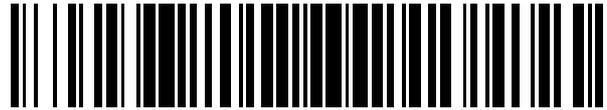


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 548 993**

51 Int. Cl.:

**C12N 1/20** (2006.01)

**A01N 63/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.01.2010 E 10734000 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.07.2015 EP 2389434**

54 Título: **Nueva cepa de Pasteuria**

30 Prioridad:

**26.01.2009 US 147174 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**22.10.2015**

73 Titular/es:

**PASTEURIA BIOSCIENCE, INC. (100.0%)  
12085 Research Dr. Suite 185  
Alachua, FL 32615, US**

72 Inventor/es:

**HEWLETT, THOMAS E. y  
WATERS, JOHN P.**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 548 993 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Nueva cepa de *Pasteuria*

5 **Antecedentes de la invención**

Los nematodos parásitos de las plantas causan pérdidas de cosecha a la agricultura mundial estimadas actualmente en más de 100.000 millones de dólares anualmente. La prevención de estos daños constituye un reto muy importante. Con la desaparición inminente del fumigante bromuro de metilo, queda un tiempo insuficiente para desarrollar y registrar nuevos compuestos sintéticos para control de los nematodos.

Los nematodos fitopatógenos son particularmente difíciles de controlar debido a que están cubiertos por una cutícula gruesa e impermeable, o cubierta exterior, y tienen muy pocas neuronas sensoriales. Dado que la mayoría de los compuestos para control de plagas operan como neurotoxinas, el pequeño número de neuronas expuestas por los nematodos fitopatógenos reduce el área diana eficaz para compuestos nematocidas, y ha dado como resultado el desarrollo de compuestos nematocidas con propiedades neurotóxicas muy altas. Además, debido a que los nematodos fitopatógenos se encuentran en el suelo o las raíces de las plantas, la exposición de los nematodos fitopatógenos a los agentes de control es difícil de conseguir y pone el nivel freático en riesgo de contaminación por dichos compuestos tóxicos. Se ha demostrado que el uso de nematocidas basados en neurotoxinas contamina tanto el agua subterránea como la superficial. Por consiguiente, muchos de estos compuestos están siendo retirados del mercado por razones de salud pública.

El nematodo reniforme, conocido también como *Rotylenchulus reniformis*, es la especie más importante económicamente del género *Rotylenchulus*. Las hembras del nematodo reniforme causan un daño extenso en el sistema radicular de las plantas por vivir parcialmente en el interior de las raíces. El término "reniforme" se refiere al cuerpo en forma de riñón de las hembras maduras. El reniforme puede causar también que las plantas sean más sensibles a otros organismos causantes de enfermedades.

Los nematodos reniformes parasitan las raíces de una gran diversidad de especies de plantas, que incluyen algodón, frijol de vaca, batata, soja, piña, té, y diversas hortalizas tales como tomate, quingombó, calabaza, y lechuga. La patogenicidad de los nematodos reniformes ha impactado notablemente en la agricultura. Por ejemplo, los mismos han causado una reducción de 40-60% en la producción del algodón en Louisiana, junto con un aumento en el marchitamiento de *Fusarium*.

La fumigación del suelo antes de la plantación es un método popular para control de los nematodos. Uno de los fumigantes más populares, bromuro de metilo, tiene prevista su retirada del uso debido a sus propiedades destructoras del ozono. Además, esta práctica de fumigación del suelo destruye indiscriminadamente los organismos en el suelo y presenta el riesgo de eliminar microbios beneficiosos así como los organismos de enfermedades. El mercado global para un nematocida eficaz con efectos ambientales benignos se estima que está próximo a mil millones de dólares sobre una base mundial.

*Pasteuria* fue descrito por primera vez en 1888 por Metchnikoff (Annales de l'Institut Pasteur 2: 165-170) como un parásito de las pulgas de agua. Subsiguientemente, Cobb describió una infección por *Pasteuria* del nematodo *Dorylaimus bulbiferous* (2ª edición de Hawaiian Sugar Planters Assoc., Expt. Sta. Div. Path. Physiol. Bull. 5:163-195, 1906).

El ciclo vital de la bacteria comienza cuando las endosporas se fijan a la cutícula de los nematodos en el suelo. *Pasteuria* proliferan dentro del cuerpo del nematodo y pasan por varias fases morfológicas documentadas, que incluyen estructuras miceliales y talos, culminando en el desarrollo de endosporas. Las endosporas se liberan cuando el cuerpo del nematodo sufre lisis. El crecimiento de las bacterias dentro del cuerpo del nematodo reduce o elimina la producción de huevos por el nematodo, restringiendo severamente la tasa de reproducción del nematodo. El deterioro económico para la cosecha hospedadora está causado normalmente por la progenie de la primera generación de nematodos y es evitado por *Pasteuria* mediante la reducción de la concentración de nematodos de la progenie en la zona de las raíces de la planta.

Si bien se han producido cepas de *Pasteuria* en especies múltiples de nematodos, tales como *Meloidogyne incognita* (Verdeho, S. y R. Mankau. 1986. *Journal of Nematology*, 18:635) and *Meloidogyne arenaria* (Patente U.S. No. 6,919,197), no se ha observado o cultivado con éxito cepa alguna de *Pasteuria* en nematodos reniformes con anterioridad a esta fecha.

60 **Sumario breve**

La presente invención proporciona una cepa nueva y ventajosa de bacterias *Pasteuria* que parasitan los nematodos reniformes. Estas cepas han sido depositadas con la American Type Culture Collection y le ha sido asignado el número de depósito ATCC PTA-9643.

Estas bacterias son capaces de producir endosporas que tienen la propiedad singular y útil de ser capaces de fijarse a, infectar, crecer en, reesporularse en, y destruir los nematodos reniformes y otros nematodos fitopatógenos.

5 La presente invención incluye adicionalmente composiciones que comprenden una cantidad nematocidamente eficaz de endosporas de la cepa de bacterias *Pasteuria* descrita y el uso de estas composiciones para controlar nematodos fitopatógenos.

10 En una realización, se trata primeramente una semilla de la planta con una materia adherente que puede adherirse a las esporas de *Pasteuria* y/o una composición que contiene las esporas. La materia adherente puede ser, por ejemplo, una cola y/o uno o más polímeros o copolímeros. Ejemplos de materias adherentes incluyen, pero sin carácter limitante, colas (tales como la cola ELMERS™); poli(acetatos de vinilo); materiales de silicona; y materiales inorgánicos naturales tales como gel de sílice y arcilla.

15 Se describe también en esta memoria una semilla que tiene al menos parte de su superficie recubierta con una composición de *Pasteuria*, en la cual la composición de *Pasteuria* comprende una cantidad eficaz de esporas de *Pasteuria* para control de los nematodos.

#### Breve descripción de las secuencias

20 **SEQ ID NO: 1** es una secuencia parcial de rDNA 16S de la bacteria conforme a una realización de la invención.

**SEQ ID NO: 2** es una secuencia parcial de spollAB de la bacteria conforme a una realización de la invención.

25 **SEQ ID NO: 3** es una secuencia parcial de atpA de la bacteria conforme a una realización de la invención.

**SEQ ID NO: 4** es una secuencia parcial de atpF de la bacteria conforme a una realización de la invención.

#### Descripción detallada

30 La nueva cepa bacteriana de la presente invención tiene actividad nematocida contra nematodos fitopatógenos que incluyen nematodos reniformes. Un cultivo del microbio ha sido depositado con la American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Blvd., Manassas, Va. 20110-2209, EE.UU. Se ha asignado al depósito el número de acceso ATCC No. PTA-9643 por el depositario, y fue depositado en fecha 4 de diciembre de 2008.

35 El cultivo en cuestión ha sido depositado en condiciones que aseguran que el acceso al cultivo estará disponible durante la tramitación de esta solicitud de patente para una persona determinada por el Comisionado de Patentes y Marcas Comerciales autorizada para ello conforme a 37CFR 1.14 y 35 U.S.C. 122. El depósito está disponible tal como sea requerido por las leyes de patentes extranjeras en países en los que han guardado equivalencias de la presente solicitud, o su progenie. Sin embargo, debería entenderse que la disponibilidad del depósito no constituye una licencia para practicar la presente invención en derogación de los derechos de patente garantizados por la acción gubernamental.

45 Adicionalmente, el presente depósito de cultivo se almacenará y estará disponible para el público conforme a las provisiones del Tratado de Budapest para el Depósito de Microorganismos, es decir, será guardado con todo el cuidado necesario para mantenerlo viable y no contaminado durante un periodo de al menos 5 años desde la solicitud más reciente para el suministro de una muestra del depósito, y en cualquier caso, durante un periodo de al menos 30 (treinta) años después de la fecha de depósito o durante la vida que debe respetarse de cualquier patente descriptora del cultivo que pueda expedirse. El depositario reconoce el deber de reponer el depósito en caso de que el depositario sea incapaz de suministrar una muestra cuando sea requerida, debido al estado del depósito. Todas las restricciones en cuanto a la disponibilidad al público del presente depósito de cultivo serán eliminadas irrevocablemente después de la concesión de una patente que lo describa.

50 Como se utiliza en esta memoria, la referencia a "aislado" significa que la cepa está separada del medio ambiente en el cual se encuentra en la naturaleza. Así, la cepa aislada puede existir como, por ejemplo, un cultivo biológicamente puro, o como esporas (u otras formas de la cepa) en asociación con un portador agrícola.

60 Como se utiliza en esta memoria, el término "que comprende" contempla adicionalmente escenarios en los cuales la composición y/o el método "consiste en" o "consiste esencialmente en" los componentes y/o pasos citados anteriormente. Como se utiliza en esta memoria, la referencia a "está constituido esencialmente por" se refiere a la situación en la que componentes y/o pasos adicionales son sólo aquellos que no afectan a la actividad pesticida de la composición y/o el método.

65 "Una cantidad nematocidamente eficaz", como se utiliza en esta memoria, se refiere a una cantidad de esporas de *Pasteuria* capaces de destruir, controlar, o infectar nematodos; retardar el crecimiento o la reproducción de los nematodos; reducir una población de nematodos; y/o reducir el daño a las plantas causado por los nematodos.

Se ha comprobado que esta cepa es una cepa nueva de *Pasteuria*. SEQ ID NOs: 1-4 son secuencias de polinucleótidos de ciertos genes de las bacterias.

- 5 Se describen también en esta memoria variantes de ATCC PTA 9643 que tiene actividad nematocida. En una realización, una "variante" tiene una secuencia de polinucleótidos que se hibrida en condiciones de alta severidad con al menos 1, preferiblemente 2, 3, o la totalidad de los 4 de SEQ ID NOs: 1-4.

10 "Hibridación" se refiere a una reacción en la cual uno o más polinucleótidos reaccionan para formar un complejo que está estabilizado por enlaces de hidrógeno entre una purina particular y una pirimidina particular en las moléculas de ácido nucleico bicatenario (DNA-DNA, DNA-RNA, o RNA-RNA). Los apareamientos específicos principales son guanina con citosina y adenina con timina o uracilo. Pueden emplearse diversos grados de severidad de hibridación. Cuanto más severas son las condiciones tanto mayor es la complementariedad que se requiere para formación de dúplex. La severidad de las condiciones pueden controlarse por temperatura, concentración de la sonda, longitud de la sonda, fuerza iónica, tiempo, y análogos.

15 Preferiblemente, la hibridación se conduce en condiciones de alta severidad por métodos bien conocidos en la técnica, como se describe, por ejemplo, en Keller, G.H. & M.M. Manak, *DNA Probes*, y el volumen acompañante *DNA Probes: Background, Applications, Procedures* (varias ediciones, con inclusión de la 2ª edición, Nature Publishing Group, 1993). La hibridación se describe también extensamente en los manuales de Clonación Molecular publicados por Cold Spring Harbor Laboratory Press, que incluye Sambrook & Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2001). Cada una de estas publicaciones se incorpora en esta memoria en su totalidad por referencia.

25 Un ejemplo no limitante de condiciones de alta severidad para hibridación es al menos aproximadamente 6X SSC y 1% SDS a 65 °C, con un primer lavado durante 10 minutos a aproximadamente 42 °C con formamida aproximadamente al 20% (v/v) en 0,1xSSC, y con un lavado posterior con 0,2X SSC and 0,1% SDS a 65 °C. Un ejemplo no limitante de condiciones de hibridación son condiciones seleccionadas de modo que sean aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, o 25 °C menores que el punto de fusión térmico (T<sub>m</sub>) para la secuencia específica en la solución particular. T<sub>m</sub> es la temperatura (dependiente de la fuerza iónica y el pH) a la que el 50% de la secuencia diana se hibrida a una sonda perfectamente coincidente. T<sub>m</sub> aumenta típicamente con la concentración de [Na<sup>+</sup>] debido a que los cationes sodio apantallan electrostáticamente los grupos fosfato aniónicos de los nucleótidos y minimizan su repulsión. Los lavados empleados pueden hacerse durante aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30, o más minutos cada uno, y pueden ser de severidad creciente en caso deseado.

30 Los cálculos para estimación de T<sub>m</sub> son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, la temperatura de fusión puede describirse por la fórmula siguiente Beltz, G.A., K.A. Jacobs, T.H. Eickbush, P.T. Cherbass, and F.C. Kafatos, *Methods of Enzymology*, R. Wu, L. Grossman y K. Moldave [eds.] Academic Press, Nueva York 100:266-285, 1983).

40 
$$T_m = 81,5^{\circ}\text{C} + 16,6 \text{ Log } [\text{Na}^+] + 0,41(\% \text{G+C}) - 0,61(\% \text{formamida}) - 600/\text{longitud del dúplex en pares de bases.}$$

45 Una estimación más exacta de T<sub>m</sub> puede obtenerse utilizando modelos del vecino más próximo. Breslauer, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83:3746-3750 (1986); SantaLucia, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95: 1460-1465 (1998); Allawi & SantaLucia, *Biochemistry* 36:10581-94 (1997); Sugimoto *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 24:4501-4505 (1996). T<sub>m</sub> puede medirse también rutinariamente por calorimetría de barrido diferencial (Duguid *et al.*, *Biophys. J.*, 71:3350-60, 1996) en una solución seleccionada, o por otros métodos conocidos en la técnica, tales como fusión monitorizada por UV. A medida que aumenta la severidad de las funciones de hibridación, se obtienen grados de homología mayores.

50 Métodos típicos que pueden utilizarse para identificar la presencia de la secuencia de DNA como se describe en esta memoria incluyen, pero sin carácter limitante, detección de una hibridación de secuencia específica de DNA utilizando oligonucleótidos específicos, secuenciación directa de DNA, digestión con enzimas de restricción, protección de RNasas, escisión química, y detección mediada por ligasas.

55 Un ejemplo de una variante de ATCC PTA-9643 es una cepa que contiene un polinucleótido que tiene más de 85, 90, 95, 98, ó 99% de identidad de secuencia con una cualquiera o la totalidad de SEQ NOs: 1-4.

60 La estructura cristalina de una F1-Atpasa ha sido dada por Stocker *et al.*, *Structure* 15(8): 904-914 (2007), y la función de la F1-Atpasa ha sido estudiada extensamente. Véase, *v.g.*, Itoh *et al.*, "Mechanically driven ATP synthesis by F1-Atpase," *Nature* 427(6973):407-8 (2004), así como las referencias citadas en dicho lugar. Secuencias variantes de atpA codifican un polipéptido que retiene al menos 1, 2, 3, 4, 5, o la totalidad de las diferencias de SEQ NO: 4 con relación a la porción correspondiente de NCBI gi 93.007.315 de *Pasteuria ramosa*.

65

La proteína spoIIAB es un factor anti-sigma. Duncan & Losick, *Proc Natl Acad Sci USA*, 90(6): 2325-2329 (1993). Están disponibles una diversidad de estructuras cristalinas. Masuda *et al.*, *J Mol Biol*, 340(5):941-956 (2004); Campbell *et al.*, *Cell*, 108(6):795-807 (2002). Secuencias variantes de spoIIAB codifican un polipéptido que retiene al menos 1, 2, 3, 4, 5, o todas las diferencias de SEQ NO: 2 relativas a la porción correspondiente de NCBI gi 30173229 de *Pasteuria penetrans* y/o NCBI gi 93007308 de *Pasteuria ramosa*.

Datos estructurales y funcionales para la subunidad b de la sintasa ATP de *E. coli* se dan, por ejemplo, por Del Rizzo *et al.*, *J Mol Biol*, 364(4):735-46 (2006); y Claggett *et al.*, *J. Bacteriol*, 189(15):5463-5471 (2007). Secuencias variantes de atpF codifican un polipéptido que retiene al menos 1, 2, 3, 4, 5, o todas las diferencias de SEQ NO: 3 con relación a las porciones correspondientes de NCBI gi 41019057 de *Pasteuria penetrans* y/o NCBI gi 93007313 de *Pasteuria ramosa*.

Cepas de *Pasteuria penetrans* que parasitan nematodos reniformes son aquellas cepas de *Pasteuria* que están más estrechamente relacionadas filogenéticamente con ATCC PTA-9643 que con cualquier cepa de *Pasteuria* conocida actualmente (o, alternativamente, más estrechamente relacionadas con ATCC PTA-9643 que con cualquier cepa no parasitante conocida de reniformes de *Pasteuria penetrans*), como se determina por análisis de rutina de secuencias ribosómicas 16S. Una diversidad de instrumentos y datos adecuados para análisis de rDNA 16S se conocen en la técnica. Los números de acceso siguientes restituidos por NCBI Blast de la base de datos "nr" proporcionan secuencias ribosómicas 16S referenciadas por el número NCBI gi: 157357381; 145690675; 55168340; 215499254; 29169172; 197777542; 153816650; 189353846; 154483090; 27360487; 153816533; 27359371; 10039641; 153816651; 153813776; 169191254; 77959837; 223489039; 224155181; 197766214; 197782632; 223475320; 165924309; 225111262; 50363539; 169189407; 119632772; 167630417; 147836457; 321193; 47570202; 229499565; 29565682; 5531888; 27360062; 197763227; 121592110; 227495267; 3256603; 197781048; 154500167; 154500794; 150251526; 197735635; 153813782; 167425567; 212632978; 15921449; 218151942; 163781875; 169869672; 78033426; 157354103; 40062645; 115762746; 83595848; 196018328; 115379816; 1780806; 198417694; 154500170; 108707408; 224033543; 223947683; 226443382; 237831283; 195614328; 194703406; 212274346; 149633895; 118086080; 119178984; 74007189; 197768010; 191162148; 219461701; 169213810; 167630416; 19927; 196018322; 182701819; 156341374; 115467400; 126433538; 119190145; 56422945; 50545958; 223466311; 212507121; 197762411; 169194840; 192291641; 152012802; 3831447; 67903352; 3256604; 171686416; 158294661; 154273901; 119720343. Las secuencias variantes de rDNA 16S codifican RNA que retiene al menos 1, 2, 3, 4, 5, o la totalidad de las diferencias relativas a una o más (o cualquier combinación) de las secuencias de rDNA 16S indicadas en este párrafo. En ciertas realizaciones, las secuencias de rDNA 16S indicadas por el número NCBI gi en este párrafo pueden excluirse de la invención reivindicada.

Pueden producirse grandes cantidades de estas bacterias utilizando técnicas de fermentación. La esporulación ocurre a partir de la última fase vegetativa de las bacterias con producción de esporas durmientes maduras. Las endosporas de *Pasteuria* no se deterioran por secado. Por tanto, las mismas pueden guardarse durante largos periodos a la temperatura ambiente.

Métodos para crecimiento de *Pasteuria* se conocen en la técnica e incluyen, por ejemplo, los métodos descritos en las Patentes U.S. Núms. 5.094.954 y 7.067.299.

La presente invención proporciona adicionalmente composiciones de endosporas bacterianas útiles para control de plagas. Se ilustran específicamente composiciones de endosporas de bacterias que son patógenas para nematodos y crecen en, o sobre, el tejido vivo de los nematodos.

Las endosporas pueden formularse en un polvo humectable, concentrado líquido, gránulos u otras formulaciones por adición de agentes tensioactivos, dispersantes, portadores inertes y otros componentes para obtener una composición nematocida que facilita la manipulación y aplicación para nematodos diana particulares.

La preparación comercial podría tener una concentración elevada de endosporas, típicamente más de  $1 \times 10^7$  esporas/ml y preferiblemente más de  $1 \times 10^9$  esporas por ml o gramo de producto seco.

La composición puede incluir también uno o más de los siguientes ingredientes: otros pesticidas, con inclusión de compuestos que actúan sólo bajo el suelo; fungicidas, tales como captán, thiram, metalaxil, fludioxonil, oxadixil, e isómeros de cada uno de dichos materiales, y análogos; herbicidas, con inclusión de compuestos seleccionados de carbamatos, tiocarbamatos, acetamidas, triacinas, dinitroanilinas, glicerol-éteres, piridazinonas, uracilos, fenoxis, ureas, y ácidos benzoicos; fitoprotectores herbicidas tales como benzoxazina, derivados de benzhidrido, N,N-dialil-dicloroacetamida, diversos compuestos de dihaloacilo, oxazolidinilo y tiazolidinilo, etanona, compuestos de anhídrido naftálico, y derivados de oximas; fertilizantes, y agentes de biocontrol tales como otras bacterias y hongos existentes naturalmente o recombinantes de los géneros *Rhizobium*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Trichodenna*, *Glomus*, *Gliocladium* y hongos micorrizos.

Estos procedimientos de formulación y aplicación son todos ellos bien conocidos en la técnica y se utilizan con cepas comerciales de *Pasteuria*. La composición nematocida puede pulverizarse o aplicarse sobre las hojas para controlar los nematodos fitopatógenos.

5 Otro método que puede emplearse consiste en incorporar las endosporas en gránulos, que contienen opcionalmente un atrayente, y aplicar estos gránulos al suelo para control de los nematodos que viven en el suelo. Típicamente, después de contacto con el agua, las esporas se desprenden del gránulo y después de ello las esporas se adhieren a los nematodos y los infectan. Las esporas formuladas pueden aplicarse también como recubrimiento de semillas para el tratamiento de las raíces o tratamiento total de la planta.

10 La cantidad de las endosporas aplicadas precisa ser nematocidamente eficaz. En una realización, menos de un cuarto de galón (1,14 litros) de endosporas por acre (0,40 Ha) es suficiente para conseguir un control eficaz de los nematodos.

15 Ventajosamente, las composiciones son fáciles de aplicar con equipo de aplicación convencional. El modo de acción de la endospora hace improbable el desarrollo de resistencia. La mayoría de los nematocidas disponibles tienen que aplicarse al suelo antes de la plantación, dado que los productos químicos dañarían las plantas en caso contrario. En contraste, esta cepa de *Pasteuria* no deteriorará las plantas, y puede aplicarse en cualquier momento.

20 Otro aspecto de la invención proporciona semillas tratadas con la presente composición de *Pasteuria*. Una realización proporciona semillas que tienen al menos parte de la superficie externa recubierta con la composición de *Pasteuria*. En una realización específica, las semillas tratadas con *Pasteuria* tienen una concentración de esporas de aproximadamente  $10^6$  a aproximadamente  $10^9$  esporas por semilla. Las semillas pueden tener también más esporas por semilla, tales como, por ejemplo  $1 \times 10^{10}$ ,  $1 \times 10^{11}$  ó  $1 \times 10^{12}$  esporas por semilla.

25 Los materiales y métodos de la presente invención pueden utilizarse para reducir el deterioro de especies vegetales, que incluyen, pero sin carácter limitante, judías verdes, césped de hipódromo, batata, tomates, algodón, maíz, semillas de soja, quingombó, lechuga, calabaza, hortalizas, piña, té, trigo, cebada, arroz y canola.

30 Lo que sigue es un ejemplo, que ilustra procedimientos para la práctica de la invención. Este ejemplo no debería interpretarse como limitante. Todos los porcentajes se expresan en peso y todas las proporciones de la mixtura de disolventes se expresan en volumen a no ser que se indique otra cosa.

#### 35 EJEMPLO 1 - TRATAMIENTOS DE SEMILLAS

Conforme a la presente invención, pueden suministrarse eficazmente esporas de *Pasteuria* para controlar los nematodos fitopatógenos por aplicación como recubrimiento de las esporas de *Pasteuria* sobre las semillas de las plantas.

40 Las esporas de *Pasteuria* pueden aplicarse libremente sobre las semillas o, preferiblemente pueden formularse en una composición líquida o sólida antes de aplicarse como recubrimiento sobre las semillas. Por ejemplo, puede prepararse una composición sólida que comprende las esporas por mezcla de un portador sólido con una suspensión de las esporas hasta que los portadores sólidos se impregnan con la suspensión de esporas. Esta mixtura puede secarse luego para obtener las partículas deseadas.

45 Los portadores sólidos son preferiblemente gránulos. Los gránulos pueden ser, por ejemplo, gránulos de tierra de diatomeas de AXIS® y/o gránulos de arcilla Greensgrade de PROFILE®. Pueden incluirse también en la mixtura de portador y suspensión de esporas diversos aditivos, tales como materias adherentes, dispersantes, agentes tensioactivos, y nutrientes e ingredientes tampón.

50 En una realización específica, además de las esporas, el recubrimiento puede comprender además una capa de material adherente. El material adherente debería ser no tóxico, biodegradable, y adhesivo. Ejemplos de tales materiales incluyen, pero sin carácter limitante, poli(acetatos de vinilo); copolímeros de poli(acetato de vinilo); poli(alcoholes vinílicos); copolímeros de poli(alcohol vinílico); celulosas, tales como metil-celulosas, hidroximetil-celulosas, e hidroximetil-propil-celulosas; dextrinas; alginatos; azúcares; melazas; polivinil-pirrolidonas; polisacáridos; proteínas; grasas; aceites; gomas arábicas; gelatinas; jarabes; y almidones. Más ejemplos pueden encontrarse, por ejemplo, en la Patente U.S. No. 7.213.367, que se incorpora por referencia en su totalidad en esta memoria.

60 La capa de material adherente puede ayudar a la fijación de las esporas en la superficie de la semilla y prevenir posibles pérdidas por caída. Adicionalmente, el recubrimiento puede comprender también otros agentes químicos o biológicos que tienen un efecto beneficioso en combinación con las esporas de *Pasteuria* para control de los nematodos y/o para control de otras plagas. Los recubrimientos pueden incluir también fertilizantes y otros componentes que ayudan a promover la germinación de las semillas, y/o el crecimiento y/o la salud de las plantas.

65

Así pues, la presente invención proporciona métodos de producción de un recubrimiento de esporas de *Pasteuria* sobre una semilla de planta. En una realización específica, el método comprende combinar mixturas de gránulos secos impregnadas con esporas de *Pasteuria* y una semilla recubierta con un material adherente.

5 Aunque los tratamientos de semillas pueden aplicarse a una semilla en cualquier estado fisiológico, se prefiere que la semilla se encuentre en un estado suficientemente duradero que no sufra deterioro alguno durante el proceso de tratamiento. Típicamente, la semilla ha sido recogida del campo; retirada de la planta; y separada de cualquier otro material de la planta distinto de la semilla. Preferentemente, la semilla es biológicamente estable en tal grado que el tratamiento no cause deterioro biológico alguno a la semilla. En una realización, por ejemplo, el tratamiento puede aplicarse a una semilla de maíz que ha sido cosechada, limpiada y secada hasta un contenido de humedad inferior a aproximadamente 15% en peso. En una realización alternativa, la semilla puede ser una que ha sido secada e imprimada luego con agua y/u otro material y secada luego nuevamente antes o durante el tratamiento con la composición de esporas de *Pasteuria*. Dentro de las limitaciones que acaban de describirse, el tratamiento puede aplicarse a la semilla en cualquier momento entre la recolección de la semilla y la siembra de la semilla. Como se utiliza en esta memoria, debe entenderse que el término "semilla no sembrada" incluye semilla en cualquier periodo entre la recolección de la semilla y la siembra de la semilla en el campo para el propósito de germinación y cultivo de la planta.

20 Como se utiliza en esta memoria, cuando se dice que la semilla no sembrada se "trata" con la composición que contiene *Pasteuria*, no debe entenderse que dicho tratamiento incluya aquellas prácticas en las cuales se aplica *Pasteuria* al suelo, en lugar de a la semilla.

25 Las esporas de *Pasteuria* se aplican típicamente a las semillas en forma de una formulación pesticida. Esta formulación puede contener uno o más componentes adicionales deseables que incluyen, pero sin carácter limitante, diluyentes líquidos, aglomerantes, cargas para protección de las semillas durante condiciones de estrés, y plastificantes para mejorar la flexibilidad, adhesión y/o facilidad de extensión del recubrimiento. Adicionalmente, puede ser deseable añadir a la formulación agentes secantes tales como carbonato de calcio, caolín o arcilla bentonítica, perlita, tierra de diatomeas o cualquier otro material adsorbente. El uso de tales componentes en los tratamientos de semillas es conocido en la técnica. Véase, v.g., la Patente U.S. No. 5.876.739. El profesional experto, con el beneficio de la presente descripción, puede seleccionar fácilmente componentes deseables para uso en la formulación.

30 Las semillas pueden tratarse también con uno o más de los siguientes ingredientes: otros pesticidas, con inclusión de compuestos que actúan únicamente bajo el suelo; fungicidas, tales como captán, thiram, metalaxil, fludioxonil, oxadixil, e isómeros de cada uno de dichos materiales, y análogos; herbicidas, con inclusión de compuestos seleccionados de glifosato, carbamatos, tiocarbamatos, acetamidas, triacinas, dinitroanilinas, glicerol-éteres, piridazinonas, uracilos, fenoxis, ureas, y ácidos benzoicos; fitoprotectores herbicidas tales como benzoaxazina, derivados de benzhidrido, N,N-dialil-dicloroacetamida, diversos compuestos de dihaloacilo, oxazolidinilo y tiazolidinilo, etanona, compuestos de anhídrido naftálico, y derivados de oximas; fertilizantes, y agentes de biocontrol tales como otras bacterias y hongos existentes naturalmente o recombinantes de los géneros *Rhizobium*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Trichodenna*, *Glomus*, *Gliocladium* y hongos micorrizas. Estos ingredientes pueden añadirse como una capa separada sobre la semilla o, alternativamente, pueden añadirse como parte de la composición de *Pasteuria*.

45 Preferiblemente, la cantidad de la nueva composición u otros ingredientes utilizados en el tratamiento de semillas no deberían inhibir la germinación de la semilla, o causar deterioro fitotóxico a la semilla.

50 La formulación que se utiliza para tratar las semillas de la presente invención puede encontrarse en la forma de una suspensión; emulsión; papilla de partículas en un medio acuoso (v.g. agua); polvo humectable; gránulos humectables (fluidizables secos); y gránulos secos. Si se formula como una suspensión o papilla, la concentración del ingrediente activo en la formulación es con preferencia aproximadamente 0,5% a aproximadamente 99% en peso (p/p), preferiblemente 5-40% o como se formule en cualquier otro caso por los expertos en la técnica.

55 Como se ha mencionado arriba, otros ingredientes convencionales inactivos o inertes pueden incorporarse en la formulación. Tales ingredientes inertes incluyen, pero sin carácter limitante: agentes adherentes convencionales; agentes dispersantes tales como metilcelulosa (Methocel A15LV o Methocel A15C, por ejemplo, sirven como agentes dispersantes/adherentes combinados para uso en tratamientos de semillas); poli(alcohol vinílico) (v.g., Elvanol 51-05); lecitina (v.g. Yelkinol P), dispersantes polímeros (v.g. polivinilpirrolidona/acetato de vinilo PVPIVA S-630); espesantes (v.g., espesantes de arcilla tales como Van Gel P para aumentar la viscosidad y reducir la sedimentación de las suspensiones de partículas); estabilizadores de emulsiones; agentes tensioactivos; compuestos anticongelantes (v.g., urea), tintes, colorantes, y análogos. Ingredientes inertes adicionales útiles en la presente invención pueden encontrarse en McCutcheon's, vol. 1, "Emulsifiers and Detergents," MC Publishing Company, Glen Rock, N.J., U.S.A., 1996. Ingredientes inertes adicionales útiles en la presente invención pueden encontrarse en McCutcheon's, vol. 2, "Functional Materials," MC Publishing Company, Glen Rock, N.J., U.S.A., 1996.

65

Las formulaciones de recubrimiento de la presente invención pueden aplicarse a las semillas por una diversidad de métodos que incluyen, pero sin carácter limitante, mezcladura en un recipiente (v.g., una botella o bolsa), aplicación mecánica, volteo en tambor, pulverización, e inmersión. Pueden utilizarse una diversidad de materiales activos o inertes para poner en contacto las semillas con los pesticidas conforme a la presente invención, tales como materia-  
5 les convencionales de recubrimiento de film que incluyen, pero sin carácter limitante, materiales de recubrimiento de film de base acuosa tales como SEPIRET™ (Seppic, Inc., Fairfield, N.J.) Y OPACoAT™ (Berwind Pharm. Services, Westpoint, Pa.).

Métodos y composiciones de recubrimiento de semillas que son conocidos en la técnica son útiles cuando los  
10 mismos se modifican por la adición de una de las realizaciones de la presente invención. Tales métodos y aparatos de recubrimiento para su aplicación se describen, por ejemplo, en las Patentes U.S. Núms. 5.918.413, 5.891.246, 5.554.445, 5.389.399, 5.107.787, 5.080.925, 4.759.945 y 4.465.017. Composiciones de recubrimiento de semillas se describen, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos Núms. 5.939.356, 5.882.713, 5.876.739, 5.849.320, 5.834.447, 5.791.084, 5.661.103, 5.622.003, 5.580.544, 5.328.942, 5.300.127, 4.735.015, 4.634.587, 4.383.391,  
15 4.372.080, 4.339.456, 4.272.417 y 4.245.432, entre otras.

Aglomerantes que son útiles en la presente invención comprenden preferiblemente un polímero adhesivo que puede ser natural o sintético y carece de efecto fitotóxico sobre la semilla a recubrir. El aglomerante puede seleccionarse de poli(acetatos de vinilo); copolímeros de poli(acetato de vinilo); copolímeros etileno-acetato de vinilo (EVA);  
20 poli(alcoholes vinílicos); copolímeros de poli(alcohol vinílico); celulosas, con inclusión de etilcelulosas metilcelulosas, hidroximetilcelulosas, hidroxipropilcelulosas y carboximetilcelulosa; polivinil-pirrolidonas; polisacáridos, con inclusión de almidón, almidón modificado, dextrinas, maltodextrinas, alginato y quitosanos; grasas; aceites; proteínas, con inclusión de gelatina y zeínas; goma arábica, lacas, cloruro de vinilideno y copolímeros de cloruro de vinilideno; lignosulfonatos de calcio; copolímeros acrílicos; poli(acrilatos de vinilo); poli(óxido de etileno); polímeros y  
25 copolímeros de acrilamida; poli(acrilato de hidroxietilo), monómeros de metilacrilamida; y policloropreno.

La cantidad de *Pasteuria* que se utiliza para el tratamiento de las semillas variará dependiendo del tipo de semilla y el tipo de ingredientes activos, pero el tratamiento comprenderá poner en contacto las semillas con una cantidad de la *Pasteuria* que es eficaz como pesticida. Como se utiliza en esta memoria, una cantidad eficaz como nematocida  
30 significa aquella cantidad de *Pasteuria* que destruirá los nematodos, o reducirá o retardará consistentemente la magnitud del daño causado por los nematodos.

Los pesticidas que se utilizan en el tratamiento no deben inhibir la germinación de la semilla y deberían ser eficaces en la protección de la semilla y/o la planta durante el tiempo del ciclo de vida del nematodo en el cual éste causa  
35 deterioro a la semilla o la planta. En general, el recubrimiento será eficaz durante aproximadamente 1 hora a 120 días después de la siembra.

Los recubrimientos formados con el pesticida son preferiblemente del tipo que son capaces de efectuar una  
40 velocidad de liberación lenta del pesticida por difusión o movimiento a través de la matriz hasta el medio circundante.

Además de la capa de recubrimiento, la semilla puede tratarse con uno o más de los ingredientes siguiente: otros pesticidas, con inclusión de fungicidas y herbicidas; agentes herbicidas fitoprotectores; fertilizantes y/o agentes de  
45 biocontrol. Estos ingredientes pueden añadirse como una capa separada o, alternativamente, pueden añadirse en la capa de recubrimiento del pesticida.

La formulación pesticida puede aplicarse a las semillas utilizando una diversidad de técnicas y máquinas, tales como técnicas de lecho fluidizado, el método del molino de rodillos, tratadores rotostáticos de semillas, y aplicadores de tambor. Pueden ser útiles también otros métodos, tales como lechos efervescentes. Las semillas pueden  
50 preclasificarse por tamaños antes de la aplicación del recubrimiento. Después del recubrimiento, las semillas se secan típicamente y transfieren luego a una máquina clasificadora para su clasificación por tamaños. Tales procedimientos son conocidos en la técnica.

Las semillas tratadas con *Pasteuria* pueden envolverse también con un film que actúa como recubrimiento exterior para proteger el recubrimiento. Tales recubrimientos exteriores son conocidos en la técnica y pueden aplicarse  
55 utilizando técnicas de lecho fluidizado y de recubrimiento con film en tambor.

Las esporas de *Pasteuria* pueden introducirse sobre una semilla por el uso de imprimación con matriz sólida. Por ejemplo, puede mezclarse cierta cantidad de las esporas de *Pasteuria* con un material de la matriz sólida y después de ello la semilla puede ponerse en contacto con el material de la matriz sólida durante cierto periodo para permitir  
60 que el pesticida se introduzca en la semilla. La semilla puede separarse luego opcionalmente del material de la matriz sólida y guardarse o utilizarse, o la mixtura de material de la matriz sólida más semilla puede guardarse o plantarse directamente. Materiales de matriz sólida que son útiles en la presente invención incluyen poli(acrilamida, almidón, arcilla, sílice, alúmina, tierra, arena, poliurea, poli(acrilato, o cualquier otro material capaz de absorber o adsorber el pesticida durante cierto tiempo y liberar luego dicho pesticida en o sobre la semilla. Es útil asegurarse de  
65 que el pesticida y el material de la matriz sólida son compatibles uno con otro. Por ejemplo, el material de la matriz

sólida debería seleccionarse de modo que pueda liberar el pesticida a una tasa razonable, por ejemplo durante un periodo de minutos, horas, o días.

- 5 Al contrario que la forma vegetativa de las bacterias, las esporas de *Pasteuria* no se deterioran por secado y pueden guardarse durante largos periodos a la temperatura ambiente. Por tanto, una ventaja de la presente invención es que el secado y otros pasos severos utilizados en los métodos de recubrimiento pueden aplicarse a la presente invención para recubrimiento de las semillas sin reducir significativamente la eficacia de las esporas. La larga vida útil de las semillas de la presente invención permite también variaciones en los programas de plantación.
- 10 Adicionalmente, la tasa de supervivencia de las esporas de *Pasteuria* es mucho mayor que la forma vegetativa de las bacterias durante el transporte y la siembra una vez situadas en el suelo.

En general, la cantidad eficaz de esporas comprende desde aproximadamente  $1 \times 10^5$  a  $1 \times 10^{12}$  (o más) esporas/semilla. Preferiblemente, la concentración de esporas es aproximadamente  $1 \times 10^6$  a  $1 \times 10^9$  esporas/semilla.

- 15 En una realización, para obtener las mezclas de gránulos, la ratio de esporas de *Pasteuria* a gránulo es aproximadamente  $3 \times 10^7$  a  $5 \times 10^7$  esporas/gránulo. En una realización específica, aproximadamente 3-5 ml de una suspensión de esporas de *Pasteuria* que contiene aproximadamente  $2 \times 10^7$  esporas/ml de tampón se añade a aproximadamente 2 g de gránulos. La ratio puede depender de los tipos de gránulo. Por ejemplo, pueden aplicarse aproximadamente 5 ml de suspensión de esporas a 2 g de gránulos de AXIS®, en tanto que se prefieren
- 20 aproximadamente 3 ml de suspensión de esporas para la misma cantidad de gránulos de PROFILE®. El material adherente puede ser cualquier cola comercial biocompatible con la semilla y el suelo, tal como la cola escolar clara de Elmer que contiene poli(acetato de vinilo).

- 25 Puede incluirse un paso adicional de tratamiento térmico a fin de destruir los nematodos si las esporas se producen en hospedadores nematodos. El paso de tratamiento térmico puede aplicarse a la suspensión de esporas antes de mezclarla con los gránulos. Alternativamente, el paso puede aplicarse después de la formación de mezclas de gránulos.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Pasteuria Bioscience, INC. Hewlett, Thomas E. Waters, John P.

5 <120> Nueva cepa de *Pasteuria*

<130> PBS.104XC1PCT

<150> 61/147,174

10 <151>26-01-2009

<160> 4

<170> PatentIn versión 3.5

15

<210> 1

<211> 1170

<212> DNA

<213> Pasteuria

20

<400> 1

```

tgcaagtcga ggcgcgactc cttttggggg gcgagcggcg gacgggtgag taacacgtgg      60
ataacctgca cagaagacgg ggattacccc cggaaacggg ggtcaatacc ggatacgctt      120
cctagatcgc atgatccggg agggaaaggt gccttcgggc gccgcttttg gagggatccg      180
cggcgcatta gctagttggt gaggtaaggg ctcaccaagg cgacgatgcg tagccggctt      240
gggagagcgg acggccacac tgggactgag acacggccca gactcctacg ggaggcagca      300
gtagggaatt ttccgcaatg ggcgaaagcc tgacggagcg acgcccgcgtg ggtgaagacg      360
gccttcgggt tgtaaagccc tgttcatcgg gaagaagaaa tgacgggtacc ggtgaagaaa      420
gccccggcta actacgtgcc agcagccgcg gtaatacgtg gggggcgagc gttgtccggg      480
atgattgggc gtaaagggcg ttagggcgga tacataggtc gggcgtgaaa ggcgcgggct      540
caaccctgtg gagcgttcga aacgggtgtg cttgagtgca gtagagggaa gcggaatttc      600
tgggtgtagc gtggaatgcg tagatatcag aaggaacacc ggtggcgaag gcggcttctt      660
ggactgttac tgacgctgag gcgcgaaggg gtggggagca aacaggatta gataccctgg      720
tagtccacgc ggtaaaccgat gaggctaga ttaggggatg ctcagcatct ttgtgccgaa      780
ggaaaccat taagcactcc gcctggggag tacggctcga aggctgaaac tcaaaggaat      840
tgacgggggc ccgcacaagc ggtggagcat gtggtttaat tcgatgcaac gcgaagaacc      900
ttaccaaggg ttgacatccc ggtgaaaggg ctcgaaagag tgccgtgccc ccttcggggg      960
gagcatcggg gacaggtggt gcatggttgt cgctcagctcg tgctcgtgaga tgttggttcc      1020
agtcccgcaa cgagcgaac ccttatctcc ggttgccagc acgtaagggt gggcactttg      1080
gagagacagc cggcgaaagc cggaggaagg cggggacgac gtcaaatcat catgccctt      1140
atgttttggg ctacacacgt gctacaatgg      1170
    
```

25

<210> 2

<211> 252

<212> DNA

<213> Pasteuria

30

<400> 2

ES 2 548 993 T3

tcgtgtttct gtggagatag aggataccca ggtagctatt acggttacag accggggcgt 60  
 gggaattgta gatgtggagc aggccaggca atctttgtat acttctagc cagaatggga 120  
 gcgcgcgggg atggggtttt ccattatgga acatttcatg gatcaggtga gggttcgttc 180  
 tacgccccgt caaggtaccg tagtacatat gataaaaaag ttgcaggcga gtaggaatgt 240  
 agccgttgcg at 252

<210> 3  
 <211> 764  
 <212> DNA  
 <213> Pasteuria

5

<400> 3  
 cacgtataca cggtttgagt gaagcaatgt ctggcgagct cgttgagttt tctaagggta 60  
 atctgggaat ggttgcgaac ctggagatgg agaatgtcgg tgttgtggta ctgggatctt 120  
 gtgatgagat tcatgagggg gaccctgtac gccgtacagg tcggttgatg gaagtaccgg 180  
 tgggtgaggc attgtcgggt cgggtagtca accccctcgg acagccccca gatggggcag 240  
 ggcctatttc ctcggaacac ttccgtcctg tggaaatgcc agctgcagggt gttgtggatc 300  
 gccgatctgt tcatcagccc ctgcagacag ggatcaaggc gatcgatcgc atggtgccca 360  
 ttggtcgcgg gcaacgcgag ttgatcattg gggatcgtca gacggggaaa acgacggttg 420  
 cgggtggatac gatcctgaat cagaaggata cgggtgtcct ttgtgtctac gtagcgattg 480  
 gtcagaagca gtctacagtg gcgcagggtg tggagaaatt acgacaacgg ggtgcgatgg 540  
 agtataccac ggtggtggta gcgagtgctt ccgatccctt tccccttctg tacttagccc 600  
 cctatgcggg ttgtgtgatg ggcgagtatt ttatgtatca ggggtggccat gtgttgtgtg 660  
 tatacgatga tctttccaag caggctcggg cctaccggga gctttccctt ttacttcgtc 720  
 gtccgccagg acgtgaagcc taccocgggg atgtttttta cttta 764

10

<210> 4  
 <211> 245  
 <212> DNA  
 <213> Pasteuria

15

<400> 4  
 ggtgtcgaaa atgatggagg cacgtacgga gaggattaag tctactctgg aggaggcaga 60  
 agcgaagcgg aaggaggccc ttctctatgt agagcagtaa agggaggcct tgaagcaagc 120  
 ccggcaggag gctcagggga tgcttgccac tgcgcgtttt cagaaggagc aggaggcggc 180  
 gtcgatccta caggaggcga ggcagagagc cgagcaaacg ttggagtctg ctaagtcgga 240  
 ggttg 245

20

**REIVINDICACIONES**

1. Una cepa de *Pasteuria* aislada que está depositada como ATCC número de acceso PTA-9643.
- 5        2. Una composición nematocida que comprende una cantidad eficaz como nematocida de la cepa de *Pasteuria* de la reivindicación 1, y un portador agrícola.
3. La composición, conforme a la reivindicación 2, en la cual el portador es un tratamiento de semillas.
- 10       4. Un método para controlar los nematodos, en EL CUAL dicho método comprende poner en contacto los nematodos con una cantidad eficaz como nematocida de la cepa de *Pasteuria* de la reivindicación 1.
5. El método, conforme a la reivindicación 4, o la cepa de *Pasteuria* aislada, conforme a la reivindicación 1, en los cuales el nematodo es un nematodo reniforme.
- 15       6. El método, conforme a la reivindicación 4, utilizado para proteger una cosecha seleccionada del grupo constituido por judías verdes, céspedes de hipódromo, batata, tomates, algodón, maíz, soja, quingombó, lechuga, calabaza, hortalizas, piña, té, trigo, cebada, arroz y canola.
- 20       7. El método, conforme a la reivindicación 6, en el cual la cosecha es algodón.
8. El método, conforme a la reivindicación 4, en el cual la cepa de *Pasteuria* se aplica al suelo para control de los nematodos que viven en el suelo.
- 25       9. El método, conforme a la reivindicación 4, en el cual la cepa de *Pasteuria* se aplica antes o durante la plantación.
10. El método, conforme a la reivindicación 9, en el cual la cepa de *Pasteuria* se aplica como recubrimiento de semillas.