

AGENTE DE CONTROL BIOLÓGICO

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a métodos para tratar o prevenir una enfermedad de las plantas, composiciones de control biológico y al uso de bacterias como agente de control biológico. En particular, la presente invención se refiere al uso de bacterias de la especie *Sphingobium xenophagum* como agente de control biológico para controlar una población de plagas, más específicamente para tratar o prevenir una enfermedad en una planta o semilla que lo necesite.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

En la agronomía moderna, las principales especies de plagas se han controlado principalmente con agentes químicos, es decir, pesticidas. Hoy en día, muchos de los nuevos pesticidas disponibles en el mercado son más selectivos y menos peligrosos que los compuestos más antiguos. Sin embargo, incluso los pesticidas más nuevos presentan varios problemas importantes. Estos incluyen: el desarrollo de resistencia en especies de plagas objetivo, la disminución del suministro de pesticidas sintéticos registrados y útiles, la deposición de residuos indeseables, el efecto perjudicial sobre especies no objetivo que resulta en brotes de plagas secundarias, las reacciones fitotóxicas inducidas en las plantas tratadas. Por lo tanto, cada vez es más claro que confiar únicamente en el control químico no será la solución al problema del manejo de plagas agrícolas. Por esta razón, muchos agricultores están explorando y adoptando métodos para reducir el uso de pesticidas.

Una alternativa al uso de agentes químicos es el control biológico. El control biológico es la manipulación intencional de poblaciones de organismos benéficos vivos (enemigos naturales) con el fin de limitar las poblaciones de plagas. De hecho, prácticamente todas las plagas tienen enemigos naturales y el manejo adecuado de dichos enemigos naturales puede controlar eficazmente muchas plagas. El objetivo del control biológico no es erradicar las

plagas, sino mantenerlas en niveles tolerables en los que no causen daños apreciables. Como tal, los agentes de control biológico pueden ser efectivos, económicos y seguros.

Desde hace muchos años, los agentes de control biológico se han utilizado para controlar plagas en cultivos. La mayoría de estos agentes se aislaron del suelo y se utilizan comercialmente para el control de plagas en el suelo (ver, por ejemplo, Postma et al. (2008) *Soilless culture: Theory and practice*, Tercera Edición Elsevier, p. 425-457; Vallance et al. (2010) *Agron Sustain. Dev.* 31, 191-203; Montagne et al. (2017) *Environ Chem Lett.* 15, 537-545). Sin embargo, hasta ahora, no se ha desarrollado ningún agente de control biológico específicamente para controlar las enfermedades de las raíces de las plantas en cultivos sin suelo. Desafortunadamente, los agentes de control biológico aislados del suelo a menudo carecen de eficacia para proteger a las plantas contra las enfermedades en cultivos sin suelo. La consecuencia es, por lo tanto, una mala adaptación de los agentes de control biológico comerciales a las condiciones sin suelo, en particular a las condiciones acuáticas, y a los parámetros que se encuentran en los sistemas sin suelo, como las estructuras de invernadero.

Además, los patógenos asociados con las condiciones particulares de los cultivos sin suelo pueden diferir ampliamente de los que se encuentran típicamente en los sistemas agrícolas clásicos basados en el suelo. De hecho, algunos patógenos de la raíz particularmente adaptados al agua pueden propagar rápidamente enfermedades en cultivos sin suelo. Esto es particularmente cierto para los patógenos Oomiceto que producen esporas flageladas, como *Pythium aphanídermatum* (Edson) Fitzp. Este patógeno causa la enfermedad de podredumbre de la raíz en la lechuga (Sutton et al. (2006) *Summa Phytopathol.* 32, 3017-321). Este problema puede ocurrir en hidroponía y acuaponía. En el sistema acuapónico, los pesticidas químicos no son aconsejables debido a la presencia de peces en el mismo circuito de agua que las plantas (Stouvenakers et al. (2019) *Aquaponics Food Production Systems*. Springer, Cham. 353-378).

Por lo tanto, existe un creciente interés por la identificación de nuevos agentes de control biológico para controlar las plagas en los cultivos, pero también adaptados a entornos de cultivo sin suelo, en particular hidroponía y acuaponía, que sean eficientes, pero también seguros para las plantas a tratar, para los operadores humanos, así como para el medio ambiente.

Identificar nuevos microorganismos para su uso como agente de control biológico, que sean al mismo tiempo eficientes y seguros, sigue siendo un desafío. Hasta ahora, las campañas de aislamiento destinadas a identificar microorganismos beneficiosos adaptados a cultivos sin suelo no lograron pasar a la comercialización, por ejemplo, porque no pudieron reducir la incidencia y los síntomas de la enfermedad, tuvieron un impacto negativo en la planta tratada o no fueron fáciles de usar (perjudiciales para los humanos o el medio ambiente).

En vista de lo anterior, existe una necesidad continua de obtener agentes de control biológico eficaces para tratar o prevenir enfermedades de las plantas, en particular en cultivos sin suelo, pero también en cultivos, para composiciones que los comprendan adaptados a usos comerciales y para un mejor control de plagas, en particular en cultivos sin suelo.

RESUMEN DE LA INVENCION

Los inventores han descubierto sorprendentemente que el uso de bacterias de la especie *Sphingobium xenophagum* como agente de control biológico para controlar una población de plagas supera los problemas de la técnica anterior.

Por lo tanto, la presente invención proporciona el uso de *Sphingobium xenophagum* como agente de control biológico.

En otro aspecto de la presente invención se proporciona además un método para tratar o prevenir una enfermedad de las plantas, que comprende suministrar a una planta o una semilla que lo necesite una cantidad eficaz de

Sphingobium xenophagum, y una composición de control biológico que comprende *Sphingobium xenophagum*, en donde la composición se selecciona del grupo que consiste en una composición de sustrato, una composición de nutrientes y una composición de control de plantas.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Tal como se utiliza en el presente documento y en las reivindicaciones, los términos “que comprende” y “que incluye” son inclusivos y abiertos y no excluyen elementos adicionales no mencionados, componentes de la composición o etapas de método. Por consiguiente, los términos “que comprende” y “que incluye” abarcan los términos más restrictivos “que consiste esencialmente en” y “que consiste en”.

Como se ha descrito anteriormente en el presente documento, la presente invención se refiere al uso de *Sphingobium xenophagum* como agente de control biológico.

Por el término “agente de control biológico”, se entiende, en el sentido de la presente invención, un organismo para controlar una población de plagas, es decir, un organismo que es eficaz para controlar una población de plagas. Se aprecia que, al hacerlo, el agente de control biológico es ambientalmente seguro, es decir, es perjudicial para la población de plagas objetivo, pero no daña a otras especies de una manera no específica. En otras palabras, por el término “agente de control biológico”, se entiende, en el sentido de la presente invención, un enemigo natural, antagonista o competidor, u otro organismo, utilizado para el control de plagas (ver la definición en el Glosario de términos fitosanitarios; ISPM 3, 1995; el ISPM 3 revisado, 2005; Convención Internacional de Protección Fitosanitaria (CIPF)).

En el contexto de la presente invención, los términos “plaga” y “patógeno” pueden utilizarse indistintamente para referirse a un organismo que puede invadir o colonizar una planta huésped y reducir la salud, el crecimiento, el

vigor y/o el rendimiento de la planta. A continuación, se proporcionan varios ejemplos de dichas plagas. Más concretamente, por el término “plaga”, se entiende, en el sentido de la presente invención, cualquier especie, cepa o biotipo de planta, animal o agente patógeno nocivo para las plantas o productos vegetales (ver la definición en el Glosario de términos fitosanitarios; FAO, 1990; ISPM 2 revisado, 1995; IPPC, 1997; CPM, 2012; Convención Internacional de Protección Fitosanitaria (IPPC)).

Los términos “controlar” y “proteger” en relación con una plaga se refieren a uno o más de reducir el crecimiento, la germinación, la reproducción y/o la proliferación de una plaga de interés, así como matar, eliminar, destruir o disminuir de otro modo la aparición y/o actividad de una plaga de interés.

La especie *Sphingobium xenophagum* tiene una amplia distribución y se puede aislar fácilmente de la naturaleza para su uso en la presente invención. Esta especie también se conoce como *Sphingomonas xenophaga* o *Sphingobium hydrophobicum*.

Las cepas preferidas son *Sphingobium xenophagum* con número de acceso LMG No. P-32737, LMG No. P-33173 y LMG No. P-33175, descritas en este documento y depositadas de conformidad con el Tratado de Budapest el 30 de junio de 2022 en las Colecciones Coordinadas Belgas de Microorganismos (BCCM, K.L. Ledeganckstraat 35, B-9000 Gent, Bélgica) con el número LMG No. P-32737, LMG No. P-33173 y LMG No. P-33175.

Otras cepas preferidas son la cepa SKN (DSM 14677; accesible al público - Colección alemana de microorganismos y cultivos celulares del Instituto Leibniz DSMZ) y la cepa BN6 (DSM 6383; accesible al público - Colección alemana de microorganismos y cultivos celulares del Instituto Leibniz DSMZ).

Estas cepas pueden cultivarse, por ejemplo, en el conocido medio Reasoner 2A (R2A) o en un medio rico en líquido (medio R) que contiene por cada litro de agua destilada: 10 g de peptona, 5 g de extracto de levadura, 5 g de extracto

de malta, 5 g de bacto-casaminoácidos, 2 g de extracto de carne, 2 g de glicerol y 1 g de MgSO_4 , como se describió anteriormente (Hamana et al. (2015) *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51, 1405-1417). Las cepas de *Sphingobium xenophagum* con número de acceso LMG No. P-32737, LMG No. P-33173 y LMG No. P-33175, pero también la cepa SKN (DSM 14677) y la cepa BN6 (DSM 6383) se pueden incubar a 28° C con agitación a 100 rpm durante 3 días en medio R. Los pellets bacterianos se pueden recuperar mediante centrifugación del medio de cultivo a 4000G durante 10 minutos. Los pellets se pueden enjuagar con tampón de fosfato de potasio 0.05 M más 0.05 % de Tween 80 (KPBT), centrifugar de nuevo y luego resuspender en KPBT. La concentración de las suspensiones se puede determinar mediante espectrofotómetro ajustado a 600 nm y a 1×10^9 ufc/ml en KPBT. Las cepas pueden almacenarse a -80° C en agua estéril con NaCl al 0.85 % más glicerol al 25 %.

Los inventores observaron sorprendentemente que el uso de *Sphingobium xenophagum* como agente de control biológico de acuerdo con la invención muestra mejores resultados en términos de eficacia, en particular en cultivos sin suelo, pero también en cultivos en suelo. Se observó que las bacterias de la especie *Sphingobium xenophagum*, en particular *Sphingobium xenophagum* con número de acceso LMG No. P-32737, LMG No. P-33173 y LMG No. P-33175, pero también la cepa SKN (DSM 14677) y la cepa BN6 (DSM 6383), son más eficientes para proteger las plantas contra plagas al reducir la incidencia y los síntomas de la enfermedad en comparación con los agentes de control biológico utilizados convencionalmente, así como en comparación con los fungicidas químicos.

Es necesario destacar que, aunque numerosos grupos de investigación han demostrado la inhibición del crecimiento de plagas de plantas por varios aislados de la rizosfera *in vitro*, estos resultados no son predictivos de la actividad de control biológico real *in vivo*, es decir, para tratar o prevenir una enfermedad causada por la plaga en una planta. Entre los métodos de cribado *in vitro* que se utilizan habitualmente para cribar la actividad antagonista de un

aislado candidato frente a un patógeno, se puede citar el sistema de cultivo en placa dual (Raymaekers et al. (2020) *Biol Control*. 144, 104240) o el ensayo de COVs de doble sujeción, TCVA (Cernava et al. (2015) *Front Microbiol*. 6, 398). Se utilizan habitualmente porque permiten el cribado de muchos aislados al mismo tiempo con un espacio mínimo necesario. Sin embargo, el experto sabe que estos resultados no predicen la complejidad de una actividad de control biológico *in vivo* para tratar o prevenir una enfermedad causada por la plaga en una planta. De hecho, hay muchos factores que pueden influir en la actividad de control biológico de un agente microbiano *in planta*, incluyendo el entorno circundante, la propia planta (su microbioma o su genoma, por ejemplo), la variabilidad de la agresividad de la plaga a lo largo del tiempo, el momento y las condiciones del tratamiento. Por ejemplo, la temperatura y la humedad a las que se realiza un ensayo antagónico *in vitro* pueden ser drásticamente diferentes de aquellas a las que una planta determinada puede crecer o una semilla puede germinar. Estas diferencias por sí solas explicarían por qué el antagonismo positivo *in vitro* no puede predecir como tal la actividad antagónica en sistemas más complejos, incluyendo las plantas huésped.

Además, *Sphingomonas*, y en particular *Sphingobium xenophagum*, están presentes en la microbiota de la raíz de varias especies de cultivos, en particular la microbiota de la raíz de la lechuga. Dada su presencia natural en la microbiota de la raíz, *Sphingobium xenophagum* espectrofotómetro ajustado a 600 nm y a 1×10^9 ufc/ml en KPBT. Las cepas pueden almacenarse a -80°C en agua estéril con NaCl al 0,85% más glicerol al 25%.

Además, *Sphingomonas*, y en particular *Sphingobium xenophagum*, están presentes en la microbiota de la raíz de varias especies de cultivos, en particular la microbiota de la raíz de la lechuga. Dada su presencia natural en la microbiota de la raíz, *Sphingobium xenophagum* se puede utilizar de forma segura sin el riesgo de introducir especies invasoras no nativas. Además, a diferencia de varias especies de bacterias que se han utilizado en la técnica anterior para prevenir enfermedades de las plantas, *Sphingobium xenophagum* no plantea un riesgo potencial para el medio ambiente y los usuarios finales.

Por lo tanto, el agente de control biológico de la invención también proporciona una solución más segura para el tratamiento o la prevención de enfermedades en plantas o semillas.

En una modalidad preferida de la invención, el *Sphingobium xenophagum* utilizado como agente de control biológico es un *Sphingobium xenophagum* con número de acceso LMG No. P-32737.

En otra modalidad preferida de la invención, el *Sphingobium xenophagum* utilizado como agente de control biológico es un *Sphingobium xenophagum* con número de acceso LMG No. P-33173.

En otra modalidad preferida de la invención, el *Sphingobium xenophagum* utilizado como agente de control biológico es un *Sphingobium xenophagum* con número de acceso LMG No. P-33175.

En otra modalidad preferida de la invención, el *Sphingobium xenophagum* utilizado como agente de control biológico es un *Sphingobium xenophagum* con número de acceso (número de colección de cultivo) DSM 14677.

En otra modalidad preferida de la invención, el *Sphingobium xenophagum* utilizado como agente de control biológico es un *Sphingobium xenophagum* con número de acceso (número de colección de cultivo) DSM 6383. Ventajosamente, de acuerdo con la presente invención, el *Sphingobium xenophagum* se elige en el grupo que consiste en *Sphingobium xenophagum* con número de acceso LMG No. P-32737, *Sphingobium xenophagum* con número de acceso LMG No. P-33173, *Sphingobium xenophagum* con número de acceso LMG No. P-33175, *Sphingobium xenophagum* con número de acceso (número de colección de cultivo) DSM 14677, *Sphingobium xenophagum* con número de acceso (número de colección de cultivo) DSM 6383, y mezclas de los mismos.

Preferentemente, el *Sphingobium xenophagum* de acuerdo con la invención no causa una enfermedad en la planta. El experto en la materia sabe bien cómo seleccionar bacterias *Sphingobium xenophagum* que no causen una enfermedad en la planta. Además, el hecho de no causar alguna enfermedad en la planta significativa se determina fácilmente, por ejemplo, incubando una planta con el *Sphingobium xenophagum* elegido y determinando si surge una enfermedad después de unos días.

Ventajosamente, el *Sphingobium xenophagum* de acuerdo con la invención se utiliza como agente de control biológico para tratar o prevenir una enfermedad en una planta o semilla que lo necesite.

El término “planta”, en el sentido de la presente invención, debe entenderse que incluye plantas de tipo silvestre y plantas que han sido modificadas por medio de reproducción convencional, mutagénesis, ingeniería genética o por una combinación de las mismas. También se entiende que, dentro del contexto de la presente invención, el término “planta” incluye tanto la planta entera como una parte de la planta. Ejemplos no limitantes de partes de la planta incluyen raíces, hojas, tallos y frutos.

El término “semilla”, en el sentido de la presente invención, debe entenderse que incluye semillas y propágulos de plantas de todo tipo. Ejemplos no limitantes incluyen semillas verdaderas, trozos de semillas, retoños, cormos, bulbos, tubérculos, granos, esquejes y similares.

El término “planta o semilla que lo necesite”, en el sentido de la presente invención, debe entenderse como cualquier planta o semilla que esté sana o que haya sido diagnosticada con una enfermedad o síntomas de la misma, o que sea susceptible a una enfermedad, o que pueda estar expuesta a una enfermedad o mediador de la misma.

Una observación importante es que la acción de control biológico de *Sphingobium xenophagum* puede observarse en diferentes etapas de

desarrollo de la planta, a saber, durante la germinación de la semilla y durante el crecimiento de la planta. Esta ventaja es beneficiosa para el cultivo de plantas en rotación, donde plantas de varias etapas de desarrollo pueden estar presentes en el mismo entorno de cultivo.

Ventajosamente, la enfermedad de la planta que se va a tratar o prevenir es una enfermedad de la raíz. Se observó que el efecto protector de *Sphingobium xenophagum* contra las enfermedades de la raíz no solo podía reducir la mortalidad de la planta, sino también reducir los síntomas de la enfermedad de la raíz a diferentes niveles, es decir, disminuir los síntomas de podredumbre de la raíz, así como limitar la disminución de la masa fresca foliar.

La enfermedad que se va a tratar o prevenir de acuerdo con la invención puede estar mediada por cualquier tipo de plaga. Preferentemente, la plaga se selecciona del grupo que consiste en hongos, oomicetos, bacterias, virus, viroides, organismos similares a virus, protistas, protozoos, nematodos, insectos y plantas parásitas. En una modalidad preferida, dicha plaga se selecciona del grupo que consiste en oomicetos, ascomicetos, basidiomicetos, mixomicetos, zigomicetos y bacterias. En una modalidad adicional, dicha plaga se selecciona de:

- Oomicetos, tales como:
 - i) Mildiú vellosa, como los del género *Phytophthora*, por ejemplo, *Phytophthora infestans*, *Phytophthora cinnamomi*, *Phytophthora fragariae*, del género *Peronospora*, por ejemplo, *Peronospora parasitica*, *Peronospora pisi*, *Peronospora belbahrii*, del género *Pseudoperonospora*, por ejemplo, *Pseudoperonospora cubensis*, del género *Bremia*, por ejemplo, *Bremia lactuae*, o del género *Plasmopara*, por ejemplo, *Plasmopara viticola*;
 - ii) del género *Pythium*, por ejemplo, *Pythium aphanidermatum*, *Pythium ultimum*, *Pythium oligandrum*, *Pythium irregulare*, *Pythium dissotocum*, *Pythium graminicola*, *Pythium spinosum*;
- Ascomicetos, tales como:

- i) mildiú polvoroso como el del género *Podosphaera*, por ejemplo, *Podosphaera xanthii*, *Podosphaera fusca*, *Podosphaera macularis*, del género *Blumeria*, por ejemplo, *Blumeria graminis*, del género *Erysiphe*;
- ii) Mohos tales como del género *Botrytis*, por ejemplo, *Botrytis cinerea*, del género *Penicilium*, por ejemplo, *Penicilium expansum*, *Penicilium italicum*, *Penicilium digitatum*, *Penicilium citrinum*, del género *Aspergillus*, por ejemplo, *Aspergillus falvus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillusoryzae*, del género *Cladosporium*, por ejemplo, *Cladosporium cucmerinum*, *Cladosporium elegans*;
- iii) del género *Septoria*, por ejemplo, *Septoria apiicola*, *Septoria tritici*, *Septoria lycopersici*;
- iv) del género *Alternaria*, por ejemplo, *Alternaria brassicicola*, *Alternaria solani*, *Alternaria alternata*;
- v) del género *Colletotrichum*, por ejemplo, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Colletotrichum capsici*, *Colletotrichum graminicola*, *Colletotrichum coccodes*, *Colletotrichum musae*, *Colletotrichum fragariae*;
- vi) del género *Sclerotinia*, por ejemplo, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotinia minor*, *Sclerotinia major*;
- vii) del género *Fusarium*, por ejemplo, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Fusarium graminearum*;
- viii) del género *Verticillium*, por ejemplo, *Verticillium dahlia*;
- ix) del género *Rhizoctonia*, por ejemplo, *Rhizoctonia solani*, *Rhizoctonia cerealis*;
- x) del género *Thielaviopsis*, por ejemplo, *Thielaviopsis basicola*;
- xi) del género *Cercospora*, por ejemplo, *Cercospora beticola*, *Cercospora arachidicola*;
- xii) del género *Didymella*, por ejemplo, *Didymella lycopersici*;
- xiii) del género *Venturia*, por ejemplo, *Venturia inaequalis*, *Venturia pyrina*;
- xiv) del género *Phoma*, por ejemplo, *Phoma lingam*;
- xv) del género *Pleospora*, por ejemplo, *Pleospora betae*;

- Basidiomicetos, tales como:
 - i) Tizón, como del género *Uromyces*, por ejemplo, *Uromyces beticola*, *Uromyces phaseoli*, del género *Puccinia*, por ejemplo, *Puccinia recondite*, *Puccinia striiformis*, *Puccinia porri*, *Puccinia alli* o del género *Tranzschelia*, por ejemplo, *Tranzschelia pruni*, *Tranzschelia discolor*;
- Mixomicetos, tales como:
 - i) del género *Plasmodiophora*, por ejemplo, *Plasmodiophora brassicae*;
- Zigomicetos, tales como:
 - i) del género *Mucor*, por ejemplo, *Mucor circinelloides*;
 - ii) del género *Rhizopus*, por ejemplo, *Rhizopus stolonifera*;
- Bacterias, tales como:
 - i) del género *Ralstonia*, por ejemplo, *Ralstonia solanacearum*;
 - ii) del género *Xanthomonas*, por ejemplo, *Xanthomonas campestris*, *Xanthomonas citri*, *Xanthomonas oryzae*;
 - iii) del género *Clavibacter*, por ejemplo, *Clavibacter michiganensis*;
 - iv) del género *Erwinia*, por ejemplo, *Erwinia amylovora*;
 - v) del género *Pseudomonas*, por ejemplo, *Pseudomonas syringae*;
 - vi) del género *Xylella*, por ejemplo, *Xylella fastidiosa*.

En una modalidad preferida, la plaga pertenece a los Oomycetos. En una modalidad particular, la plaga se selecciona de los géneros *Pythium*, *Phytophthora*, *Peronospora*, *Pseudoperonospora*, *Bremia* y *Plasmopara*; más en particular, la plaga se selecciona del grupo formado por *Pythium aphanidermatum*, *Pythium ultimum*, *Pythium oligandrum*, *Pythium irregulare*, *Pythium dissotocum*, *Pythium graminicola*, *Pythium spinosum*, *Phytophthora infestans*, *Phytophthora cinnamomi*, *Phytophthora fragariae*, *Peronospora parasitica*, *Peronospora pisi*, *Peronospora belbahrii*, *Pseudoperonospora cubensis*, *Bremia lactuae* y *Plasmopara viticola*. En una modalidad más particular, la plaga es *Pythium aphanidermatum*.

El *Sphingobium xenophagum* de acuerdo con la invención puede utilizarse como agente de control biológico para tratar o prevenir una enfermedad en una planta que puede ser una planta ornamental o en una planta de cultivo. Ventajosamente, dicha planta es una planta de cultivo. Preferentemente, la planta de cultivo se selecciona entre las *Solanaceae*, por ejemplo, tomate, papa, berenjena o pimiento, las *Asteraceae*, por ejemplo, lechuga, achicoria o girasol, las *Brassicaceae*, por ejemplo, colza o repollo, las *Chenopodiaceae*, por ejemplo, remolacha o espinaca, las *Apiaceae*, por ejemplo, zanahoria, hinojo, perejil, apio o cilantro, las *Rosaceae*, por ejemplo, fresa, manzana, las *Poaceae*, por ejemplo, trigo, cebada o maíz, las *Cucurbitaceae*, por ejemplo, pepino, calabacín, calabaza o melón, las *Fabaceae*, por ejemplo, frijoles o guisantes, las *Alliaceae*, por ejemplo, cebolla, puerro o ajo o las *Lamiaceae*, por ejemplo, menta o albahaca. En una modalidad preferida, la planta de cultivo pertenece a las *Asteraceae*. Más en particular, la planta de cultivo es lechuga.

Las propiedades antes mencionadas de *Sphingobium xenophagum* hacen de este microorganismo una excelente opción como agente de control biológico en una amplia gama de sistemas de cultivo, incluyendo los sistemas de cultivo basados en suelo y los sistemas de cultivo sin suelo.

Los inventores han observado sorprendentemente que *Sphingobium xenophagum* es particularmente adecuado para su uso como agente de control biológico no sólo en cultivos sino también en un sistema de cultivo sin suelo, como la hidroponía o la acuaponía, en contraste con los agentes de control biológico disponibles comercialmente que han sido aislados del suelo y muestran una adaptación y eficacia deficientes a las condiciones acuáticas específicas de los sistemas de cultivo sin suelo.

Por el término “cultivo sin suelo”, se entiende en el sentido de la presente invención, un método de cultivo de plantas en cualquier medio distinto del suelo que sea adecuado para el crecimiento de plantas.

Por el término “sistema de cultivo sin suelo”, se entiende en el sentido de la presente invención, cualquier medio artificial para proporcionar a las plantas agua y nutrientes. Los sistemas de cultivo sin suelo pueden comprender además un sustrato para proporcionar soporte físico a las plantas. Ejemplos de sistemas de cultivo sin suelo incluyen la hidroponía y la acuaponía. Mientras que la hidroponía generalmente se refiere a sistemas para cultivar plantas mediante el uso de soluciones de nutrientes minerales a base de agua, la acuaponía se refiere a un sistema integrado que combina acuicultura (producción de peces) y producción de plantas hidropónicas en el mismo circuito de agua recirculada.

De manera ventajosa, como se explicó anteriormente, en el contexto de la invención, *Sphingobium xenophagum* se utiliza como agente de control biológico en un sistema de cultivo sin suelo, preferentemente en hidroponía o acuaponía. Se ha descubierto que *Sphingobium xenophagum* es particularmente adecuado para proteger a las plantas cultivadas en sistemas de cultivo sin suelo contra plagas, incluso más potente que el agente de control biológico registrado por la EPA *Pseudomonas chlororaphis* Tx-1. De hecho, se ha identificado *Sphingobium xenophagum* en la zona de la raíz de plantas cultivadas en sistemas de cultivo sin suelo.

Aunque no se desea limitarse a la teoría, parece que *Sphingobium xenophagum* es capaz de proteger a las plantas contra enfermedades de la raíz en sistemas sin suelo por otros medios que a través de la emisión de compuestos orgánicos volátiles (COVs). De hecho, mientras que los VOCs son de gran importancia por su capacidad de actuar como supresores de plagas de plantas en la filosfera o en sistemas agrícolas basados en el suelo, estos compuestos son generalmente poco solubles en agua y no pueden difundirse de manera eficiente en sistemas de cultivo sin suelo basados en agua, como la hidroponía o la acuaponía. Esto puede hacer que *Sphingobium xenophagum* sea particularmente adecuado para su uso como agente de control biológico para tratar o prevenir enfermedades de las raíces en sistemas de cultivo sin suelo.

Se cree que *Sphingobium xenophagum* confiere protección a las plantas a través de una variedad de mecanismos, incluyendo el parasitismo de patógenos de plantas, antibiosis, elicitación de defensas de las plantas y a través de la exclusión competitiva de patógenos.

En una modalidad particular de la invención, *Sphingobium xenophagum* se suministra directamente a una planta o semilla que lo necesita, lo que significa que *Sphingobium xenophagum* se aplica directamente a una semilla, una planta entera o una parte de la planta, típicamente el follaje, el tallo o las raíces.

En otra modalidad particular, *Sphingobium xenophagum* se suministra indirectamente a la planta o semilla que lo necesita, lo que significa que *Sphingobium xenophagum* se aplica al lugar en el que la planta o semilla está creciendo o puede crecer de modo que las bacterias suministradas puedan entrar en contacto preferentemente con dicha planta o semilla. Los ejemplos no limitantes de dicho lugar incluyen el suelo, el sustrato que rodea la planta o semilla y la solución nutritiva. Preferentemente, *Sphingobium xenophagum* se aplica a la composición de sustrato sin suelo que rodea la planta o semilla o a la composición de sustrato sin suelo en la que se cultivará la planta o semilla. Los ejemplos no limitantes de composiciones de sustrato sin suelo incluyen lana de roca, perlita y cocos.

En otra modalidad preferida, *Sphingobium xenophagum* se suministra a la solución nutritiva, preferentemente la solución nutritiva hidropónica o acuapónica en la que se cultivan o se cultivarán las plantas.

Entre las maneras adecuadas para suministrar *Sphingobium xenophagum* a la planta o semilla, se pueden mencionar en particular la pulverización (como la pulverización aérea o la pulverización terrestre), atomización, vaporización, empapado, riego, chorro, vertido, fumigación, inyección, pintura, tratamiento de semillas, recubrimiento, inmersión, remojo y similares mediante equipos convencionales tales como una bomba manual, un pulverizador de mochila, un pulverizador de pluma, y similares.

En el contexto de la presente invención, *Sphingobium xenophagum* puede suministrarse en forma sólida o en forma líquida.

En una modalidad particular, *Sphingobium xenophagum* se suministra en forma sólida. Ejemplos no limitantes de formas sólidas adecuadas incluyen: polvos, polvos finos, tabletas, pellets o formas granulares tales como gránulos, micromigas y migas regulares o mezclas de los mismos. Las formas sólidas deseadas incluyen formas granulares.

De acuerdo con una modalidad preferida de la presente invención, *Sphingobium xenophagum* se suministra en forma líquida. Ejemplos no limitantes de formas líquidas incluyen: soluciones, dispersiones tales como emulsiones y suspensiones, y espumas.

Las concentraciones, volúmenes y duraciones del suministro de *Sphingobium xenophagum* pueden variar dependiendo del tipo de planta o semilla y pueden ser determinados por un experto en la técnica. Sin embargo, preferentemente, *Sphingobium xenophagum*, como se detalla anteriormente, se suministra por lo menos en una concentración de entre 10^2 y 10^{12} UFC, preferentemente entre 10^6 y 10^{10} UFC por planta o semilla.

En otra modalidad particular de la invención, el *Sphingobium xenophagum* se suministra a una planta o semilla que lo necesita en combinación con por lo menos un agente de control biológico adicional. En una modalidad particular, el por lo menos un agente de control biológico adicional es una bacteria o un hongo.

Se entiende que *Sphingobium xenophagum*, como se describe en el presente documento, se puede suministrar a una planta o semilla que lo necesita como una exposición de dosis única o en exposiciones de dosis múltiples en diferentes momentos.

En una modalidad particular, *Sphingobium xenophagum*, como se describe en el presente documento, se suministra a una planta o semilla que lo necesita una o más veces durante el ciclo de crecimiento de la planta objetivo. Por ejemplo, en una modalidad, *Sphingobium xenophagum* se suministra a una planta o semilla en la primavera al comienzo de la temporada de crecimiento y/o en el otoño al final de las temporadas de crecimiento. En una modalidad, *Sphingobium xenophagum* se suministra a una planta antes de la cosecha de partes de la planta, como 1 semana, 2 semanas, 3 semanas o 4 semanas antes de la cosecha de la parte de la planta. En otra modalidad más, *Sphingobium xenophagum* se suministra a una planta o semilla después de la cosecha.

La presente invención se refiere además a un método para tratar o prevenir una enfermedad de las plantas, en el que dicho método comprende suministrar a una planta o semilla que lo necesite una cantidad eficaz de *Sphingobium xenophagum*, preferentemente *Sphingobium xenophagum* con número de acceso LMG No. P-32737 o con número de acceso LMG No. P-33173 o con número de acceso LMG No. P-33175 o con número de acceso (número de colección de cultivo) DSM 14677 o con número de acceso (número de colección de cultivo) DSM 6383, o mezclas de los mismos.

Ventajosamente, de acuerdo con el método de la presente invención, *Sphingobium xenophagum* se elige en el grupo que consiste en *Sphingobium xenophagum* con número de acceso LMG No. P-32737, *Sphingobium xenophagum* con número de acceso LMG No. P-33173, *Sphingobium xenophagum* con número de acceso LMG No. P-33175, *Sphingobium xenophagum* con número de acceso (número de colección de cultivo) DSM 14677, *Sphingobium xenophagum* con número de acceso (número de colección de cultivo) DSM 6383, y mezclas de los mismos.

En general, todos los aspectos de la presente invención discutidos en el presente documento en el contexto del uso de *Sphingobium xenophagum* como agente de control biológico se aplican *mutatis mutandis* a un método para tratar

o prevenir enfermedades de plantas, como se definió anteriormente, que comprende suministrar a una planta o semilla que lo necesite una cantidad efectiva de *Sphingobium xenophagum*, como se definió anteriormente.

La presente invención también proporciona composiciones de control biológico que comprenden *Sphingobium xenophagum* que son adecuadas para suministrar una cantidad efectiva de la bacteria de acuerdo con la invención a una planta o semilla que lo necesite.

Se entiende que todas las definiciones y preferencias, como se describió anteriormente, se aplican igualmente a todas las modalidades adicionales, como se describe a continuación.

Los inventores han descubierto que las composiciones de control biológico que comprenden *Sphingobium xenophagum*, como se detalló anteriormente, son particularmente adecuadas para tratar o prevenir una enfermedad en una planta o semilla que lo necesite.

Por lo tanto, la presente invención se refiere además a una composición de sustrato, una composición de nutrientes y una composición de control de plantas que comprende *Sphingobium xenophagum*, preferentemente *Sphingobium xenophagum* con número de acceso LMG No. P-32737 o con número de acceso LMG No. P-33173 o con número de acceso LMG No. P-33175 o con número de acceso (número de colección de cultivo) DSM 14677 o con número de acceso (número de colección de cultivo) DSM 6383, o mezclas de los mismos.

Ventajosamente, para una composición de control biológico de acuerdo con la presente invención, *Sphingobium xenophagum* se elige del grupo que consiste en *Sphingobium xenophagum* con número de acceso LMG No. P-32737, *Sphingobium xenophagum* con número de acceso LMG No. P-33173, *Sphingobium xenophagum* con número de acceso LMG No. P-33175, *Sphingobium xenophagum* con número de acceso (número de colección de

cultivo) DSM 14677, *Sphingobium xenophagum* con número de acceso (número de colección de cultivo) DSM 6383, y mezclas de los mismos.

En una modalidad particular, la composición de control biológico es una composición de sustrato sin suelo. Ejemplos no limitantes de composiciones de sustrato sin suelo incluyen lana de roca, perlita, turba, cocos o una combinación de los mismos.

En otra modalidad particular, la composición de control biológico es una composición de nutrientes hidropónicos o una composición de nutrientes acuapónicos.

En otra modalidad particular, la composición de control biológico es una composición de control de plantas que comprende un portador botánicamente aceptable, preferentemente un portador líquido acuoso como el agua. La composición de control de plantas se puede formular como un concentrado emulsionable, concentrado en suspensión, emulsión diluida, solución directamente pulverizable o diluible, pasta recubrible, emulsión diluida, polvo humectable, polvo dispersable, polvo, gránulo o cápsula. Preferentemente, la composición de control de plantas se selecciona de una formulación en polvo y una formulación acuosa.

Ventajosamente, la composición de control de plantas puede comprender además por lo menos un ingrediente adicional para mejorar la apariencia, el almacenamiento, el transporte, la manipulación y/o el rendimiento de la composición de control de plantas. Preferentemente, el ingrediente adicional es un ingrediente que no se produce de forma natural.

En algunas modalidades, la composición de control de plantas comprende uno o más de un agente estabilizador, un agente absorbente de humedad, un agente de atracción, un portador y/o un agente antiaglomerante.

En una modalidad particular, la composición de control de plantas comprende un agente estabilizador. El agente estabilizador sirve para prevenir o minimizar la descomposición, la degradación o la activación de las bacterias antes de su suministro a la planta o semilla. Los ejemplos de agentes estabilizadores incluyen silicato de calcio particulado.

En otra modalidad particular, la composición de control de plantas comprende un agente de absorción de humedad. El agente de absorción de humedad sirve para absorber la humedad de la formulación con el fin de mantener la formulación relativamente seca y evitar la formación de grumos o apelmazamientos en la formulación. Los ejemplos de agentes humectantes incluyen desecantes, tales como partículas o perlas de gel de sílice, y polímeros superabsorbentes, tales como poliacrilato de sodio. Otros ejemplos de agentes de absorción de humedad incluyen virutas de madera y bolitas de arcilla.

En otra modalidad particular, la composición de control de plantas comprende un agente de atracción. El agente de atracción puede ayudar a atraer la formulación a las plantas y/o semillas. Por ejemplo, el agente de atracción puede tener una carga electrostática neta positiva, de modo que sea atraído electrostáticamente a las plantas y/o semillas, que tienen una carga electrostática neta negativa. En algunos ejemplos, el agente de atracción puede incluir un mineral o una mezcla de minerales. En un ejemplo particular, el agente de atracción puede incluir una mezcla de minerales que incluye uno o más de los siguientes minerales: dióxido de silicio, óxido de aluminio, calcio, hierro, magnesio, potasio, sodio, fósforo, titanio, manganeso, estroncio, circonio, litio, rubidio, boro, zinc, vanadio, cromo, cobre, itrio, níquel, cobalto, galio, cesio, escandio, estaño y molibdeno. En otro ejemplo, el agente de atracción puede comprender piedra caliza cálcica.

En otra modalidad particular, la composición de control de plantas comprende un portador. El portador puede ser un almidón o harina adecuados. El portador puede seleccionarse de manera que no absorba cantidades significativas de

humedad, de modo que el portador no se aglomere. Los ejemplos de portadores que pueden ser adecuados incluyen harina de maíz y harinas de cereales como centeno, trigo, harina de arroz y harina de espelta. En ejemplos alternativos, el portador puede ser caolín. En otros ejemplos, el portador puede comprender leche en polvo o talco.

En otra modalidad particular, la composición de control de plantas comprende un agente antiaglomerante. Un ejemplo particular de un agente antiaglomerante es el óxido de magnesio. También se pueden emplear otros agentes antiaglomerantes conocidos por los expertos en la técnica en las formulaciones descritas en el presente documento.

En otra modalidad particular, la composición de control biológico puede comprender además un ingrediente activo adicional, como compuestos inductores de defensa de las plantas, agentes de control biológico, elementos nutricionales, fertilizantes, pesticidas y similares. Preferentemente, la composición de control biológico comprende un agente de control biológico adicional, siendo más preferentemente dicho agente de control biológico una bacteria o un hongo.

El experto en la materia apreciará que la concentración de *Sphingobium xenophagum* de acuerdo con la invención en la composición de control biológico puede variar dependiendo de las condiciones en las que se vaya a utilizar la composición (por ejemplo, clima, planta objetivo, entorno, método de suministro de la composición a la planta o semilla, etc.).

Los métodos para fabricar la composición de control de plantas también son un aspecto de la presente invención. Se entiende además que todas las definiciones y preferencias, como se describieron anteriormente, se aplican igualmente a todas las modalidades adicionales, como se describe a continuación.

La composición de control de plantas de la presente invención se puede preparar mediante una variedad de métodos conocidos en la técnica.

En una modalidad de la presente invención, el método para la fabricación de la composición de control de plantas, como se detalla anteriormente, comprende la mezcla íntima de *Sphingobium xenophagum* como se describió anteriormente y uno o más de un agente estabilizador, un agente absorbente de humedad, un agente de atracción, un portador y/o un agente antiaglomerante, como se detalla anteriormente, en una mezcla homogénea.

Se entiende que la persona experta en la técnica llevará a cabo dicha mezcla íntima de acuerdo con la práctica general, como, en particular, utilizando tiempos, velocidades, pesos, volúmenes y cantidades de lote óptimos.

Se entiende además que *Sphingobium xenophagum* puede introducirse en forma de suspensión, concentrado, emulsión o pasta, sin embargo, también puede estar presente en forma sólida, como polvos, pellets o gránulos para fabricar la composición de control de plantas.

La presente invención se refiere además a un método para tratar o prevenir una enfermedad de las plantas, en el que dicho método comprende suministrar la composición de control biológico que comprende *Sphingobium xenophagum* como se describe en el presente documento a una planta o semilla que lo necesite. Por ejemplo, la composición de control biológico de la invención se puede utilizar como un agente profiláctico para prevenir una enfermedad en una planta o semilla, en particular una enfermedad mediada por una plaga del género *Pythium*.

La presente invención proporciona además un método para tratar o prevenir una enfermedad en una planta o semilla que lo necesite, comprendiendo el método tratar un lote de semillas con la composición de control de plantas descrita en el presente documento y luego cultivar las semillas tratadas en plantas.

Estas y otras modalidades de la invención se indican en las reivindicaciones que se adjuntan. A continuación, se describirá la invención con más detalle con referencia a los siguientes ejemplos, que muestran modalidades no limitantes de diferentes aspectos de la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1: Aislamiento de cepas, medios y condiciones de crecimiento

Se aislaron cepas bacterianas del rizoplaneo de lechuga acuapónica. Las plantas de lechuga para el aislamiento del rizoplaneo fresco se cultivaron en el sistema acuapónico de caja PAFF de Gembloux Agro-Bio Tech, Universidad de Lieja (Bélgica) como se describió anteriormente (Stouvenakers et al. (2020) *Microorganisms* 8, 1-25). El agua del rizoplaneo se recolectó mediante sonicación de la raíz durante 10 minutos en un tampón de fosfato de potasio 0.05 M más 0.05 % de Tween 80 (KPBT). Las salas de crecimiento se ajustaron a un fotoperiodo día/noche de 18/6 h a 23 °C o 28 °C para todos los protocolos de aislamiento y periodos de incubación.

Las cepas de *Sphingobium xenophagum* recientemente identificadas de acuerdo con la invención se han depositado en las Colecciones Coordinadas Belgas de Microorganismos (BCCM, K.L. Ledeganckstraat 35, B-9000 Gent, Bélgica) con los números LMG No. P-32737, LMG No. P-33173 y LMG No. P-33175.

La identidad de cada cepa se confirmó mediante secuenciación de ADN 16S amplificado por PCR. Las extracciones de ADN se llevaron a cabo a partir de células bacterianas resuspendidas en agua Milli-Q estéril. Para empezar, se utilizó el kit FastDNA Spin con solución de lisis de células TC (MP Biomedicals, Illkirch-Graffenstaden, Francia), a partir de 200 µl de suspensión. Como se describe en Stouvenakers et al. (Primer caso de estudio de agentes de biocontrol microbiano aislados de acuaponía mediante la extracción de datos de secuenciación de alto rendimiento para controlar *Pythium aphanidermatum*

en lechuga. Microbial ecology, 5 de noviembre de 2022), el ADNr 16S se amplificó utilizando el cebador directo 16S A 1 y el cebador inverso 16S B 1. Las mezclas de PCR se prepararon utilizando el manual del kit MangoTaq™ DNA Polymerase (Bioline, Londres, Reino Unido). Los termocicladores se hicieron funcionar con un paso de desnaturalización inicial a 94 °C durante 2 minutos, seguido de 30 ciclos de 94 °C durante 1 minuto, 50 °C durante 1 minuto, 70 °C durante 2 minutos y una etapa de extensión final a 72 °C durante 10 minutos. Los productos de PCR se purificaron con el kit de purificación de PCR QIAquick (QIAGEN Benelux B.V., Amberes, Bélgica) antes de la secuenciación Sanger con los mismos cebadores en Macrogen Europe B.V. (Ámsterdam, Los Países Bajos). Las secuencias se ensamblaron utilizando el programa CAP3 (Huang y Madan (1999) *Genome Res.* 9, 868-877) y se ajustaron por calidad utilizando el software Chromas (<http://technelysium.com.au/wp/chromas>). Las secuencias editadas se anotaron mediante análisis BLASTN en comparación con la base de datos rRNA/ITS utilizando el sitio web de NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) para lograr la identificación más cercana con un mínimo de identidad del 97 %.

Ejemplo 2: Efecto de diferentes cepas de *Sphingobium xenophagum* en el control del marchitamiento de la lechuga mediado por *P. aphanidermatum* utilizando diferentes métodos de tratamiento de semillas.

Cribado *in vivo*

Para identificar aislados capaces de controlar el marchitamiento de la lechuga mediado por *Pythium aphanidermatum*, se desarrolló un ensayo de cribado *in vivo*. Se probaron dos métodos diferentes de tratamiento de semillas en un diseño experimental con microplacas de 96 pocillos.

Se utilizaron semillas orgánicas granuladas de lechuga (*Lactuca sativa*) var. Lucrecia RZ (Rijk Zwaan, Merksem, Bélgica) en microplacas de 96 pocillos (Greiner Bio-One B.V.B.A., Vilvoorde, Bélgica) a una densidad de una semilla por pocillo. Una columna de microplaca (8 pocillos) correspondía a una réplica.

Se probaron dos métodos para tratar las semillas en relación con la inoculación de *P. aphanidermatum*: preinoculación y biocebado (es decir, semillas preinoculadas cuya germinación se estabilizó con el tiempo). Cualquiera que fuera el método, las semillas se trataron con 10 µl de suspensión de aislado por semilla el día 0 (ver la siguiente sección para la preparación de suspensiones de aislado).

Para los tratamientos de preinoculación y bioimprimación, las oosporas del patógeno se añadieron 3 días después. Después del tratamiento de preinoculación, las microplacas se sellaron directamente con una película autoadhesiva. Para la bioimprimación, los pellets de semillas se dejaron secar bajo una campana de flujo laminar durante 30 minutos antes del sellado. Cualquiera que sea el método, las microplacas se sellaron después de la inoculación de *P. aphanidermatum* con una película autoadhesiva que se perforó con una aguja sobre cada pocillo para permitir el intercambio de aire. Las microplacas se incubaron a 23°C. Se establecieron condiciones de oscuridad antes de la inoculación del patógeno (es decir, solo para los tratamientos de preinoculación y bioimprimación) y luego se estableció un fotoperiodo día/noche de 18/6 horas. Siete días después de la inoculación de *P. aphanidermatum*, el marchitamiento de las semillas se puntuó de forma binaria. Las semillas muertas se puntuaron con 0, mientras que las semillas sanas con cotiledones emergidos se puntuaron 1. Al final del ensayo de selección, una cepa se consideró eficaz cuando se alcanzó un umbral de tasa de germinación del 37.5 % o 12.5 % en la preinoculación o bioimprimación, respectivamente.

Diferentes cepas de *Sphingobium xenophagum* con número de acceso LMG No. P-32737 (referencia de identificación: PB-30), LMG No. P-33173 (referencia de identificación: PB-31) y LMG No. P-33175 (referencia de identificación: PB-33), fueron probadas junto con cuatro controles en cada microplaca en una configuración de 1 columna (8 semillas) por control. Las semillas de control negativo (C-) fueron tratadas con tampón KPBT e inoculadas con la solución de sacarosa + Tween utilizada para la suspensión

de oosporas. Las semillas de control positivo (C+) fueron tratadas con tampón KPBT e inoculadas con oosporas. Las semillas de control fungicida (Cf) fueron tratadas con Proplant® (722 g/l de propamocarbo) a una concentración de 0.1 % en tampón KPBT e inoculadas con oosporas. Las semillas de control biofungicida (Cpc) se trataron como los aislados probados con suspensión de *Pseudomonas chlororaphis* Tx-1 (ATCC 55670 de la Colección Americana de Cultivos Tipo) e inoculadas con oosporas.

Producción de inóculo de *P. aphanidermatum*

Matraces Erlenmeyer estériles de 150 ml que contenían 25 ml de caldo V8 CaCQ₃ clarificado (800 ml de agua destilada, 200 ml de jugo V8, 3 g CaCQ₃) se inocularon con tapones de cultivo de PDA de 5 mm de *P. aphanidermatum* (CBS 132490) cultivados a 23° C con 18 h/6 h de iluminación durante 3 días. Los matraces se cerraron con una bolita de algodón y se incubaron a 23° C con 18 h/6 h de iluminación durante 9 días. Cada masa micelial se recuperó y se enjuagó mediante agitación vorticial en un tubo de centrifugado de 50 ml lleno con 15 ml de agua destilada estéril. La operación se repitió por lo menos dos veces hasta la pérdida de color V8. Cada masa micelial se cortó en 2 trozos y cada mitad se incubó a 28 °C con iluminación durante 24 horas en un tubo de centrifugado de 50 ml lleno con 30 ml de agua destilada estéril. Los trozos de micelio se recuperaron y se mezclaron durante 3 s 8 veces con una batidora de mano (Braun Minipimer Control Plus, 300w) en una solución estéril que contenía 10 mM de sacarosa y 0.05 % de Tween 20 en agua destilada. Se utilizó una proporción de por lo menos un trozo de micelio por cada 12.5 ml de solución con un volumen mínimo de 100 ml. La suspensión de propágulos resultante se filtró a través de una gasa estéril para recolectar las oosporas, que se contaron en un hemocitómetro. La concentración se fijó en 1x10⁴ oosporas/ml.

Cultivo y suspensión de cepas

Las bacterias se cultivaron en medio sólido R2A a 28° C durante 3 días. Los cultivos se recolectaron en tampón KPBT mediante raspado de superficie. Las suspensiones de bacterias se diluyeron hasta alcanzar una absorbancia de 0.825 ± 0.025 a 600 nm. Una absorbancia de 0.800 equivalió a 5.10^7 UFC/ml de *P. chlororaphis* Tx-1. Cuando los cultivos no estaban lo suficientemente concentrados, se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 minutos y se ajustaron a la concentración correcta después de descartar el sobrenadante. Además de un primer cribado a una concentración de 0.825 ± 0.025 unidades de absorbancia, se probaron diferentes cepas de *Sphingobium xenophagum* con número de acceso LMG No. P-32737 (PB-30), LMG No. P-33173 (PB-31) y LMG No. P-33175 (PB-33). La cepa *Sphingobium xenophagum* con número de acceso LMG No. P-32737 (PB-30) así como el control biofungicida (Cpc) se probaron a una concentración 10 veces (PB-30 10x y Cpc 10x respectivamente).

Resultados

Se encontró que las diferentes cepas de *Sphingobium xenophagum* eran eficaces para controlar el marchitamiento de las semillas, tanto después de la preinoculación como después de la bioimprimación como se muestra en la **Tabla 1** a continuación. El sufijo “10x” se utilizó para indicar tratamientos concentrados de 10x. C-, C+, Cf y Cpc/Cpc10 x fueron los controles negativo, positivo, fungicida y biofungicida, respectivamente. Los diferentes aislados bacterianos / cepas bacterianas de *Sphingobium xenophagum* de acuerdo con la invención fueron los siguientes:

- *Sphingobium xenophagum* con número de acceso LMG No. P-32737 (PB-30/PB-30 1 Ox);
- *Sphingobium xenophagum* con número de acceso LMG No. P-33173 (PB-31); y
- *Sphingobium xenophagum* con número de acceso LMG No. P-33175 (PB-33).

Tabla 1. Tasa de germinación media de semillas tratadas con diferentes cepas de *S. xenophagum* para controlar el marchitamiento de *P. aphanidermatum* en función del método de preinoculación o bioimprimación.

Tratamiento	Tasa de germinación media (%)	
	Preinoculación	Bioimprimación
C-	60.0	93.5
C+	29.1	0.0
Cf	25.2	6.4
Cpc	12.0	7.0
Cpc 10x	15.6	28.1
PB-30	51.0	18.8
PB-30 10x	50.0	37.5
PB-31	53.6	27.7
PB-33	53.1	16.7

Después de la preinoculación, las diferentes cepas de *S. xenophagum* resultaron eficaces para controlar el marchitamiento de las semillas, mientras que Cf y Cpc/Cpc10x no fueron eficaces (umbral de tasa de germinación del 37.5 %). A una concentración estándar ($OD = 0.825 \pm 0.025$), las diferentes cepas de *Sphingobium xenophagum* permitieron una tasa de germinación media de más del 50 %.

Después de la bioimprimación, las diferentes cepas de *S. xenophagum* también demostraron ser eficaces con una tasa de germinación media superior al umbral del 12.5 % a la concentración estándar. Cuando se utilizó una suspensión de 10x para la cepa PB-30, la tasa de germinación media aumentó hasta el 37.5 % después del tratamiento. Una vez más, Cf y Cpc/Cpc10x no fueron eficaces contra el marchitamiento de las semillas.

Ejemplo 3: Uso eficaz de *Sphingobium xenophagum* como agente de control biológico

Tratamiento y controles

Se probó *Sphingobium xenophagum* con número de acceso LMG No. P-32737 (PB-30) contra la enfermedad de pudrición de la raíz mediada por *P. aphanidermatum* en plántulas de lechuga junto con cuatro controles. Los controles utilizados fueron un control sano negativo sin el patógeno (C-), un control positivo (C+), un control biopesticida (Cpc) y un control fungicida (Cf). C+ y C- fueron tratados con KPBT. Para Cf, se utilizó el fungicida Proplant® (722 g/L propamocarbo) al 0.1 % en tampón KPBT. Finalmente, se utilizó una suspensión de *P. chlororaphis* Tx-1 (ATCC 55670, un agente de biocontrol registrado por la EPA) para Cpc.

Para validar la reproducibilidad del cribado *in vivo*, se realizaron dos ensayos diferentes con bacterias cultivadas en diferentes medios e inoculadas a diferentes densidades. Estos se denominan “Ejemplo 3^a” y “Ejemplo 3B” en adelante.

Cultivo de cepas y suspensión para el Ejemplo 3A

Las bacterias se cultivaron en medio sólido R2A a 28° C durante 3 días. Los cultivos se recogieron en tampón KPBT mediante raspado de la superficie. Se midieron las suspensiones bacterianas para alcanzar una absorbancia de 0.825 ± 0.025 a 600 nm y luego se concentraron 10 veces para la inoculación de lechuga. Una concentración 10 veces mayor de *P. chlororaphis* Tx-1 equivalió a 5.10^8 UFC/ml. Cuando los cultivos no estaban lo suficientemente concentrados, se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 minutos y se ajustaron a la concentración correcta después de descartar el sobrenadante.

Cultivo de cepas y suspensión para el Ejemplo 3B

Las bacterias se produjeron en un medio rico en líquido (medio R) que contenía en 1 l de agua destilada: 10 g de peptona, 5 g de extracto de levadura, 5 g de extracto de malta, 5 g de bactocasaminoácidos, 2 g de extracto de carne, 2 g de glicerol y 1 g de MgSO_4 . Las bacterias se incubaron a 28° C con agitación a 100 rpm durante 3 días. Los pellets de bacterias se recuperaron por centrifugación del medio de cultivo a 4000 G durante 10 minutos. Los pellets se enjuagaron con tampón de fosfato de potasio 0.05 M más 0.05 % de Tween 80 (KPBT), se centrifugaron nuevamente y luego se resuspendieron en KPBT. La concentración de las suspensiones se determinó mediante un espectrofotómetro ajustado a 600 nm y ajustado a 1×10^9 ufc/ml en KPBT.

Preparación del inóculo del patógeno

Como se describió anteriormente para los ensayos de marchitamiento de semillas (Ejemplo 2), el cultivo micelial madre de *Pythium aphanidermatum* (CBS 132490) se reactivó primero en PDA durante 3 días a 23° C con un fotoperiodo día/noche de 18 h/6 h. Luego, los tapones miceliares del hongo en crecimiento activo se cultivaron en matraces Erlenmeyer que contenían 25 ml de caldo V8 CaCO_3 clarificado (800 ml de agua destilada, 200 ml de jugo V8 y 3 g de CaCO_3). Después de 9 en las mismas condiciones, se recuperó la masa micelial y se enjuagó varias veces en agua destilada estéril. A continuación, la masa micelial se incubó durante 24 horas a 28° C con iluminación en agua destilada estéril para iniciar la formación y maduración de las oosporas. A continuación, la masa micelial se mezcló con una batidora de mano (Braun Minipimer Control Plus, 300w) en una solución estéril que contenía 10 mM de sacarosa y 0.05 % de Tween 20 en agua destilada. A continuación, las oosporas en suspensión se separaron de otros propágulos mediante filtración estéril con gasa. A continuación, las oosporas encontradas en el filtrado se fijaron en una concentración de 1×10^4 oosporas/ml después de la observación con hemocitómetro.

Configuración experimental de control biológico

Las semillas de lechuga orgánica se sembraron en tapones de lana de roca de 25 x 25 x 40 mm (Grodan B.V., Roermond, Holanda) y se colocaron aleatoriamente en un fitotrón, con un fotoperiodo día/noche de 16 h/8 h, 22° C/18° C (día/noche) y una humedad relativa del 65 % durante los primeros 10 días de germinación como se describió anteriormente (Stouvenakers et al. (2020) *Microorganisms* 8, 1-25). Los tapones se colocaron en bandejas de plantas cuadradas de 14 cm de lado y las bandejas luego se colocaron aleatoriamente en un fitotrón ajustado a un fotoperiodo de 16 h/8 h (día/noche), una temperatura de 22° C/18° C (día/noche) y una humedad relativa del 65 %. Durante la primera semana de germinación se utilizó agua del grifo y luego se utilizó solución hidropónica en su lugar según las instrucciones del fabricante (Hy-Pro A y B, Hy-Pro Fertilizers, Bladel, Holanda). Diez días después de la siembra, las temperaturas y la humedad se aumentaron a 35/25° C (día/noche) y 92 %, respectivamente. Los tratamientos se aplicaron a una tasa de 1 ml por tapón en los días 0 y 7. Para cada tratamiento, se utilizaron 2 bandejas de plantas que contenían, cada una, 9 tapones de lana de roca. El día 10 después de la siembra, los tapones se inocularon con 1 ml de la suspensión del patógeno, excepto para C- donde se utilizó solución de sacarosa + tween. La mortalidad de lechuga (LM), los síntomas de podredumbre radicular (RRR: clasificación de la pudrición de la raíz) y la masa fresca foliar (FFM) se registraron el día 31 como se describió anteriormente (Stouvenakers et al. (2020) *Microorganisms* 8, 1-25).

Resultados

Se encontró que *Sphingobium xenophagum* redujo eficazmente la mortalidad de lechuga (ver **Tabla 2**), pero también disminuyó los síntomas de podredumbre de la raíz y limitó la disminución de la masa fresca foliar en comparación con los controles C+ y Cpc (**Tabla 3**).

Tabla 2. Mortalidad de lechuga (LM) de los tratamientos aplicados para controlar la enfermedad de *P. aphanidermatum* en plántulas de lechuga.

Tratamiento	Mortalidad de la lechuga LM (%)	
	Ejemplo 3A	Ejemplo 3B
C-	0.0	0.0
C+	33.3	11.1
Cf	0.0	0.0
Cpc	0.0	33.3
PB-30	0.0	0.0

Tabla 3. Índice de pudrición de la raíz (RRR) y masa fresca foliar (FFM) de los tratamientos aplicados para controlar la enfermedad de *P. aphanidermatum* en plántulas de lechuga.

Tratamiento	Índice de pudrición de la raíz RRR (0-7)		Masa fresca foliar FMM (mg)	
	Ejemplo 3A	Ejemplo 3B	Ejemplo 3A	Ejemplo 3B
C-	0.22	0.56	1328.8	1844.9
C+	6.28	6.06	677.2	1100.4
Cf	4.50	2.17	1083.6	1726,2
Cpc	3.72	6.06	1033.7	788.2
PB-30	2.17	4.67	1536.1	1341.0

Al utilizar las condiciones de cultivo y suspensión del Ejemplo 3A o 3B, se encontró que *Sphingobium xenophagum* reducía los síntomas de pudrición de la raíz y limitaba la disminución de la masa fresca foliar en comparación con los controles C+ y Cpc (**Tabla 3**).

En las condiciones del Ejemplo 3B, aunque se observó una baja mortalidad de lechuga (LM) para C+, la enfermedad estuvo presente con un índice de pudrición de la raíz (RRR) de 6.06 y una masa fresca foliar (FFM) de 1100.4

mg para este control positivo. En comparación, RRR y FFM o C- fueron 0.56 y 1844.9 mg, respectivamente. El control Cf fue eficaz para reducir RRR (2.17) y no se observó una disminución sustancial de FFM en comparación con C-. Sin embargo, Cpc, el control con biopesticidas no fue capaz de controlar la enfermedad, con un RRR de 6.06 y una media de FFM de 788.2 mg.

Por otro lado, se descubrió que *Sphingobium xenophagum* (PB-30) reducía eficazmente la mortalidad de la lechuga, pero también disminuía los síntomas de pudrición de la raíz (RRR = 4.67) así como la disminución de la masa fresca foliar (FMM = 1341.0 mg) en comparación con C+ y Cpc.

Los resultados fueron incluso más positivos en las condiciones del Ejemplo 3A. De hecho, se descubrió que *Sphingobium xenophagum* (PB-30) reducía eficazmente la mortalidad de la lechuga, pero también disminuía los síntomas de pudrición de la raíz (RRR = 2.17) y limitaba la disminución de la masa fresca foliar (1536.1 mg) en mayor medida que el control Cf, demostrando así que esta especie de bacteria es un agente de control biológico robusto y potente.

Ejemplo 4: Uso de *Sphingobium xenophagum* a diferentes concentraciones para controlar el marchitamiento de las semillas de lechuga causado por *Pythium aphanidermatum* en suelo

Preparación de microorganismos

En este experimento se probaron dos concentraciones diferentes de *Sphingobium xenophagum* cepa PB30 (LMG No. P-32737) para controlar el marchitamiento de las semillas de lechuga causado por el patógeno *Pythium aphanidermatum*. A partir de una suspensión madre conservada a -80° C en glicerol al 25 %, las células bacterianas se reactivaron primero cultivándolas en medio R2A durante 4 días a 23° C con un fotoperiodo día/noche de 18h/6h. Luego, se utilizaron colonias individuales para inocular nuevas placas Petri R2A. Después de un día de incubación a 30° C en la oscuridad, los cultivos se cosecharon raspándolos superficialmente en un tampón de fosfato de potasio

0.05 M más 0.05 % de Tween 80 (KPBT). Las suspensiones bacterianas se midieron a 600 nm en un espectrofotómetro y se ajustaron para alcanzar 5.10^7 o 5.10^8 UFC/ml.

El cultivo micelial madre de *P. aphanidermatum* (CBS 132490) conservado en aceite de parafina se reactivó primero en PDA durante 3 días a 23° C con un fotoperiodo día/noche de 18h/6h. Luego, se realizaron segundos cultivos a partir del primero y se incubaron durante 5 días en las mismas condiciones. Luego, los tapones miceliares se utilizaron como fuente de inóculo en este experimento.

Configuración experimental, tratamientos e inoculación de patógenos

Se sembraron semillas orgánicas granuladas de lechuga (*Lactuca sativa*) var. Lucrecia RZ (Rijk Zwaan, Merksem, Bélgica) (una semilla por celda) en bandejas de tapón de 28 x 50 cm con 160 celdas (Pöppelmann, Lohne, Alemania) que contenían caldo de cultivo (La Plaine Chassart, Fleurus, Bélgica). Las bandejas de tapones se cortaron en bandejas cuadradas más pequeñas de 5 por 4 celdas y se colocaron en bandejas cuadradas de plástico de 14 cm. Cada celda se trató por separado con 2 ml de tratamiento. Los tratamientos fueron una suspensión de la cepa *S. xenophagum* PB30 a 5.10^7 o 5.10^8 UFC/ml. Para los controles positivos (C+, es decir, con el patógeno) y negativos (C-, es decir, sin el patógeno), se utilizó KPBT como tratamiento. Se trataron cuarenta celdas para cada tratamiento. Luego, las celdas C+ y las celdas tratadas con PB30 se inocularon por la parte superior con tapones de micelio circulares de 4 mm Ø recogidos con un barrenador de corcho en cultivos en crecimiento activo del patógeno del marchitamiento *P. aphanidermatum* (ver preparación de microorganismos). Las bandejas de plantas se colocaron en un fitotrón a una temperatura de 23° C, una humedad relativa del 88 % y un fotoperiodo día/noche de 16 h/8 h durante 6 días hasta que emergieron completamente los cotiledones de lechuga. Luego, se midió la tasa de germinación de las semillas por línea de 5 celdas.

Resultados

En ambas concentraciones, las lechugas sembradas en celdas tratadas con la cepa PB30 de *S. xenophagum* fueron menos impactadas por el marchitamiento causado por *P. aphanidermatum* que el control positivo (**Tabla 4**). Cuando las celdas fueron tratadas con la cepa PB30 a 5.10^7 UFC/ml, la tasa de germinación se incrementó del 40 % (C+) al 77.5 %. A 5.10^8 UFC/ml, la tasa de germinación aumentó del 40 % (C+) al 55.0 %. Por lo tanto, corresponde a una tasa de germinación adicional del 37.5 y 15 % para los tratamientos PB30 a 5.10^7 y 5.10^8 UFC/ml, respectivamente.

Tabla 4. Tasas de germinación media de semillas de lechuga en función del tratamiento aplicado para controlar el marchitamiento de *P. aphanidermatum*.

Tratamiento	Tasa de germinación media (%)
C-	97.5
C+	40.0
PB30 a 5.10^7 CFU/ml	77.5
PB30 a 5.10^8 CFU/ml	55.0

Ejemplo 5: Comparación de la eficacia de biocontrol de *Sphingobium xenophagum* para controlar el marchitamiento de las semillas de lechuga causado por *Pythium aphanidermatum* en el suelo con un fungicida químico y un biofungicida microbiano

Preparación de microorganismos

El patógeno del marchitamiento *Pythium aphanidermatum* (CBS 132490) y la bacteria *Sphingobium xenophagum* cepa PB30 (LMG No. P-32737) se reactivaron, cultivaron y prepararon de acuerdo con el experimento anterior. Sin embargo, solo se preparó una suspensión a una concentración de 5.10^7 UFC/ml de la cepa *S. xenophagum* PB30.

Configuración experimental, tratamientos e inoculación de patógenos

Semillas peletizadas orgánicas de lechuga (*Lactuca sativa*) var. Lucrecia RZ (Rijk Zwaan, Merksem, Bélgica) se sembró en bandejas de tapones llenas de caldo de cultivo como se describió anteriormente. Cada celda en bandejas de tapones cuadradas (preparadas y exhibidas como se describió anteriormente) se trató por separado con 2 ml de tratamiento. Los tratamientos fueron, respectivamente, una suspensión de la cepa *S. xenophagum* PB30 a 5.10^7 UFC/ml (es decir, tratamiento PB30), fungicida Proplant® (722 g/l de propamocarbo) a una concentración de 0.1 % en agua (tratamiento Proplant®) y biofungicida microbiano Trianum-P® (1.10^9 UFC/g *Trichoderma harzianum* T-22) a una concentración de 0.5 g/l en agua (tratamiento Trianum-P®). En los controles positivos (C+, es decir, con el patógeno) y negativos (C-, es decir, sin el patógeno), se utilizó KPBT como tratamiento. Se trataron ochenta celdas para cada tratamiento. Luego, las celdas tratadas y C+ se inocularon por la parte superior con tapones de micelio circulares de 4 mm Ø recolectados con un barrenador de corcho en cultivos en crecimiento activo del patógeno del marchitamiento *P. aphanidermatum* (ver preparación de microorganismos). Las bandejas de plantas se colocaron en un fitotrón ajustado en las mismas condiciones que antes durante 6 días hasta que emergieron completamente los cotiledones de lechuga. Luego, se midió la tasa de germinación de las semillas por línea de 5 celdas.

Resultados

La lechuga sembrada en celdas tratadas con la cepa PB30 de *S. xenophagum* se vio menos afectada por el marchitamiento fúngico causado por *P. aphanidermatum* que el control positivo (**Tabla 5**). En comparación con C+, la tasa de germinación de las celdas tratadas con la cepa PB30 aumentó del 63.7 % al 75.0 %, respectivamente. El tratamiento con Trianum-P® no redujo el marchitamiento. La tasa de germinación de los tratamientos C+ y Trianum-P® fue de 63.7 % y 61.2 %, respectivamente. El tratamiento Proplant® dio los mejores resultados con una tasa de germinación de 88.7 % y luego una disminución de la tasa de marchitamiento de 25.0 %, contra 11.2 % para PB30.

Tabla 5. Tasas de germinación media de semillas de lechuga en función del tratamiento aplicado para controlar el marchitamiento de *P. aphanidermatum*.

Tratamiento	Tasa de germinación media (%)
C-	100.0
C+	63.7
PB30	75.0
Proplant®	88.7
Trianum-P®	61.2

Ejemplo 6: Uso de diferentes cepas de *Sphingobium xenophagum* para controlar el marchitamiento de las semillas de lechuga causado por *Pythium aphanidermatum* en el suelo

Preparación de microorganismos

En este experimento se probaron tres cepas diferentes de la bacteria *Sphingobium xenophagum* para controlar el marchitamiento de las semillas de lechuga causado por *Pythium aphanidermatum*. Se trata de la cepa PB30 (LMG No. P-32737), la cepa SKN (DSM 14677) y la cepa BN6 (DSM 6383). El patógeno del marchitamiento *P. aphanidermatum* (CBS 132490) y las 3 cepas de *S. xenophagum* se reactivaron, cultivaron y prepararon de acuerdo con el experimento anterior. La concentración de las suspensiones bacterianas se fijó en 5.10^7 UFC/ml para las tres cepas.

Configuración experimental, tratamientos e inoculación de patógenos

Se sembraron semillas orgánicas granuladas de lechuga var. Lucrecia en bandejas de tapones llenas de caldo de cultivo como se indicó anteriormente. Cada celda en bandejas cuadradas (preparadas y exhibidas como se indicó anteriormente) se trató por separado con 2 ml de tratamiento. Los tratamientos fueron PB30, SKN y BN6 para las 3 cepas de *S. xenophagum* aplicadas a 5.10^7

UFC/ml, respectivamente. Para controles positivo (C+, es decir, con el patógeno) y negativo (C-, es decir, sin el patógeno), se utilizó KPBT como tratamiento. Se trataron ochenta celdas por cada tratamiento. Luego, las celdas tratadas y C+ se inocularon por la parte superior con tapones de micelio circulares de 4 mm Ø cosechados con un barrenador de corcho en cultivos en crecimiento activo del patógeno de marchitamiento *P. aphanidermatum* (ver preparación de microorganismos). Las bandejas de plantas se colocaron en un fitotrón ajustado en las mismas condiciones que antes durante 6 días hasta que emergieron completamente los cotiledones de lechuga. Luego, se midió la tasa de germinación de las semillas por línea de 5 celdas.

Resultados

Entre las tres cepas de *S. xenophagum* utilizadas para controlar el marchitamiento de las semillas de lechuga causado por *P. aphanidermatum*, BN6 fue la mejor cepa, seguida de SNK y PB30 (**Tabla 6**). Las tasas de germinación media de estos tratamientos fueron 92.5 %, 86.2 % y 67.5 %, respectivamente, contra 60.0% en el control positivo. Este experimento mostró que todas las cepas ordenadas podían reducir la incidencia de la enfermedad de marchitamiento y que la actividad de biocontrol está relacionada con la especie bacteriana *S. xenophagum* y no con una cepa específica.

Tabla 6. Tasas de germinación media de semillas de lechuga en función del tratamiento aplicado para controlar el marchitamiento de *P. aphanidermatum*.

Tratamiento	Tasa de germinación media (%)
C-	98.7
C+	60.0
PB30	67.5
SNK	86.2
BN6	92.5

Ejemplo 7: Uso de la cepa PB30 de *Sphingobium xenophagum* para controlar *Phytophthora infestans* en un ensayo de hojas desprendidas de tomate

Preparación de microorganismos

En este experimento se probó la cepa PB30 de *Sphingobium xenophagum* (LMG No. P-32737) para controlar las manchas foliares del tomate producidas por el patógeno del tizón tardío *Phytophthora infestans*. La cepa PB30 de *S. xenophagum* se reactivó, se cultivó y se preparó de acuerdo con el experimento anterior. La concentración de la suspensión bacteriana se fijó en 1.10^{10} UFC/ml.

Se prepararon placas de agar centeno B (RA) para el crecimiento del hongo. Para 1 L de RA, se hirvieron 60 g de harina de centeno en 1 L de agua y se filtraron con una gasa. Luego se añadieron 20 g de sacarosa, 15 g de agar y 0.05 g de beta-sitosterol. El volumen del caldo se llevó hasta 1 L con agua destilada y luego se esterilizó en autoclave. El cultivo micelial madre de la cepa 22-015 de *P. infestans* (recibido de la colección CRA-W) se reactivó primero en placas de RA y se incubó a 18° C en la oscuridad. Luego, se realizaron segundos cultivos en RA a partir del primero y se incubaron durante por lo menos 15 días en las mismas condiciones. Los esporangios de *P. infestans* se recolectaron en tampón KPBT raspando la superficie, se filtraron con una gasa y luego se contaron en un hemocitómetro. Luego se preparó una suspensión a 1.10^5 esporangios/ml para la inoculación del huésped.

Configuración experimental, tratamientos e inoculación del patógeno

Se utilizaron plantas de tomate var. Money Maker (Henrion, Huy, Bélgica) cultivadas en un invernadero durante 6 semanas como material vegetal para el biocontrol de *P. infestans* en el ensayo de hojas desprendidas. Se tomaron muestras de las hojas del cuarto par de hojas en las plantas de tomate. Las muestras de hojas se colocaron boca abajo en cajas húmedas. Luego, los

lados abaxiales se trataron por separado rociando 2 ml de la suspensión PB30 (tratamiento PB30) o el tampón KPBT para el control positivo (C+). La prueba comprendió dos cajas por tratamiento, cada una con 4 muestras de hojas. Las cajas se incubaron ligeramente abiertas a 23° C sin iluminación. Después de 24 horas, los lados abaxiales de las hojas se inocularon con 10 µl de suspensión de esporangios. Las cajas fueron selladas e incubadas durante siete días a 18° C sin iluminación. Después de la incubación, las muestras de hojas fueron sumergidas en una mezcla de etanol/metanol en volumen 50/50 durante 24 horas para extraer clorofila. Se midieron el radio de ancho (r1) y el radio de largo (r2) de la mancha foliar dejada por el patógeno. Las áreas de lesiones causadas por *P. infestans* fueron calculadas con la fórmula $\pi \times r1 \times r2$.

Resultados

El control positivo (C+) mostró una incidencia de enfermedad por *P. infestans* del 87.5 % (**Tabla 7**). En promedio, las áreas de lesión desarrolladas en las muestras de hojas de tomate de C+ fueron 125.8 mm². Mientras que la incidencia de la enfermedad en el tratamiento PB30 fue nula. De hecho, no se observaron síntomas en las muestras de hojas tratadas con PB30 de *S. xenophagum*. Este resultado demostró que el tratamiento foliar con *S. xenophagum* puede controlar la infección por tizón tardío en plantas de tomate.

Tabla 7. Incidencia de la enfermedad y áreas medias de las lesiones producidas por la inoculación de *P. infestans* en muestras de hojas de tomate en un ensayo de hojas desprendidas.

Tratamiento	Áreas medias de lesiones (mm ²)	Incidencia de la enfermedad (%)
C+	125.8	87.5
PB30	0.0	0.0

Ejemplo 8: Uso de la cepa PB30 de *Sphingobium xenophagum* para controlar *Alternaria solani* en el ensayo de hojas desprendidas de tomate

Preparación de microorganismos

En este experimento se probó la cepa PB30 de *Sphingobium xenophagum* (LMG No. P-32737) para controlar las manchas foliares del tomate producidas por el patógeno del tizón temprano *Alternaria solani*. Se reactivó, cultivó y preparó *S. xenophagum* PB30 de acuerdo con el experimento anterior. La concentración de la suspensión bacteriana se estableció en 1.10^{10} UFC/ml.

Primero se reactivó el cultivo micelial madre de la cepa 12341 de *A. solani* (DSM 62028) en placas de PDA y se incubó a 23° C con un fotoperiodo día/noche de 18h/6h. Luego, se realizaron segundos cultivos en PDA a partir del primero y se incubaron durante por lo menos 14 días en las mismas condiciones. Los tapones de micelio se utilizaron como fuente de inóculo en este experimento.

Configuración experimental, tratamientos e inoculación de patógenos

Las plantas de tomate var. Money Maker (Henrion, Huy, Bélgica) cultivadas en un invernadero durante 6 semanas se utilizaron como material vegetal para el biocontrol de *A. solani* en el ensayo de hojas desprendidas. Se tomaron muestras de hojas de las cuartas hojas de las plantas de tomate. Las muestras de hojas se colocaron boca abajo en cajas húmedas. Luego, los lados abaxiales se trataron por separado rociando 2 ml de la suspensión PB30 (tratamiento PB30) o el tampón KPBT para el control positivo (C+). La prueba comprendió una caja que contenía 5 muestras de hojas por tratamiento. Las cajas se incubaron ligeramente abiertas a 23° C con iluminación indirecta. Después de 24 horas, los lados abaxiales de las muestras de hojas se inocularon con un tapón de micelio de *A. solani* de 1 mm Ø cosechado con un barrenador de corcho. Las cajas se sellaron y se incubaron durante siete días a 23° C con iluminación indirecta. Después de la incubación, se midieron el radio

de ancho (r_1) y el radio de largo (r_2) de las células necróticas y las manchas cloróticas producidas por el patógeno. Luego se calcularon las áreas de las lesiones causadas por *A. solani* con la fórmula $\pi \times r_1 \times r_2$.

Resultados

El tratamiento foliar con suspensión de PB30 redujo los síntomas de tizón temprano en plantas de tomate. De hecho, las áreas de las lesiones necróticas y cloróticas en el tratamiento PB30 se redujeron en un 78.1 % y un 59.5 %, respectivamente. En promedio, las áreas de lesiones necróticas y cloróticas desarrolladas en las muestras de hojas de tomate de C+ fueron 212.8 y 616.7 mm², respectivamente (**Tabla 8**). Mientras que el área de las lesiones necróticas y cloróticas en el tratamiento PB30 fue 46.5 y 249.1 mm², respectivamente. Estos resultados mostraron que el tratamiento foliar con *S. xenophagum* puede disminuir la infección y colonización del tizón temprano en plantas de tomate.

Tabla 8. Áreas medias de lesiones necróticas y cloróticas producidas por la inoculación de *A. solani* en hojas de muestra de tomate en el ensayo de hojas desprendidas.

Tratamiento	Áreas medias de lesiones necróticas y cloróticas (mm ²)	Áreas medias de lesiones cloróticas (mm ²)
C+	212.8	616.7
PB30	46.5	249.1