratamientos consistieron en esporas suspendidas en agua a una concentración de 10^6 esporas/ml. Tras ser tratadas con las bacterias, cada planta se inoculó con 3000 huevos de *M. incognita* a través de dos orificios alrededor del tallo. Las plantas se mantuvieron en condiciones de invernadero, a 26 °C, durante cinco semanas. Para la evaluación del experimento, se levantaron las raíces, se limpiaron, se pesaron y se tomaron para la extracción de los huevos de nematodos. El número de huevos se utilizó como un parámetro del desarrollo de los nematodos en el interior de las raíces del tomate. El experimento se estableció en un diseño completamente aleatorizado con nueve réplicas biológicas por tratamiento. Los datos se sometieron a un ANOVA seguido de la prueba de agrupación de Tukey.

Conclusión

La cepa DSM 32324 tiene la capacidad de impedir la penetración del nematodo juvenil en las raíces del hospedero y, por lo tanto, de disminuir el desarrollo del nematodo en el interior de las plantas. Debido a los diferentes modos de

acción nematicida demostrados para DSM 32324 y a su eficacia probada en la disminución de la enfermedad por nematodos, esta cepa tiene el potencial de resolver la carencia de una buena herramienta para el control de diferentes especies de nematodos parásitos de las plantas.

DEPÓSITO Y SOLUCIÓN EXPERTA

El solicitante pide que una muestra de los microorganismos depositados que se indican a continuación sólo pueda ponerse a disposición de un experto, con sujeción a las disposiciones disponibles reguladas por las Oficinas de Propiedad Industrial de los Estados que son Parte en el Tratado de Budapest, hasta la fecha en que se conceda la patente.

Tabla 2: Depósitos realizados en una institución de depósito que haya adquirido la condición de autoridad internacional de depósito en virtud del Tratado de Budapest sobre el reconocimiento internacional del depósito de microorganismos a los fines del procedimiento en materia de patentes: *Instituto Leibniz DSMZ - Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares*, Inhoffenstr. 7B, 38124 Braunschweig, Alemania.

Cepa	Núm. de acceso	Fehca de depósito (D.M.Y)
<i>Bacillus subtilis</i>	DSM 32324	08.06.2016

SECUENCIAS

El listado de secuencias adjunto forma parte de la presente descripción.

Como se especifica en el mismo, las secuencias

5 SEQ ID NO: 1 es la secuencia del gen *purL* de *B. subtilis* DSM32324

	ATGTC	ACTAC	TGCTT	GAACC	AAGTA	AAGAA	CAAAT	AAAAG	AAGAG	AAACT
	GTATCAGCAA									
	ATGGG	TGTCA	GTGAT	GATGA	GTTTG	CATTG	ATAGA	AATCCA	TTCTT	GGAAG
10	ATTGCCGAAC									
	TACAC	AGAAA	TCGGA	ATTTT	TTCTG	TCATG	TGGTCT	GAGC	ATTGC	AGCTA
	CAAAA									
	AAAGC	CGATTC	TGCGT	AATTT	CCCGA	CAAGC	GGCGA	GCGTG	TGCTG	CAGGG
	GCCGGGAGAA									
15	GGCGCT	GGAA	TCGTT	GATAT	CGGTG	AATAAC	CAAGC	GGTTG	TGTTCA	AAAAT
	TGAATCACAT									
	AACCA	CCCAT	CAGCT	ATCGA	GCCTT	ACCAA	GGCGCT	GC	CTGGC	G
	CGGAATTATC									
	CGTGAT	GTAT	TCTCA	ATGGG	TGCAC	GTCCA	ATCGCT	GTAT	TGAACT	CTCT
20	TCGATTTGGT									
	GAAGT	GA	CTTT	CA	CCCCG	CGT	GAAGT	ACTTG	TTTGA	AGAAG
	TAGTAGCGGG									
	TATCGCCGGA									
	TACGG	CAACT	GTATC	GGCAT	TCCTA	CAGTC	GGCGG	GAGAAG	TGCAG	TTTGA
	CAGCAGCTAT									

25

	GAAGGAAATC	CGCTCGTCAA	CGCAATGTGC	GTCGGTTTAA	TCAACCATGA
	AGACATCAAA				
	AAAGGCCAGG	CAAAGGGTGT	CGGCAACACA	GTAATGTACG	TAGGAGCGAA
	AACAGGGCGT				
5	GACGGCATCC	ACGGCGCTAC	GTTTGCTTCT	GAAGAAATGT	CAGACTCGTC
	TGAAGAAAAG				
	CGTTCTGCTG	TCCAAGTCGG	CGATCCGTTT	ATGGAGAAGC	TTTTGCTTGA
	AGCATGTCTG				
	GAAGTCATCC	AATGCGACGC	CTTAGTCGGC	ATTCAGGATA	TGGGAGCTGC
10	CGGTTTAACA				
	AGCTCAAGTG	CAGAAATGGC	AAGTAAAGCC	GGTTCTGGCA	TTGAAATGAA
	CCTTGACCTG				
	ATTCCTCAGC	GCGAAACAGG	CATGACCGCG	TATGAAATGA	TGCTTTCTGA
	ATCACAAGAA				
15	CGGATGCTTT	TGGTTATTGA	GCGCGGACGT	GAGCAGGAAA	TCATCGATAT
	TTTTGACAAG				
	TACGATCTTG	AAGCGGTTTC	TGTCGGACAT	GTGACAGATG	ATAAAATGCT
	TCGCCTGACA				
	CACAAAGGAG	AGGTTGTGTG	CGAGCTGCCT	GTTGATGCCT	TGGCAGAAGA
20	AGCACCGGTT				
	TACCATAAGC	CTTCTCAAGA	GCCTGCTTAC	TATCGCGAGT	TTTTGGAAAC
	GGACGTTC CG				
	GCTCCGCAAA	TTGAAGATGC	GAATGAAACG	CTGAAGGCC	TTCTTCAGCA
	GCCGACGATT				
25					

	GCGAGCAAAG	AGTGGGTTTA	CGACCAGTAT	GACTACATGG	TGCGCACGAA
	TACAGTTGTC				
	GCTCCTGGGT	CTGATGCTGG	TGTTCTCAGA	ATCCGCGGAA	CGAAAAAGGC
	GCTGGCGATG				
5	ACGACAGACT	GTAACGCGCG	TTATCTCTAT	CTTGATCCTG	AAGTCGGCGG
	GAAAATTGCT				
	GTCGCTGAAG	CAGCGCGCAA	CATCATTTGC	TCAGGCGCAG	AACCGCTTGC
	GGTCACAGAT				
	AACCTTAACT	TCGGAAACCC	TGAGAAGCCG	GAAATCTTCT	GGCAGATCGA
10	AAAAGCGGCA				
	GACGGCATAA	GCGAAGCGTG	CAATGTTCTC	AGCACACCGG	TTATTGGCGG
	TAACGTATCG				
	CTTTATAACG	AATCAAACGG	CACGGCGATC	TATCCGACAC	CTGTTATCGG
	CATGGTCGGC				
15	TTAATTGAAG	ATACAGCACA	CATTACAACA	CAGCATTTCA	AACAAGCGGG
	AGATCTCGTA				
	TATGTGATCG	GCGAAACAAA	ACCAGAGTTT	GCCGGAAGCG	AGCTGCAAAA
	AATGACAGAA				
	GGCCGTATTT	ACGGCAAAGC	GCCGCAAATC	GATCTTGATG	TAGAGCTGTC
20	TCGTCAAAAA				
	GCACTGCTTG	ACGCGATTAA	AAAAGGCCTC	GTTCAATCTG	CGCATGATGT
	GTCTGAAGGC				
	GGCTTAGGCG	TAGCGATTGC	GGAAAGTGTC	ATGACGACGG	AAAACCTTGG
	CGCTAATGTG				
25					

	ACTGTAGAAG	GGGAAGCGGC	ATTATTATTC	TCTGAATCTC	AATCCCGCTT
	CGTCGTTTCA				
	GTGAAAAAAG	AACATCAAGC	AGCGTTTGAA	GCAGCTGTGA	AAGGTGCGGT
	TCATATTGGT				
5	GAGGTAACGG	CTGACGGAAT	TCTGGCGATT	CAAAACCAAG	ACGGACAACA
	AATGATTCAT				
	GCGCAAACGA	AAGAGCTTGA	ACGCGTATGG	AAAGGAGCTA	TCCCATGCTT
	GCTGAAATCA				
	AAGGCTTAA				

10

15

20

25

REFERENCIAS

Dent, D. (2000) Insect pest management. Cambridge: Cabi Bioscience

5 Sikora, R.A. (1988). Interrelationship between plant health promoting rhizobacteria, plant parasitic nematodes and soil microorganisms. Medicine Faculty Landbouww Rijksuniv Gent, Landbouww, v.53, n.2b, p. 867-878

Gu, Y. Q., Mo, M. H., Zhou, J. P., Zou, C. S., y Zhang, K. Q. (2007). Evaluation and identification of potential
10 organic nematicidal volatiles from soil bacteria. *Soil Biology and Biochemistry*, 39(10), 2567-2575.
<https://doi.org/10.1016/J.SOILBIO.2007.05.011>

Ongena, M., Jourdan, E., Adam, A., Paquot, M., Brans, A., Joris, B., Arpigny, J. L., y Thonart, P. (2007). Surfactin and
15 fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. *Environmental Microbiology*, 9(4), 1084-1090. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01202.x>

Lian, L. H., Tian, B. Y., Xiong, R., Zhu, M. Z., Xu, J.,
20 y Zhang, K. Q. (2007). Proteases from *Bacillus*: a new insight into the mechanism of action for rhizobacterial suppression of nematode populations. *Letters in Applied Microbiology*, 45(3), 262-269. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2007.02184.x>

Xia, Y., Xie, S., Ma, X., Wu, H., Wang, X., y Gao, X.
25 (2011). The *purL* gene of *Bacillus subtilis* is associated with

nematicidal activity. *FEMS Microbiology Letters*, 322(2), 99-107. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2011.02336.x>

Yin, N., Liu, R., Zhao, J.-L., Khan, R. A. A., Li, Y., Ling, J., Liu, W., Yang, Y.-H., Xie, B.-Y., y Mao, Z.-C. (2021).
 5 Volatile Organic Compounds of *Bacillus cereus* Strain Bc-cm103 Exhibit Fumigation Activity against *Meloidogyne incognita*. *Plant Disease*, 105(4), 904-911. <https://doi.org/10.1094/PDIS-04-20-0783-RE>

Bui, H. X., y Desaegeer, J. A. (2021). Volatile compounds
 10 as potential bio-fumigants against plant-parasitic nematodes - a mini review. *Journal of Nematology*, 53, 1-12. <https://doi.org/10.21307/jofnem-2021-014>

Kavitha, P. G., Jonathan, E. I., y Nakkeeran, S. (2012). Effects of crude antibiotic of *Bacillus subtilis* on hatching
 15 of eggs and mortality of juveniles of *Meloidogyne incognita*. *Nematologia Mediterranea*, 40, 203-206.

Z.A. Siddiqui, I. Mahmood. (1999). Role of bacteria in the management of plant parasitic nematodes: A review. *Bioresource Technology*, 69 (2), 167-179.
 20 [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(98\)00122-9](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(98)00122-9).

Se hace constar que con relación a esta fecha, el mejor método conocido por la solicitante para llevar a la práctica la citada invención, es el que resulta claro de la presente descripción de la invención.