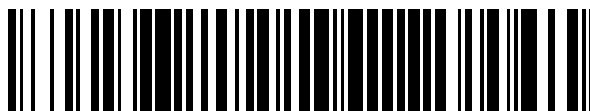


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 625 607**

51 Int. Cl.:

<b>C12N 1/20</b>	(2006.01)	<b>C07D 413/06</b>	(2006.01)
<b>A01N 63/02</b>	(2006.01)	<b>C07D 263/34</b>	(2006.01)
<b>A01N 43/74</b>	(2006.01)	<b>C07D 263/32</b>	(2006.01)
<b>A01N 43/14</b>	(2006.01)	<b>C07D 498/14</b>	(2006.01)
<b>A01N 43/16</b>	(2006.01)	<b>C07D 513/04</b>	(2006.01)
<b>A01N 43/76</b>	(2006.01)	<b>C12P 17/16</b>	(2006.01)
<b>A01N 63/00</b>	(2006.01)	<b>A01N 43/90</b>	(2006.01)
<b>C07D 309/14</b>	(2006.01)	<b>C07D 493/10</b>	(2006.01)
<b>C07D 407/06</b>	(2006.01)		
<b>C07D 413/04</b>	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.02.2011 PCT/US2011/026016**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **01.09.2011 WO11106491**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.02.2011 E 11748040 (0)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.04.2017 EP 2539432**

54 Título: **Cepa bacteriana aislada del género burkholderia y metabolitos pesticidas del mismo**

30 Prioridad:

**25.02.2010 US 308287 P**  
**25.10.2010 US 406541 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**20.07.2017**

73 Titular/es:

**MARRONE BIO INNOVATIONS, INC. (100.0%)**  
**2121 Second Street, Suite B-107**  
**Davis, CA 95618, US**

72 Inventor/es:

**ASOLKAR, RATNAKAR;**  
**KOIVUNEN, MARJA;**  
**MARRONE, PAMELA;**  
**HUANG, HUAZHANG y**  
**CORDOVA-KREYLOS, ANA LUCIA**

74 Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

**ES 2 625 607 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

Cepa bacteriana aislada del género burkholderia y metabolitos pesticidas del mismo

## 5 Campo técnico

Se proporciona aquí una especie de Burkholderia sp sin patogenicidad conocida para los vertebrados sin patogenicidad conocida para los vertebrados, tales como mamíferos, peces y aves, sino actividad pesticida contra plantas, insectos, hongos y nematodos. También se proporcionan productos naturales derivados de un cultivo de  
10 dichas especies y métodos para controlar la germinación y el crecimiento de malezas dicotiledóneas, monocotiledóneas y sedimentarias, que modulan el crecimiento de hongos y que controlan plagas como insectos y nematodos utilizando dichos productos naturales.

## 15 Antecedentes

Los productos naturales son sustancias producidas por microbios, plantas y otros organismos. Los productos naturales microbianos ofrecen una fuente abundante de diversidad química, y hay una larga historia de uso de productos naturales para propósitos farmacéuticos. Uno de tales compuestos es FR901228 aislado a partir de Chromobacterium y se ha encontrado que es útil como agente antibacteriano y agente antitumoral (véase, por  
20 ejemplo, Ueda et al., Patente de EEUU No. 7.396.665).

Sin embargo, también se ha descubierto con éxito que los metabolitos secundarios producidos por microbios tienen usos para el control de malezas y plagas en aplicaciones agrícolas (véase, por ejemplo, Nakajima et al., 1991, Duke et al., 2000, Lydon y Duke, 1999, Gerwick et al., Patente de EEUU No. 7.393.812). Los productos naturales microbianos también se han desarrollado con éxito en insecticidas agrícolas (véase, por ejemplo, Salama et al.,  
25 1981, Thompson et al., 2000, Krieg et al., 1983). Algunas veces, dichos productos naturales se han combinado con pesticidas químicos (véase, por ejemplo, Gottlieb, Patente de EEUU No. 4.808.207).

El documento WO01/55143 se refiere a los derivados de azol y azina, a los procedimientos para prepararlos, a las composiciones fungicidas, insecticidas, acaricidas, moluscicidas y nematocidas que los componen, a métodos para su uso en la lucha contra las enfermedades fúngicas (especialmente las enfermedades fúngicas de las plantas) y métodos para su uso para combatir y controlar plagas de insectos, acarinos, moluscos y nematodos. Los compuestos aquí son diferentes de los compuestos de la presente invención en que el templazol A no tiene una  
30 unión entre los fragmentos de indol y oxazol, y el oxazol está unido al fragmento pirrol del indol.

El documento WO 2009049318 se refiere a moléculas bioactivas. Más particularmente, la invención se relaciona con derivados de lactona útiles como agentes farmacéuticos, agrícolas o pesticidas. Los compuestos aquí son diferentes de los compuestos de la presente invención en que no se une ningún fragmento adicional de amida-propenil-carboxi-  
35 etilo al anillo de tetrahidropirano.

El documento WO 9720857 se refiere a un nuevo compuesto químico orgánico, al que se hace referencia a continuación como Omfalotin. El compuesto es útil como microbicida y pesticida, preferiblemente para controlar plagas animales, fúngicas y bacterias. Los compuestos aquí son diferentes de los compuestos de la presente invención en que se refieren a un anillo peptídico de 12 miembros sustituido por un indol mientras que FR90128 de la presente invención es un anillo hexapéptido con un fragmento de S-S-butenilo unido dentro del anillo.  
40 45

El documento JP2007091701 se refiere a compuestos que contienen la estructura amida-fenil-dihidrooxazol y un anillo adicional para uso como pesticidas. Estos son diferentes de la presente invención en que el templazol B tiene un sustituyente de isobutilo adicional y un fragmento de oxazol.  
50

El documento WO2005115149 se refiere a un péptido cíclico aislado de un extracto de corteza de una planta malgache, cuyo péptido tiene actividad insecticida.

## 55 Burkholderia

El género Burkholderia,  $\beta$ -subdivisión de las proteobacterias, comprende más de 40 especies que habitan diversos nichos ecológicos (Compant et al., 2008). Las especies bacterianas del género Burkholderia son organismos ubicuos en el suelo y la rizosfera (Coenye y Vandamme, 2003; Parke y Gurian-Sherman, 2001). Tradicionalmente, han sido conocidos como patógenos vegetales, siendo B. cepacia el cebador descubierto e identificado como el patógeno que  
60 causa la enfermedad en las cebollas (Burkholder, 1950). Varias especies de Burkholderia han desarrollado interacciones beneficiosas con sus anfitriones vegetales (véase, por ejemplo, Cabballero-Mellado et al., 2004, Chen et al., 2007). Se ha encontrado también que algunas especies de Burkholderia son patógenos humanos oportunistas (véase, por ejemplo, Cheng y Currie, 2005 y Nierman et al., 2004). Adicionalmente, se ha encontrado que algunas especies de Burkholderia tienen potencial como productos de biocontrol (véase por ejemplo, Burkhead et al., 1994, Knudsen et al., 1987, Jansiewicz et al., 1988, Gouge et al., Solicitud de Patente de EEUU No. 2003/0082147, Parke et al., Patente de EEUU No. 6,077,505, Casida et al., Patente de EEUU No. 6,689,357, Jeddelloh et al.,  
65

WO2001055398, Zhang et al., Patente de EEUU No. 7,114,407). Algunas especies de este género han sido efectivas en la biorremediación para descontaminar el suelo contaminado o el agua subterránea (véase, por ejemplo, Leahy et al., 1996). Además, se ha hallado que algunas especies de Burkholderia secretan una variedad de enzimas extracelulares con actividades proteolíticas, lipolíticas y hemolíticas, así como toxinas, antibióticos y sideróforos (véase, por ejemplo, Ludovic et al., 2007, Nagamatsu, 2001).

Oxazoles, Tiazoles e Indoles

Oxazoles, tiazoles e indoles están ampliamente distribuidos en plantas, algas, esponjas y microorganismos. Un gran número de productos naturales contienen uno o más de los núcleos/fragmentos de oxazol, tiazol e índole de cinco miembros. Estos productos naturales exhiben un amplio espectro de actividad biológica de valor terapéutico demostrable. Por ejemplo, la bleomicina A (Tomohisa et al.), un fármaco anticanceroso ampliamente prescrito, efectúa la degradación oxidativa del ADN y usa un fragmento de bitiazol para unirse a sus secuencias de ADN objetivo (Vanderwall et al., 1997). La bacitracina (Ming et al., 2002), un antibiótico peptídico que contiene tiazolina, prohíbe la nueva biosíntesis de la pared celular bacteriana mediante la complejación con C55-bactoprenolpirofosfato. El tiangazol (Kunze et al., 1993) contiene un conjunto en tándem de un oxazol y tres tiazolinas y exhibe actividad antiviral (Jansen et al., 1992). Sin embargo, otros productos naturales que contienen oxazol/tiazol tales como el tiostrepton (Anderson et al., 1970) y GE2270A (Selva et al., 1997) inhiben los pasos de traducción en la síntesis de proteínas bacterianas. Se han reportado más de 1000 alcaloides con el esqueleto de indol de microorganismos. Un tercio de estos compuestos son péptidos con masas por encima de 500 Da donde el indol es derivado de triptófano. La variedad estructural de los dos tercios restantes es mayor y su actividad biológica parece abarcar una gama más amplia, que incluye la actividad antimicrobiana, antiviral, citotóxica, insecticida, antitrombótica o inhibidora de enzimas.

Breve resumen

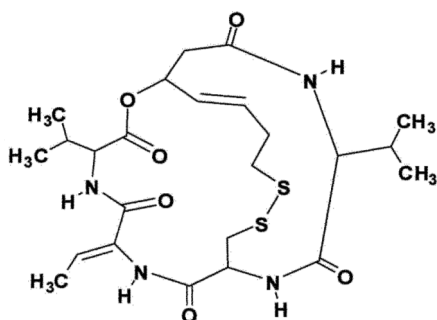
La presente invención se relaciona con una cepa aislada de Burkholderia A396 (NRRL No. de acceso B-50319) que tiene las siguientes características:

(A) en una secuencia genética 16S de ARNr que comprende las secuencias directas que tiene al menos 99% de identidad con las secuencias establecidas en SEQ ID NO:8, 11, y 12 y secuencias inversas que tiene al menos 99% de identidad con las secuencias establecidas en SEQ ID NO:9, 10, 13, 14 y 15;

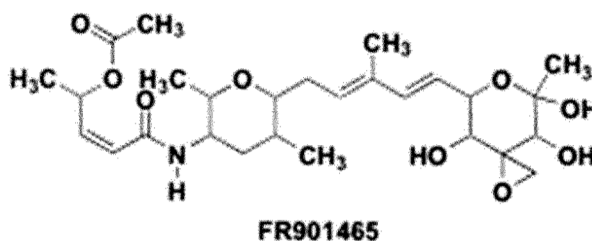
(B) actividad pesticida;

(C) produce un compuesto pesticida seleccionado de

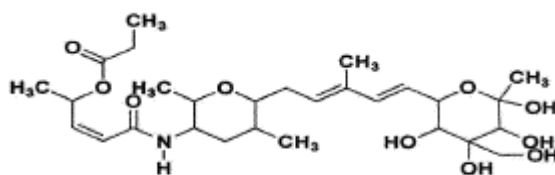
(i) un compuesto que tiene una estructura



(ii) un compuesto que tiene una estructura

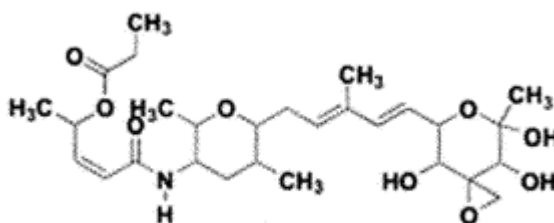


(iii) un compuesto que tiene una estructura



Templamida A

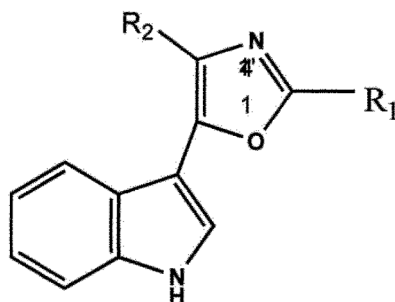
(iv) un compuesto que tiene una estructura



Templamida B

5

(v) un compuesto que tiene una estructura

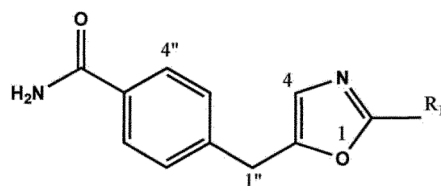


##STR002a##

10

en el que R1 es isobutilo y R2 es un metil éster de ácido carboxílico; y

(vi) un compuesto que tiene una estructura



15

en el que R1 es isobutilo;

(D) no es patógena para animales vertebrados; y

20

(E) es susceptible a kanamicina, cloranfenicol, ciprofloxacino, piperacilina, imipenem, y una combinación de sulfametoxazol y trimetoprim.

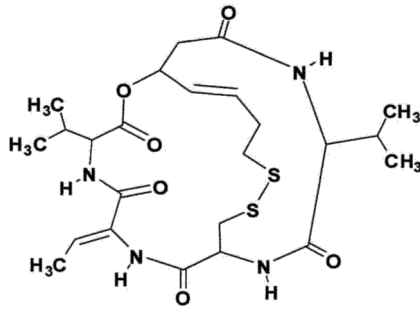
25

Se divulgan aquí compuestos aislados que pueden obtenerse o derivarse opcionalmente de especies de Burkholderia, o alternativamente, organismos capaces de producir estos compuestos que pueden usarse para controlar diversas plagas, particularmente plagas fitopatógenas de plantas, ejemplos de las cuales incluyen pero no se limitan a insectos, nematodos, bacterias, hongos. Estos compuestos también pueden usarse como herbicidas.

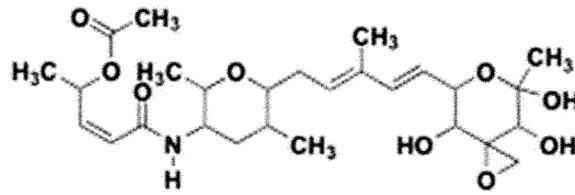
En particular, los compuestos pesticidas aislados de la presente invención obtenibles a partir de una especie Burkholderia se seleccionan de

30

(i) un compuesto que tiene una estructura



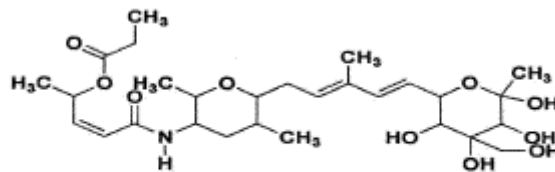
(ii) un compuesto que tiene una estructura



FR901465

5

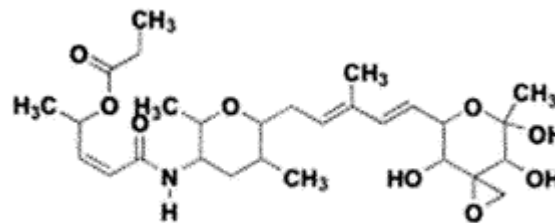
(iii) un compuesto que tiene una estructura



Templamida A

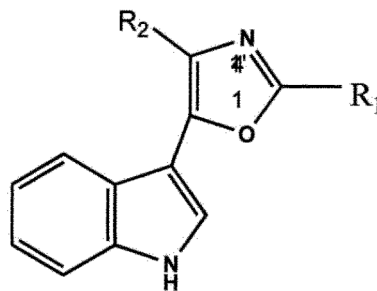
10

(iv) un compuesto que tiene una estructura



Templamida B

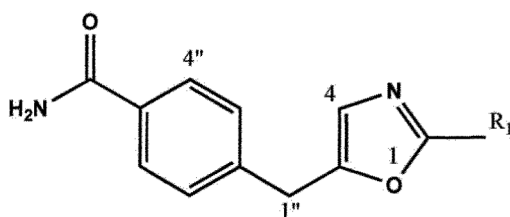
(v) un compuesto que tiene una estructura



##STR002a##

15

en el que R1 es isobutilo y R2 es un metil éster de ácido carboxílico; y  
(vi) un compuesto que tiene una estructura



en el que R1 es isobutilo;

5 También se proporcionan métodos para obtener los compuestos expuestos anteriormente. En particular, el método comprende cultivar la cepa de *Burkholderia* descrita aquí y producir el compuesto. También se proporciona un método para aislar estos compuestos por aislamiento de los compuestos producidos por una cepa de *Burkholderia* que comprende aislar compuestos producidos a partir de un sobrenadante de un cultivo de dicha cepa de *Burkholderia*.

10 También se proporciona una combinación que comprende (a) una cebadora sustancia seleccionada del grupo que consiste en (i) un cultivo puro, una fracción o sobrenadante celular derivado de la cepa de *Burkholderia* establecida anteriormente o un extracto de la misma para su uso opcionalmente como un pesticida; (ii) uno o más de los compuestos establecidos anteriormente (b) opcionalmente una segunda sustancia, en la que dicha segunda sustancia es un plaguicida químico o biológico y (c) opcionalmente al menos uno de un vehículo, diluyente, tensoactivo, adyuvante o pesticida. En una realización particular, la combinación es una composición. En un aspecto relacionado, se proporciona aquí una semilla recubierta con dicha composición.

15 En un aspecto relacionado, se divulga un método para modular la infestación de plagas en una planta que comprende aplicar a la planta y/o semillas de la misma y/o sustrato usado para cultivar dicha planta y/o un método para modular la emergencia y/o el crecimiento de plantas monocotiledóneas, juncia o malezas dicotiledóneas que comprende aplicar a dicha maleza o tierra una cantidad de

20 (I) (a) los compuestos aislados establecidos anteriormente y (b) opcionalmente otra sustancia, en la que dicha sustancia es un pesticida (por ejemplo, nematocida, herbicida, fungicida, insecticida) o

25 (II) la composición o combinación establecida anteriormente

30 en una cantidad efectiva para modular la infestación de plagas y/o la emergencia o crecimiento de malezas monocotiledóneas, de juncia o dicotiledóneas.

35 En otro aspecto relacionado, se proporciona el uso de las cepas, cultivos, extractos, sobrenadantes, combinaciones, compuestos establecidos anteriormente para modular la infestación de plagas en una planta que comprende aplicar a la planta y/o semillas de la misma y/o sustrato usado para hacer crecer dicha planta y/o un método para modular la emergencia y/o crecimiento de malezas monocotiledóneas, de juncia o dicotiledóneas.

#### Breve descripción de las figuras

40 La Figura 1 muestra la comparación de la rata de crecimiento de *Burkholderia* A396 con *Burkholderia multivorans* ATCC 17616.

La Figura 2 muestra el efecto de extracto de *Burkholderia* A396 en la enredadera.

La Figura 3 muestra el efecto de extracto de *Burkholderia* A396 en el amaranto.

La Figura 4 muestra el efecto de extracto de *Burkholderia* A396 en la oruga de col (*Tricoplusia ni*).

45 La Figura 5 muestra el efecto del caldo de cultivo de *Burkholderia* A396 en la gardama (*Spodoptera exigua*).

La Figura 6 muestra el efecto del caldo de cultivo de *Burkholderia* A396 sobre la motilidad de los nematodos agalladores juveniles (*Meloidogyne incognita*).

La Figura 7 es una representación esquemática del esquema de purificación para obtener los compuestos de templastol y templamida.

50 La Figura 8 muestra los resultados de un ensayo in vitro para probar el efecto fungicida de FR90128 sobre *Botrytis cinerea* (izquierda) y *Phytophthora* sp. (derecha).

La Figura 9 muestra el efecto del caldo de cultivo de *Burkholderia* A396 sobre el índice promedio de gall (% de control) de las raíces de pepino cv. Toschka inoculado con 3000 huevos de *Meloidogyne* sp. 14 días después de la inoculación y aplicación.

55 La Figura 10 muestra el efecto del caldo de cultivo de *Burkholderia* A396 sobre el índice promedio de gall de las raíces de pepino cv. Toschka inoculado con 3000 huevos de *Meloidogyne* sp. 14 días después de la inoculación y aplicación.

#### Descripción detallada de las realizaciones

Aunque las composiciones y los métodos hasta ahora son susceptibles a diversas modificaciones y formas alternativas, a continuación se describirán en detalle realizaciones a manera de ejemplo.

- 5 Cuando se proporciona un intervalo de valores, se entiende que cada valor intermedio, al décimo de la unidad del límite inferior, a menos que el contexto indique claramente lo contrario, entre el límite superior e inferior de ese intervalo y cualquier otro valor declarado o intermedio en ese rango establecido, se incluye en el mismo. También se incluyen intervalos más pequeños. Los límites superior e inferior de estos intervalos más pequeños también se incluyen en ellos, sujetos a cualquier límite específicamente excluido en el intervalo indicado.
- 10 A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados aquí tienen el mismo significado como comúnmente entiende alguien de habilidad ordinaria en la técnica al que pertenece esta invención.
- 15 Debe tenerse en cuenta que tal como se usa aquí y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un/una", "y" y "el/ella" incluyen referencias plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario.
- 20 Como se definió aquí, "derivado de" indica aislado directamente u obtenido a partir de una fuente particular o, alternativamente, que tiene características de identificación de una sustancia u organismo aislado u obtenido de una fuente particular.
- 25 Como se definió aquí, un "compuesto aislado" está libre de otros compuestos o sustancias.
- 30 Como se usa aquí, el término "alquilo" se refiere a un grupo hidrocarburo monovalente de cadena lineal o ramificada que tiene de uno a aproximadamente 12 átomos de carbono, que incluyen metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, tert-butilo, n-hexilo, y similares.
- 35 Como se usa aquí, "alquilo sustituido" se refiere a grupos alquilo que llevan además uno o más sustituyentes seleccionados de hidroxilo, alcoxi, mercapto, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, heterocíclico, heterocíclico sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, ariloxi, ariloxi sustituido, halógeno, ciano, nitro, amino, amido, --C(O)H, acilo, oxiacilo, carboxilo, sulfonilo, sulfonamida, sulfurilo y similares.
- 40 Como se usa aquí, "alqueno" se refiere a grupos hidrocarburo de cadena lineal o ramificada que tienen uno o más enlaces dobles carbono-carbono y que tienen en el intervalo desde aproximadamente 2 hasta 12 átomos de carbono, y "alqueno sustituido" se refiere a grupos alqueno que llevan uno o más sustituyentes como se ha establecido anteriormente.
- 45 Tal como se usa aquí, "alquino" se refiere a grupos hidrocarburo de cadena lineal o ramificada que tienen al menos un triple enlace carbono-carbono y que tienen en el intervalo desde aproximadamente 2 hasta 12 átomos de carbono, y "alquino sustituido" se refiere a grupos alquino que llevan uno o más sustituyentes como se ha indicado anteriormente.
- 50 Tal como se usa aquí, "arilo" se refiere a grupos aromáticos que tienen en el intervalo desde 6 hasta 14 átomos de carbono y "arilo sustituido" se refiere a grupos arilo que llevan además uno o más sustituyentes como se ha expuesto anteriormente.
- 55 Como se usa aquí, "heteroarilo" se refiere a anillos aromáticos que contienen uno o más heteroátomos (por ejemplo, N, O, S o similares) como parte de la estructura de anillo, y que tienen en el intervalo desde 3 hasta 14 átomos de carbono y "heteroarilo sustituido" se refiere a grupos heteroarilo que llevan además uno o más sustituyentes como se ha establecido anteriormente.
- 60 Como se usa aquí, "alcoxi" se refiere al fragmento -O-alquilo-, en el que alquilo es como se ha definido anteriormente, y "alcoxi sustituido" se refiere a grupos alcoxilo que llevan además uno o más sustituyentes como se ha establecido anteriormente.
- 65 Tal como se usa aquí, "tioalquilo" se refiere al fragmento --S-alquilo-, en el que alquilo es como se ha definido anteriormente, y "tioalquilo sustituido" se refiere a grupos tioalquilo que llevan además uno o más sustituyentes como se ha establecido anteriormente.
- Como se usa aquí, "cicloalquilo" se refiere a grupos alquilo que contienen un anillo que contiene en el intervalo desde aproximadamente 3 hasta 8 átomos de carbono, y "cicloalquilo sustituido" se refiere a grupos cicloalquilo que llevan además uno o más sustituyentes como se ha indicado anteriormente.
- Como se usa aquí, "heterocíclico", se refiere a grupos cíclicos (es decir, que contienen un anillo) que contienen uno o más heteroátomos (por ejemplo N, O, S o similares) como parte de la estructura de anillo, y que tiene en el intervalo desde 3 hasta 14 átomos de carbono y "heterocíclico sustituido" se refiere a grupos heterocíclicos que llevan además uno o más sustituyentes como se estableció anteriormente.

La cepa de Burkholderia

La cepa de Burkholderia descrita aquí es un complejo no Burkholderia cepacia, no Burkholderia plantari, no Burkholderia gladioli, Burkholderia sp y no patógena para vertebrados, tales como aves, mamíferos y peces. Esta cepa puede aislarse a partir de una muestra de suelo que usa procedimientos conocidos en la técnica y descritos por Lorch et al., 1995. La cepa de Burkholderia puede aislarse a partir de muchos tipos diferentes de suelo o medio de crecimiento. La muestra se pone en placas a continuación sobre agar de dextrosa de patata (PDA). Las bacterias son gram negativas, y forman colonias redondas, opacas de color crema que cambian a color rosado y rosado-marrón en color y mucoide o viscoso con el tiempo.

Las colonias se aíslan de las placas de agar de dextrosa de patata y se discriminan para aquellas que tienen características biológicas, genéticas, bioquímicas y/o enzimáticas de la cepa Burkholderia de la presente invención establecida en los siguientes Ejemplos. En particular, la cepa de Burkholderia tiene un gen 16S de ARNr que comprende una secuencia directa que es al menos aproximadamente 99,0%, preferiblemente aproximadamente 99,5%, más preferiblemente aproximadamente 99,9% y lo más preferiblemente 100% idéntica a la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 8, 11 y 12, y una secuencia directa que es al menos aproximadamente 99,0%, preferiblemente aproximadamente 99,5%, más preferiblemente aproximadamente 99,9% y lo más preferiblemente 100% idéntica a la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 9, 10, 13, 14 y 15 según se determina mediante análisis clustal. Además, como se establece a continuación, esta cepa de Burkholderia puede, como se establece a continuación, tener actividad pesticida, particularmente, virucida, herbicida, germicida, fungicida, nematocida, bactericida e insecticida y más particularmente herbicida, insecticida, fungicida y nematocida. No es patógena para los animales vertebrados, como mamíferos, aves y peces.

Adicionalmente, la cepa de Burkholderia produce al menos los compuestos pesticidas establecidos en la presente divulgación.

La cepa de Burkholderia es susceptible a kanamicina, cloranfenicol, ciprofloxacina, piperacilina, imipenem y una combinación de sulfametoxazol y trimetoprim y contiene los ácidos grasos 16:0, ciclo 17:0, 16:0 3- OH, 14: 0, ciclo 19:0, 18: 0.

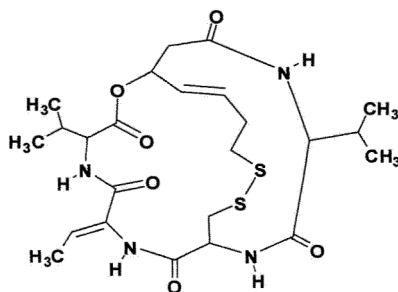
Esta cepa de Burkholderia puede obtenerse cultivando un microorganismo que tiene las características de identificación de Burkholderia A396 (NRRL No. de acceso B-50319) sobre Agar de Dextrosa de Patata (PDA) o en un medio de fermentación que contiene fuentes de carbono definidas tales como glucosa, maltosa, fructosa, galactosa y fuentes de nitrógeno indefinidas tales como peptona, triptona, soja y amina NZ.

Compuestos pesticidas

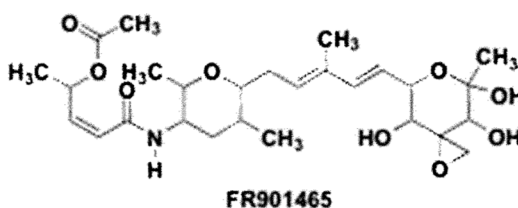
El compuesto pesticida divulgado aquí puede tener las siguientes propiedades: (a) se puede obtener a partir de una especie de "Burkholderia novedosa, por ejemplo, A396.

La presente invención divulga un compuesto aislado que tiene actividad pesticida obtenible a partir de una especie de Burkholderia seleccionada de

(i) un compuesto que tiene una estructura

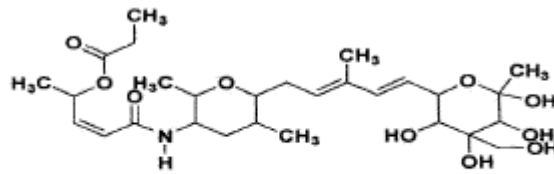


(ii) un compuesto que tiene una estructura



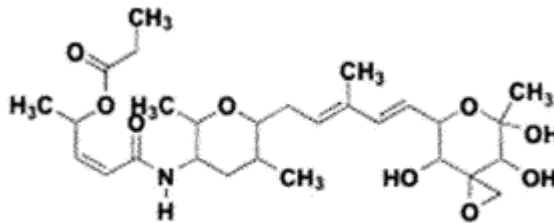
(iii) un compuesto que tiene una estructura





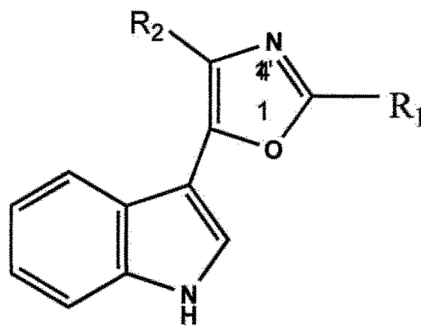
Templamida A

5 (iv) un compuesto que tiene una estructura



Templamida B

(v) un compuesto que tiene una estructura



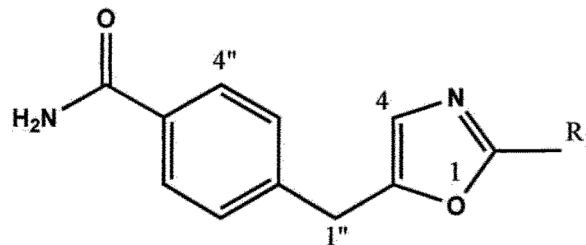
##STR002a##

10

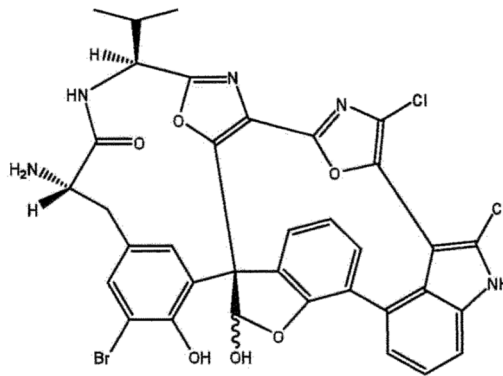
en el que R1 es isobutilo y R2 es un metil éster de ácido carboxílico; y

15

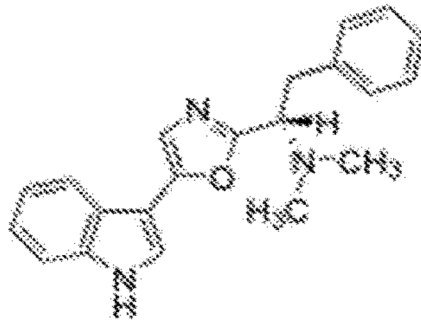
(vi) un compuesto que tiene una estructura



en el que R1 es isobutilo;



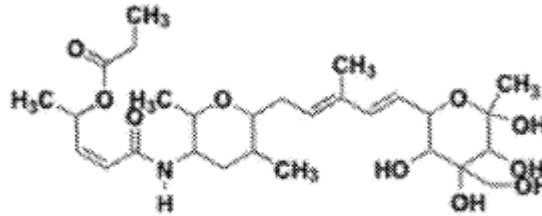
(xix)



5

Estos son ya sea de materiales naturales o compuestos obtenidos de fuentes comerciales o por síntesis química.

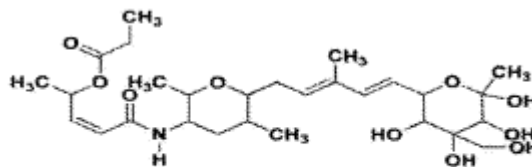
En una realización más particular, el compuesto es Templamida A con la siguiente estructura:



Templamida A

10

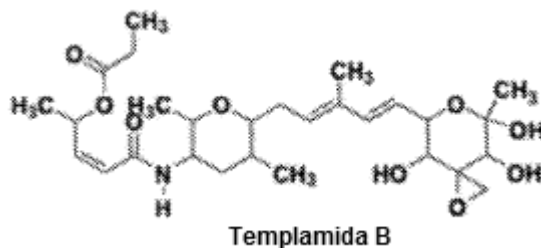
En una realización particular, el compuesto tiene la estructura:



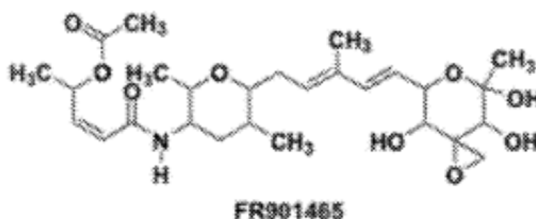
Templamida A

15

En una realización más particular, el compuesto es la Templamida B con la siguiente estructura:



5 En una realización más particular, el compuesto es un compuesto FR901465 conocido que se aisló anteriormente a partir del caldo de cultivo de una bacteria de *Pseudomonas* sp. No. 2663 (Nakajima et al., 1996) y se ha reportado que tiene actividad anticáncer con la siguiente estructura:



#### Composiciones

10 Un cultivo sustancialmente puro, una fracción celular o un sobrenadante y compuestos producidos por la cepa *Burkholderia* de la presente invención, pueden formularse en composiciones pesticidas.

15 Las sustancias establecidas anteriormente pueden formularse de cualquier manera. Ejemplos de formulaciones no limitantes incluyen, pero no se limitan a, concentrados emulsificables (EC), polvos que se pueden humectar (WP), líquidos solubles (SL), aerosoles, soluciones de concentrado de volumen ultrabajo (ULV), polvos solubles (SP), microencapsulación, agua (FL), microemulsiones (ME), nanoemulsiones (NE), etc. En particular, el concentrado, polvos, gránulos y emulsiones se pueden liofilizar. En cualquier formulación descrita aquí, el porcentaje del ingrediente activo está dentro de un intervalo de 0,01% a 99,99%.

20 Las composiciones pueden estar en forma de un líquido, gel o sólido. Las composiciones líquidas comprenden compuestos pesticidas derivados de dicha cepa de *Burkholderia*, por ejemplo una cepa que tiene las características de identificación de *Burkholderia* A396 (NRRL No. de acceso B-50319).

25 Se puede preparar una composición sólida suspendiendo un vehículo sólido en una solución de compuestos pesticidas y secando la suspensión bajo condiciones suaves, tales como evaporación a temperatura ambiente o evaporación al vacío a 65°C o menos.

30 Una composición de la invención puede comprender compuestos encapsulados en gel derivados de la cepa de *Burkholderia* de la presente invención. Tales materiales encapsulados en gel pueden prepararse mezclando un agente formador de gel (por ejemplo, gelatina, celulosa o lignina) con una solución de compuestos pesticidas usada en el método de la invención; y que induce la formación de gel del agente.

35 La composición puede comprender adicionalmente un tensioactivo para ser usado con el propósito de emulsificar, dispersar, humectar, extender, integrar, controlar la desintegración, estabilizar los ingredientes activos y mejorar la fluidez o la inhibición del óxido. En una realización particular, el tensioactivo es un tensioactivo no iónico no fitotóxico que preferiblemente pertenece a la Lista 4B de EPA. En otra realización particular, el tensioactivo no iónico es monolaurato de polioxietileno (20). La concentración de tensioactivos puede variar entre 0,1-35% de la formulación total, el intervalo preferido es 5-25%. La elección de agentes dispersantes y emulsificantes, tales como agentes dispersantes y emulsificantes no iónicos, aniónicos, anfóteros y catiónicos, y la cantidad empleada se determina por la naturaleza de la composición y la capacidad del agente para facilitar la dispersión de estas composiciones.

45 La composición puede comprender además otro microorganismo y/o pesticida (por ejemplo, nematocida, fungicida, insecticida). El microorganismo puede incluir, pero no está limitado a, un agente derivado de *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Brevibacillus* sp., *Lecanicillium* sp., no *Ampelomyces* sp., *Pseudozyma* sp., *Streptomyces* sp., *Burkholderia* sp, *Trichoderma* sp, *Gliocladium* sp. Alternativamente, el agente puede ser un aceite natural o un producto de aceite que tiene actividad fungicida y/o insecticida (por ejemplo, aceite parafínico, aceite de árbol de té, aceite de hierba de limón, aceite de clavo, aceite de canela, aceite cítrico, aceite de romero).

La composición, en particular, puede comprender además un insecticida. El insecticida puede incluir pero no está limitado a avermectina, bacillus thuringiensis, aceite de nim y azadiractina, spinosad, Chromobacterium subtsugae, extracto de eucalipto, bacteria entomopatógena o hongos tales como Beauveria bassiana y Metarrhizium anisopliae e insecticidas químicos que incluyen pero no están limitados a compuestos organoclorados, compuestos organofosforados, carbamatos, piretroides y neonicotinoides.

La composición puede comprender además un nematocida. El nematocida puede incluir, pero no se limita a nematocidas químicos tales como fenamifos, aldicarb, oxamil, carbofurano, producto natural neamticida, avermectina, los hongos Paecilomyces lilacinus y Muscodor spp., la bacteria Bacillus firmus y otros Bacillus spp. y Pasteuria penetrans.

La composición puede comprender además un biofungicida tal como un extracto de R. sachalinensis (Regalia) o un fungicida. Dichos fungicidas incluyen, pero no se limitan a, un agente antifúngico de sitio individual que puede incluir pero no está limitado a benzimidazol, un inhibidor de desmetilación (DMI) (por ejemplo, imidazol, piperazina, pirimidina, triazol), morfolina, hidroxipirimidina, anilino pirimidina, fosfortiolato, quinona fuera del inhibidor, quinolina, dicarboximida, carboximida, fenilamida, anilino pirimidina, fenilpirrol, hidrocarburo aromático, ácido cinámico, hidroxianilida, antibiótico, polioxina, acilamina, ftalimida, bencenoide (xilalalanina). En aún otra realización, el agente antifúngico es un inhibidor de desmetilación seleccionado del grupo que consiste en imidazol (por ejemplo triflumizol), piperazina, pirimidina y triazol (por ejemplo, bitertanol, myclobutanilo, penconazol, propiconazol, triadimefón, bromuconazol, ciproconazol, diniconazol, fenbuconazol, hexaconazol, tebuconazol, tetraconazol, propiconazol).

El agente antimicrobiano también puede ser un fungicida químico no inorgánico de múltiples sitios seleccionado del grupo que consiste en un nitrilo (por ejemplo, cloronitrilo o fludioxonil), quinoxalina, sulfamida, fosfonato, fosfito, ditiocarbamato, clorocitios, fenilpiridinamina, ciano-acetamida oxima.

Las composiciones se pueden aplicar usando métodos conocidos en la técnica. Específicamente, estas composiciones se pueden aplicar a plantas o partes de plantas. Se debe entender por plantas en el presente contexto como que indican todas las plantas y poblaciones de plantas tales como plantas silvestres o plantas de cultivos deseadas y no deseadas (incluyendo plantas de cultivo que ocurren naturalmente). Las plantas de cultivo pueden ser plantas que pueden obtenerse mediante métodos convencionales de engendramiento y optimización de plantas o por métodos de ingeniería biotecnológica y genética, o por combinaciones de estos métodos, que incluyen las plantas transgénicas y que incluyen los cultivos vegetales que pueden ser protegidos o no protegibles por los derechos del criador. Por partes de plantas se debe entender que indican todas las partes y órganos de plantas por encima y por debajo del suelo, tales como brotes, hojas, flores y raíces, ejemplo que pueden ser mencionados que son hojas, agujas, troncos, tallos, flores, cuerpos de frutas, frutos, semillas, raíces, tubérculos y rizomas. Las partes de la planta también incluyen material cosechado, y material de propagación vegetativo y generativo, por ejemplo, esquejes, tubérculos, rizomas, ramificaciones y semillas.

El tratamiento de las plantas y partes de plantas con las composiciones establecidas anteriormente puede llevarse a cabo directamente o permitiendo que las composiciones actúen sobre su entorno, hábitat o espacio de almacenamiento, por ejemplo por inmersión, atomización, evaporación, empañamiento, dispersión, pintando, inyectando. En el caso de que la composición se aplique a una semilla, la composición se puede aplicar a la semilla como una o más capas antes de sembrar la semilla usando una o más capas usando métodos conocidos en la técnica.

Como se ha indicado anteriormente, las composiciones pueden ser composiciones herbicidas. La composición puede comprender además uno o más herbicidas. Estos pueden incluir, pero no están limitados a, un bioherbicida y/o un herbicida químico. El bioherbicida puede seleccionarse del grupo que consiste en clavo, canela, hierba de limón, aceites cítricos, aceite de cáscara de naranja, tentoxina, cornexistina, toxina AAL, leptospermona, thaxtomin, sarmentina, momilactona B, sorgoleona, ascaulatoxina y ascaulatoxina aglicona. El herbicida químico puede incluir, pero no está limitado a, diflufenzopir y sales de los mismos, dicamba y sales de los mismos, topramezona, tembotriona, S-metolaclo, atrazina, mesotriona, primisulfurón-metilo, ácido 2,4-diclorofenoxiacético, nicosulfurón, tifensulfurón-metilo, asulam, metribuzin, diclofopmetilo, fluazifop, fenoxaprop-p-etilo, asulam, oxifluorfen, rimsulfuron, mecoprop, y quinclorac, tiobencarb, clomazona, cihalofop, propanilo, bensulfuron-metilo, penoxsulam, triclopir, imazetapir, halosulfuron-metilo, pendimetalina, bispiribac-sodio, carfentrazona etilo, bentazon de sodio/acifluorfen de sodio, glifosato, glufosinato y ortosulfamurón.

Las composiciones herbicidas se pueden aplicar en forma líquida o sólida como formulaciones antes de la emergencia o después de la emergencia.

Para las formulaciones en seco antes de la emergencia, el tamaño del gránulo del vehículo es típicamente de 1-2 mm (diámetro) pero los gránulos pueden ser más pequeños o más grandes dependiendo de la cobertura de tierra requerida. Los gránulos pueden comprender partículas porosas o no porosas.

Para las formulaciones después de la emergencia, los componentes de formulación usado pueden contener arcillas de esmectita, arcillas de atapulgita y arcillas hinchables similares, espesantes tales como gomas de xantano, goma arábica y otros espesantes polisacáridos, así como estabilizadores de dispersión tales como tensioactivos no iónicos (por ejemplo polioxietileno (20) Monolaurato).

5

Usos

Las composiciones y compuestos pesticidas derivados de la cepa de Burkholderia establecidos aquí pueden usarse como pesticidas, particularmente como insecticidas, nematocidas, fungicidas y herbicidas.

10

Específicamente, los nematodos que pueden controlarse usando el método establecido anteriormente incluyen, pero no están limitados a, nemátodos parasitarios tales como nematodos agalladores, anillo, aguijón, lanza, quiste y lesión, que incluyen, pero no están limitados a, *Meloidogyne*, *Heterodera* y *Globodera* spp; particularmente *Meloidogyne incognita* (nematodos agalladores), así como *Globodera rostochiensis* y *globodera pailida* (nematodos del quiste de la patata); *Heterodera glycines* (nematodo del quiste de la soja); *Heterodera schachtii* (nematodo del quiste de la remolacha); y *Heterodera avenae* (nemátodo de quiste de cereales).

15

Los insectos fitopatógenos controlados por el método de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, insectos del orden

20

(a) Lepidoptera, por ejemplo, *Acleris* spp., *Adoxophyes* spp., *Aegeria* spp., *Agrotis* spp., *Alabama argillaceae*, *Amylois* spp., *Anticarsia gemmatalis*, *Archips* spp., *Argyrotaenia* spp., *Autographa* spp., *Busseola fusca*, *Cadra cautella*, *Carposina nipponensis*, *Chilo* spp., *Choristoneura* spp., *Clysia ambiguella*, *Cnaphalocrocis* spp., *Cnephasia* spp., *Cochylys* spp., *Coleophora* spp., *Crociodomia binotalis*, *Cryptophlebia leucotreta*, *Cydia* spp., *Diatraea* spp., *Diparopsis castanea*, *Earias* spp., *Ephestia* spp., *Eucosma* spp., *Eupoecilia ambiguella*, *Euproctis* spp., *Euxoa* spp., *Grapholita* spp., *Hedya nubiferana*, *Heliothis* spp., *Hellula undalis*, *Hyphantria cunea*, *Keiferia lycopersicella*, *Leucoptera scitella*, *Lithocollethis* spp., *Lobesia botrana*, *Lymantria* spp., *Lyonetia* spp., *Malacosoma* spp., *Mamestra brassicae*, *Manduca sexta*, *Operophtera* spp., *Ostrinia nubilalis*, *Pammene* spp., *Pandemis* spp., *Panolis flammea*, *Pectinophora gossypiella*, *Phthorimaea operculella*, *Pieris rapae*, *Pieris* spp., *Plutella xylostella*, *Prays* spp., *Scirpophaga* spp., *Sesamia* spp., *Sparganothis* spp., *Spodoptera* spp., *Synanthedon* spp., *Thaumetopoea* spp., *Tortrix* spp., *Trichoplusia ni* y *Yponomeuta* spp.;

25

(b) Coleoptera, por ejemplo, *Agriotes* spp., *Anthonomus* spp., *Atomaria linearis*, *Chaetocnema tibialis*, *Cosmopolites* spp., *Curculio* spp., *Dermestes* spp., *Diabrotica* spp., *Epilachna* spp., *Eremnus* spp., *Leptinotarsa decemlineata*, *Lissorhoptrus* spp., *Melolontha* spp., *Oryzaephilus* spp., *Otiorynchus* spp., *Phlyctinus* spp., *Popillia* spp., *Psylliodes* spp., *Rhizopertha* spp., *Scarabeidae*, *Sitophilus* spp., *Sitotroga* spp., *Tenebrio* spp., *Tribolium* spp. y *Trogoderma* spp.; (c) Orthoptera, por ejemplo, *Blatta* spp., *Blattella* spp., *Gryllotalpa* spp., *Leucophaea maderae*, *Locusta* spp., *Periplaneta* spp. y *Schistocerca* spp.; (d) Isoptera, por ejemplo, *Reticulitermes* spp.; (e) Psocoptera, por ejemplo, *Liposcelis* spp.; (f) Anoplura, por ejemplo, *Haematopinus* spp., *Linognathus* spp., *Pediculus* spp., *Pemphigus* spp. y *Phylloxera* spp.; (g) Mallophaga, por ejemplo, *Damalinea* spp. y *Trichodectes* spp.; (h) Thysanoptera, por ejemplo,

35

*Frankliniella* spp., *Hercinotrips* spp., *Taeniothrips* spp., *Thrips palmi*, *Thrips tabaci* y *Scirtothrips aurantii*; (i) Heteroptera, por ejemplo, *Cimex* spp., *Distantiella theobroma*, *Dysdercus* spp., *Euchistus* spp., *Eurygaster* spp., *Leptocorisa* spp., *Nezara* spp., *Piesma* spp., *Rhodnius* spp., *Sahlbergella singularis*, *Scotinophara* spp. y *Tniatoma* spp.; (j) Homoptera, por ejemplo, *Aleurothrixus floccosus*, *Aleyrodes brassicae*, *Aonidiella* spp., *Aphididae*, *Aphis* spp., *Aspidiotus* spp., *Bemisia tabaci*, *Ceroplaster* spp., *Chrysomphalus aonidium*, *Chrysomphalus dictyospermi*,

40

*Coccus hesperidum*, *Empoasca* spp., *Eriosoma larigerum*, *Erythroneura* spp., *Gascardia* spp., *Laodelphax* spp., *Lecanium corni*, *Lepidosaphes* spp., *Macrosiphus* spp., *Myzus* spp., *Nephotettix* spp., *Nilaparvata* spp., *Paratoria* spp., *Pemphigus* spp., *Planococcus* spp., *Pseudaulacaspis* spp., *Pseudococcus* spp., *Psylla* spp., *Pulvinaria aethiopica*, *Quadraspidotus* spp., *Rhopalosiphum* spp., *Saissetia* spp., *Scaphoideus* spp., *Schizaphis* spp., *Sitobion* spp., *Trialeurodes vaporariorum*, *Trioza erytrae* y *Unaspis citri*; (k) Hymenoptera, for example, *Acromyrmex*, *Atta* spp., *Cephus* spp., *Diprion* spp., *Diprionidae*, *Gilpinia polytoma*, *Hoplocampa* spp., *Lasius* spp., *Monomorium pharaonis*, *Neodiprion* spp., *Solenopsis* spp. y *Vespa* spp.; (l) Diptera, for example, *Aedes* spp., *Antherigona soccata*, *Bibio hortulanus*, *Calliphora erythrocephala*, *Ceratitis* spp., *Chrysomyia* spp., *Culex* spp., *Cuterebra* spp., *Dacus* spp., *Drosophila melanogaster*, *Fannia* spp., *Gastrophilus* spp., *Glossina* spp., *Hypoderma* spp., *Hyppobosca* spp., *Liriomyza* spp., *Lucilia* spp., *Melanagromyza* spp., *Musca* spp., *Oestrus* spp., *Orseolia* spp., *Oscinella frit*, *Pegomyia*

45

*hyoscyami*, *Phorbia* spp., *Rhagoletis pomonella*, *Sciara* spp., *Stomoxys* spp., *Tabanus* spp., *Tannia* spp. y *Tipula* spp.; (m) Siphonaptera, por ejemplo, *Ceratophyllus* spp. y *Xenopsylla cheopis* y (n) del orden Thysanura, por ejemplo, *Lepisma saccharina*. Los ingredientes activos de acuerdo con la invención pueden utilizarse además para controlar escarabajos curciferos (*Phyllotreta* spp.), gusanos de raíz (*Delia* spp.), gorgojo de cebada (*Ceutorhynchus* spp.) y áfidos en cultivos de semillas oleaginosas tales como canola (colza), semillas de mostaza, y sus híbridos, así

50

como el arroz y el maíz.

55

En una realización particular, el insecto puede ser un miembro de los Spodoptera, más particularmente, *Spodoptera exigua*, *Myzus persicae*, *Plutella xylostella* o *Euschistus* sp.

60

Las sustancias y composiciones también se pueden usar para modular la emergencia en ya sea una formulación preemergente o postemergente de malezas monocotiledóneas, de juncia o dicotiledóneas. En una realización

particular, las malezas pueden ser *Chenopodium*, *Abutilon theophrasti*, *Helianthus annuus*, *Ambrosia artemesifolia*, *Amaranthus retroflexus*, *Convolvulus arvensis*, *Brassica kaber*, *Taraxacum officinale*, *Solanum nigrum*, *Malva negligencia*, *Setaria lutescens*, *Bromus tectorum*, *Poa annua*, *Poa Pratensis*, *Lolium perenne* L. var. Pace, *Festuca arundinaceae* Schreb. Var. Azteca II, Himno II, LS 1100, *Echinochloa crus-galli*, *Lactuca sativa*. La cepa de *Burkholderia*, los compuestos y composiciones expuestos anteriormente también se pueden usar como un fungicida. El hongo elegido puede ser *Fusarium* sp., *Botrytis* sp., *Monilinia* sp., *Colletotrichum* sp, *Verticillium* sp.; *Microphomina* sp., *Phytophthora* sp, *Mucor* sp., *Podosphaera* sp. *Rhizoctonia* sp., *Perono espora* sp., *Geotrichum* sp., *Phoma* y *Penicillium*. En otra realización más particular, las bacterias son *Xanthomonas*.

10 La invención se describirá ahora en mayor detalle haciendo referencia a los siguientes ejemplos no limitantes.

#### Ejemplos

15 Las composiciones y métodos establecidos anteriormente se ilustrarán adicionalmente en los siguientes Ejemplos no limitantes. Los ejemplos son ilustrativos de diferentes realizaciones solamente y no limitan la invención reivindicada con respecto a los materiales, condiciones, relaciones de peso, parámetros de proceso y similares citados en la presente memoria.

#### 20 1. Ejemplo 1. Aislamiento e identificación del microbio

##### 1.1 Aislamiento del microorganismo

25 El microbio se aísla usando técnicas establecidas conocidas en la técnica a partir de una muestra de suelo recogida bajo un árbol de hoja perenne en el templo Rinnoji, Nikko, Japón. El aislamiento se realiza usando agar de dextrosa de patata (PDA) que usa un procedimiento descrito en detalle por Lorch et al., 1995. En este procedimiento, la muestra de suelo se diluye cebador en agua estéril, después de lo cual se colocan en placas en un medio de agar sólido tal como agar de dextrosa de patata (PDA). Las placas se cultivan a 25°C durante cinco días, después de lo cual se aíslan las colonias microbianas individuales en placas de PDA separadas. La bacteria aislada es gram negativa y forma colonias redondas opacas de color crema que cambian a color rosado y rosado-marrón y mucoides o viscosas con el tiempo.

##### 1.2. Identificación en el microorganismo

35 El microbio se identifica en base a la secuenciación de genes usando cebadores bacterianos universales para amplificar la región 16S de ARNr. Se usa el siguiente protocolo: se cultiva *Burkholderia* sp A396 en placas de agar de dextrosa de patata. El crecimiento de una placa de 24 horas se raspa con un bucle estéril y se vuelve a suspender en un amortiguador de extracción de ADN. El ADN se extrae usando el kit de extracción de ADN microbiano MoBio Ultra Clean. El extracto de ADN se comprueba en calidad/cantidad ejecutando 5 µl en un gel de agarosa al 1%.

40 Las reacciones de PCR se establecen de la siguiente manera: 2 µl de extracto de ADN, 5 µl de amortiguador de PCR, 1 µl de dNTP (10 mM cada uno), 1.25 µl de cebador directo (27F, 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' (SEQ ID NO:1), 1.25 µl de cebador inverso (907R, 5'-CCGTC AATTCCTTTGAGTTT-3 ') y 0.25 µl de enzima Taq. El volumen de reacción se completa hasta 50 µl usando agua estéril libre de nucleasa La reacción de PCR incluye un paso de desnaturalización inicial a 95°C durante 10 minutos, seguido de 30 ciclos de 94°C/30 seg, 57°C/20 seg, 72°C/ 30 seg, y un paso de extensión final a 72°C durante 10 minutos.

45 La concentración y tamaño aproximado del producto se calcula ejecutando un volumen de 5 µl en un gel de agarosa al 1% y comparando la banda del producto con una escala de masa.

50 Los excesos de cebadores, dNTP y enzima se eliminan del producto de PCR con el kit de limpieza de PCR MoBio. El producto de PCR limpiado como secuenciado directamente usando los cebadores 27F (igual que anteriormente), 530F (5'-GTGCCAGCCGCCGCGG-3' (SEQ ID NO: 3)), 1114F (5'-GCAACGAGCGCAACCC) y 1525R (5'-AAGGAGGTGWTCCARCC-3'), 1100R (5'-GGGTTGCGCTCGTTG -3' (SEQ ID NO: 6)), 519R (5' -GWATTACCGCGGCKGCTG - 3' (SEQ ID NO: 7).

55 La secuencia genética 16S de ARNr de la cepa A396 se compara con las secuencias genéticas 16s de ARNr disponibles de representantes de las β-proteobacterias que usan BLAST. La cepa A395 A396 está estrechamente relacionada con miembros del complejo *Burkholderia cepacia*, con una similitud de 99% o más con varios aislamientos de *Burkholderia multivorans*, *Burkholderia vietnamensis* y *Burkholderia cepacia*. Una búsqueda de BLAST que excluye el complejo de *B. cepacia*, mostró 98% de similitud con *B. plantarii*, aislamientos de *B. gladioli* y *Burkholderia* sp.

60 Un árbol de la distancia de los resultados que usan el método de unión vecino, mostró que A396 está relacionado con *Burkholderia multivorans* y otros aislados de *Burkholderia cepacia* complejo. *Burkholderia plantarii* y *Burkholderia glumae* agrupados en una rama separada del árbol.

Se encontró que la cepa de *Burkholderia* aislada contenía las siguientes secuencias: secuencia directa, secuencia de ADN con cebador 27F, 815 nucleótidos (SEQ ID NO: 8); secuencia inversa, 1453 pb, usando cebadores 1525R, 1100R, 519R (SEQ ID NO: 9); secuencia inversa de 824 pb usando el cebador 907R (SEQ NO: 10); secuencia directa 1152 pb usando el cebador 530F (SEQ ID NO: 11); secuencia directa 1067 pb usando cebador 1114F (SEQ ID NO: 12); secuencia inversa 1223 pb usando cebador 1525R (SEQ NO: 13); secuencia inversa 1216 pb usando el cebador 1100R (SEQ ID NO: 14); secuencia inversa 1194 pb usando cebador 519R (SEQ ID NO: 15).

### 1.3. Prueba de que *Burkholderia* A396 no pertenece al complejo *Burkholderia* cepacia

#### 1.3.1 Trabajo de Biología Molecular usando cebadores de PCR específicos

Con el fin de confirmar la identificación de *Burkholderia* A396 como *Burkholderia* multivorans, se realizó secuenciación adicional de los genes de limpieza. *Burkholderia* multivorans es un miembro conocido del complejo *Burkholderia* cepacia. Los esfuerzos se centran en el PCR de genes *recA*, tal como se divulga por Mahenthiralingam et al., 2000. Se usan los siguientes cebadores: (a) BCR1 y BCR2 establecidos en Mahenthiralingam et al., 2000 para confirmar que el complejo de *B. cepacia* coincide y (b) BCRBM1 y BCRBM2 establecido en Mahenthiralingam et al., 2000 para confirmar que *B. multivorans* coincide. Una reacción de PCR del rendimiento del producto para el cebador conjunto de cebadores confirmaría que el microbio pertenece al complejo de *B. cepacia*. Una reacción de PCR del rendimiento del producto para el segundo conjunto de cebadores confirmaría que el microbio es de hecho *B. multivorans*.

No se obtiene ningún producto de PCR para ninguno de los pares de cebadores. El rendimiento de la reacción de PCR y los cebadores se ensaya usando *Burkholderia* multivorans ATCC 17616 (control positivo) y *Pseudomonas fluorescens* (control negativo). Se observan bandas fuertes, ambas para *B. multivorans* que usa ambos conjuntos de cebadores. No se observan bandas para *Pseudomonas fluorescens*. Los resultados indican que A396 es una *Burkholderia*, pero no un miembro del complejo *B. cepacia*, y no *Burkholderia* multivorans. Esto también se demuestra en un experimento de cultivo comparativo en el que tanto A396 como un cultivo tipo de *B. multivorans* se cultivan lado a lado en un cultivo de agitación, y el crecimiento se controla diariamente usando mediciones de densidad óptica a 600 nm. Bajo las condiciones establecidas, la nueva especie A396 creció mucho más rápidamente que la cepa de tipo *B. multivorans* (Figura 1).

#### 1.3.2 Hibridación ADN-ADN

Con el fin de confirmar que el A396 aislado es una nueva especie de *Burkholderia*, se lleva a cabo un experimento de hibridación ADN-ADN con *Burkholderia* multivorans (la secuencia 16S de ARNr más cercana coincide). La biomasa tanto para A396 como *B. multivorans* se produce en el caldo de ISP2, cultivada durante 48 horas a 200 rpm/25°C en matraces de Fernbach. La biomasa se cosecha aseptícamente por centrifugación. El caldo se decanta y el sedimento celular se resuspende en una solución 1:1 de agua:isopropanol. Los experimentos de hibridación ADN-ADN son realizados por la DSMZ, la Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares en Alemania. El ADN se aísla usando una célula de presión francesa (Thermo Spectronic) y se purifica por cromatografía sobre hidroxipatita como es descrito por Cashion et al., 1977. La hibridación ADN-ADN se lleva a cabo como es descrito por De Ley et al., 1970 bajo consideración de las modificaciones descritas por Huss et al., 1983 que usa un espectrofotómetro modelo Cary 100 Bio UV/VIS equipado con un cambiador multicelular Peltier 6x6 termostático y un controlador de temperatura con sonda de temperatura in situ (Varian). DSMZ reportó % de ADN-ADN de manera similar entre A396 y *Burkholderia* multivorans del 37,4%. Los resultados indican que la cepa de *Burkholderia* sp A396 no pertenece a la especie de *Burkholderia* multivorans cuando se consideran las recomendaciones de un valor umbral de 70% de similitud entre ADN y ADN para la definición de especies bacterianas por el comité ad hoc (Wayne et al., 1987).

### 1.4. Perfil bioquímico usando placas Biolog GN2

Para el perfil de uso de la fuente de carbono, se cultiva A396 durante la noche sobre agar de dextrosa de patata (PDA). El cultivo se transfiere al agar BUG para producir un cultivo adecuado para los experimentos Biolog como se recomienda por el fabricante (Biolog, Hayward, CA).

El perfil bioquímico del microorganismo se determina inoculando sobre una placa Biolog GN2 y leyendo la placa después de una incubación de 24 horas que usa el sistema de microestación MicroLog 4-automatizado. Se intenta identificar las bacterias desconocidas comparando su patrón de uso de carbono con la base de datos negativa de Microlog 4 Gram.

No se encuentran concordancias definitivas claras en el perfil de Biolog. Las coincidencias más cercanas todas tienen menos del 35% de similitud con A396: *Pseudomonas spinosa* (*Burkholderia*), *Burkholderia* cepacia, y *Burkholderia pseudomallei*. Los resultados se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Perfil bioquímico de A396

ES 2 625 607 T3

Substrato	Resultado	Substrato	Resultado
Ciclodextrina	-	L-arabinosa	-
Dextrina	-	D-arabitol	-
Glucógeno	-	D-celobiosa	-
Tween 40	+	Eritritol	-
Tween 80	+	D-Fructosa	-
N-acetil-D-galactosamina	-	L-Fucosa	-
N-acetil-D-glucosamina	-	D-Galactosa	+/-
Adonitol	-	Gentibiosa	-
Ácido succínico Mon-metílico éster	-	D-Glucosa	+
Ácido acético	-	m-Inositol	-
Ácido cis-aconítico	-	D-Lactosa	-
Ácido cítrico	-	Lactulosa	-
Ácido fórmico	+	Maltosa	-
Lactona de Ácido D-Galactónico	-	D-Manitol	-
Ácido D-Galacturónico	-	D-Mannosa	-
Ácido D-Glucónico	-	D-Melibiosa	-
Ácido D-Glucosaminico	-	$\beta$ -metil-D-glucósido	-
Ácido D-Glucurónico	-	D-Psicososa	-
Ácido $\alpha$ -hidroxibutírico	-	D-Rafinosa	-
Ácido $\beta$ -hidroxibutírico	+	L-Rhamonosa	-
Ácido $\gamma$ -hidroxibutírico	-	D-Sorbitol	-
Ácido P-hidroxifenilacético	-	Sacarosa	-
Ácido itacónico	-	D-Trehalosa	+
Ácido $\alpha$ -ceto butírico	-	Turanosa	-
Ácido $\alpha$ -ceto glutárico	-	Xilitol	-
Ácido $\alpha$ -ceto valérico	-	Metil éster del ácido pirúvico	-
Ácido D,L-láctico	-	Uridina	-
Ácido malónico	-	Timidina	-
Ácido propiónico	+	Fenilmetilamina	-
Ácido quínico	-	Putrescina	-
Ácido D-sacárico	-	2 - aminoetanol	-
Ácido sebácico	-	2,3-butanodiol	-
Ácido succínico	+	Glicerol	+/-
Ácido bromosuccínico	-	D, L-a-glicerol fosfato	+/-
Ácido succínico	-	$\alpha$ -D-Glucosa-1-fosfato	-
Glucuronamida	-	D-glucosa-6-fosfato	+



Substrato	Resultado	Substrato	Resultado
L - alaninamida	+	Ácido γ-amino butírico	+
D-Alanina	-	Ácido urocánico	-
L-alanina	+	Inosina	-
L - alanil - glicina	-	L-fenilalanina	+
L-asparagina	+	L-prolina	-
Acido L - aspártico	+/-	L - piroglutámico	-
Acido L-glutámico	+	D-serina	-
Acido glicil-L-Aspártico	-	L-serina	-
Acido glicil-L-glutámico	-	L-treonina	-
L-histidina	-	D, L - carnitina	-
Hidroxi-L-prolina	+	L-ornitina	-
L-leucina		-	

1.5. Composición de ácidos grasos

Después de la incubación durante 24 horas a 28°C, se cosecha un bucle de células bien cultivadas y se preparan metil ésteres de ácidos grasos, se separan e identifican usando el Sistema de Identificación Microbiana Sherlock (MIDI) como se describió (véase Vandamme et al., 1992). Los ácidos grasos predominantes presentes en la Burkholderia A396 son los siguientes: 16: 0 (24.4%), ciclo 17:0 (7.1%), 16:0 3- OH (4.4%), 14:0 (3,6%), 19:0 ω8c (2.6%) ciclo, 18:0 (1.0%). Característica 8 resumida (que comprende 18:1 ω7c) y la característica 3 resumida (que comprende 16:1 ω7c y 16:1 ω6c) correspondió al 26.2% y al 20.2% del área total máxima, respectivamente. La característica 2 resumida que comprende 12:0 ALDE, 16:1 iso I y 14:0 3-OH) corresponde al 5.8% del área total máxima mientras que la característica 5 resumida que comprende 18:0 ANTE y 18:2 ω6,9c corresponde a 0.4%. Otros ácidos grasos detectados en A396 en cantidades menores incluían: 13:1 a 12-13 (0.2%), 14:1 ω5c (0.2%), 15:0 3-OH (0.13%), 17:1 ω7c (0.14%), 17:0 (0.15%), 16:0 iso 3-OH (0.2%), 16:0 2-OH (0.8%), 18:1 ω7c 11-metilo (0.15%), y 18:1 2-OH (0.4%).

Una comparación de la composición de ácidos grasos de A396 con aquellos de cepas microbianas conocidas en la base de datos MIDI sugirió que los ácidos grasos en la cepa A396 novedosa eran los más similares con aquellos de Burkholderia cenocepacia.

1.6 Resistencia a antibióticos

La susceptibilidad antibiótica de Burkholderia A396 se prueba usando discos antibióticos en el medio Muller-Hinton como se describió en la hoja de datos técnica # 535 de PML Microbiological. Los resultados obtenidos después de 72 horas de incubación a 25°C se presentan en la Tabla 2 a continuación.

Tabla 2: Susceptibilidad de MBI-206 para diferentes antibióticos. +++ muy susceptible, ++ susceptible, - resistente

	Concentración (ug)	Susceptible
Tetraciclina	30	-
Kanamicina	30	+++
Eritromicina	15	-
Streptomycin	10	-
Penicilina	10	-
Ampicilina	10	-
Oxitetraciclina	30	-
Cloranfenicol	30	++
Ciprofloxacina	5	++
Gentamicina	10	-
Piperacilina	100	+++
Cefuroxima	30	-

Imipenem	10	+++
Sulfametoxazol- Trimetoprim	23.75/25	- - ++

Los resultados indican que el espectro de susceptibilidad a antibióticos de *Burkholderia* A396 es bastante diferente de cepas patógenas de complejo de *B. cepacia*. *Burkholderia* A396 es susceptible a kanamicina, cloranfenicol, ciprofloxacino, piperacilina, imipenem, y una combinación de sulfametoxazol y trimetoprim. Como una comparación, Zhou et al., 2007 ensayo la susceptibilidad de 2,621 cepas diferentes en el complejo de *B. cepacia* aisladas de pacientes con fibrosis quística, y encontraron que sólo el 7% y el 5% de todas las cepas eran susceptibles imipenem o ciprofloxacina, respectivamente. También encontraron que el 85% de todas las cepas eran resistentes al cloranfenicol (15% susceptibles) y el 95% eran resistentes (5% susceptibles) a la combinación de sulfametoxazol y trimetoprim. Los resultados de Zhou et al., 2007 son similares a los de Pitt et al., 1996, que determinaron la resistencia a antibióticos entre 366 cepas de *B. cepacia* y reportaron que la mayoría de ellos son resistentes a ciprofloxacino, cefuroxima, imipenem, cloranfenicol, tetraciclina y sulfametoxacol.

## 2. Ejemplo 2. *Burkholderia* sp. como un herbicida

### 2.1 Estudio #1

Para confirmar la actividad encontrada en la criba inicial de herbicida, se realiza un estudio in vivo usando el extracto de resina de Amberlite 7 XAD derivado de un caldo de células enteras de 5 días de edad de la especie novedosa de *Burkholderia*. El extracto bruto seco se resuspendió en etanol al 4% y 0.2% de tensioactivo no iónico (glycosperse) a una concentración de 10 mg/mL y se diluyó adicionalmente hasta una concentración de 5.0 mg/mL. Las dos muestras se atomizaron en plantas de 4 semanas de edad de enredadera (*Convolvulus Arvensis*), y las plantas se mantienen bajo luces de crecimiento a 25°C durante 2 semanas, momento en el que se realizan las evaluaciones de fitotoxicidad. En el mismo estudio, se atomizaron plantas de amarantos de dos semanas de edad con concentraciones crecientes del extracto crudo derivado del cultivo bacteriano. Las concentraciones de ensayo son 1.25, 2.5, 5.0 y 10.0 mg/mL, y las plantas se incuban como se ha descrito anteriormente antes de evaluaciones de fitotoxicidad.

Los resultados presentados en las Figuras 2 (enredadera) y 3 (amaranto) muestran el efecto fitotóxico del extracto crudo de *Burkholderia* en diferentes concentraciones, y muestran un buen efecto herbicida sobre el amaranto incluso en concentraciones bajas de tratamiento. Ambos tratamientos de extracto (5 y 10 mg/mL) dan como resultado un retraso en el crecimiento de la enredadera.

### 2.2 Estudio #2

Una cepa novedosa de *Burkholderia* sp. A396 se cultiva en un medio mineral indefinido durante 5 días (25°C, 200 rpm). El caldo de células enteras se extrajo usando resina XAD7. El extracto bruto seco se resuspendió en etanol al 4% y tensioactivo no iónico al 0.2% a una concentración de 10 mg/mL, y se diluye adicionalmente en concentraciones de 5.0, 2.5 y 1.25 mg/mL. A continuación se ensayan las cuatro soluciones de ensayo en las siguientes especies de malezas de hoja ancha y hierba enumeradas en la Tabla 3:

Tabla 3. Especies de malezas de hoja ancha y hierba probadas

Nombre común	Nombre científico
Cenizo	<i>Chenopodium album</i>
Hierba carnicera	<i>Conyza canadensis</i>
Aceda de culebra	<i>Rumex crispus</i>
Digitaria	<i>Digitaria sanguinalis</i>
Espiguilla	<i>Poa annua</i>
Diente de león	<i>Taraxacum officinale</i>
Hierba mora	<i>Solanum nigrum</i>
Mostaza	<i>Brassica kaber</i>
Malva	<i>Malva neglecta</i>
Cepa de caballo	<i>Xanthium pensylvanicum</i>
Gramma	<i>Cynodon dactylon</i>
Planta de cola de zorro	<i>Setaria lutescens</i>
Cerraja	<i>Sonchus oleraceus</i>

Se una solución de 0.2% de glycosperse y Roundup a 6 fl oz por galón como control negativo y positivo, respectivamente.

- 5 Todas las especies de plantas se prueban en macetas de plástico de 4"x4" en tres repeticiones. Las plantas de control no tratadas se atomizan con la solución portadora (Etanol al 4%, glycosperse al 0.2%) y las plantas de control positivo con Roundup a una rata correspondiente a 6 fl. oz/acre. Las plantas tratadas se mantienen en un invernadero bajo condiciones de luz de 12h/oscuridad de 12h. Los datos de fitotoxicidad tomados 22 días después del tratamiento para las especies # 1-8 y 12 días para las especies # 9-12 se presentan en las Tablas 5 y 6, respectivamente. La escala de calificación para ambas tablas se muestra en la Tabla 4:

Tabla 4. Escala de clasificación

Escala de clasificación	% de Control
0	0
1	<10
2	25
3	50
4	75
5	100

15

Tabla 5. Datos de Fitotoxicidad de las Especies # 1-8

Tratamiento	Hierba carnífera	Cenizo	Diente de león	Aceda de culebra	Digitaria	Mostaza	Hierba mora	Espiguilla
UTC	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.7	0.0	0.0
1.25mg/mL	0.0	4.7	0.0	0.0	0.0	4.3	0.0	0.0
2.5 mg/mL	0.7	4.5	0.0	0.0	0.0	4.7	0.0	0.0
5.0mg/mL	4.3	5.0	0.0	0.0	0.0	5.0	0.0	0.0
10.0 mg/mL	4.7	5.0	0.0	0.0*	0.0	5.0	1.5	0.0
Roundup	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
	* Retraso en el crecimiento que resulto en plantas aproximadamente la mitad del tamaño de las plantas no tratadas							

20

Tabla 6. Datos de Fitotoxicidad de las Especies # 9-12

Tratamiento	Cepa de caballo	Planta de cola de zorro	Gramma	Cerraja	Malva
UTC	0.0	0.7	0.0	0.0	2.8
1.25mg/mL	0.5	0.3	0.3	0.0	2.0
2.5mg/mL	0.5	0.7	0.5	0.0	2.7
5.0 mg/mL	0.8	0.3	0.2	0.0	2.2
10.0 mg/mL	0.7	0.7	0.3	0.2	1.7
Roundup	4.7	4.8	4.7	5.0	5.0

25

A partir de los resultados obtenidos en estos estudios, los compuestos extraídos de los caldos de fermentación de las especies de Burkholderia aisladas tuvieron actividad herbicida frente a varias especies de malezas. De las doce especies ensayadas, los cenizos y la mostaza son los más susceptibles, seguido por la malva y la hierba carnífera. La concentración de extracto tan baja como 1.25 mg/mL es capaz de proporcionar un control casi completo de los cenizos y la mostaza, mientras que la concentración más alta se requiere para la malva y la hierba carnífera.

En un experimento separado, usando el mismo diseño que se ha descrito anteriormente, se ensaya la actividad sistémica. Un sobrenadante de extracto en bruto de 10 mg/ml de *Burkholderia* sp. A396 se pinta en las cebadoras hojas verdaderas de Ambrosia, Mostaza, Solanáceas, Digitaria, Trigo y Arrocillo. Las plántulas se evalúan 7 días después del tratamiento. Los síntomas observados incluyen: ardor, pandeo, se observa blanqueo de la actividad herbicida en la siguiente hoja sobre la hoja tratada en Ambrosia, Mostaza y Solanáceas. No se observa actividad sistémica en las hierbas ensayadas. En un segundo experimento. Se evalúan cinco fracciones del mismo extracto en bruto (10 mg/ml) que usan el mismo diseño experimental descrito anteriormente. Se tratan Plántulas de Mostaza, Trigo y Digitaria. Siete y 20 días después del tratamiento, se observan síntomas de actividad herbicida en Mostaza a partir de cuatro de las cinco fracciones (091113B4F6, 091113B4F7, 091113B4F8 y 091113B4F9) usando una columna C-18 (Phenomenex Septra C18-E, 50 µm, 65Å). Los síntomas se observan en la siguiente hoja por encima de la hoja tratada. No se observa actividad sistémica en las hierbas ensayadas.

### 3. Ejemplo 3. *Burkholderia* sp. como un insecticida

#### 3.1. Estudios de actividad de contacto

El siguiente ensayo se usa en la fase de criba inicial para determinar si los compuestos derivados de un cultivo de la nueva especie de *Burkholderia* tienen actividad de contacto contra una plaga de lepidópteros (larvas). Se usa además como una herramienta para el fraccionamiento guiado con bioensayo para determinar las fracciones y máximos activos derivados del extracto de caldo de cultivo completo. La prueba se lleva a cabo en vasos de plástico individuales de 1.25 oz que usa ya sea larvas de tercer estadio tardío de oruga de col (*Trichoplusia ni*) o larvas de tercer estadio temprano de la gardama (*Spodoptera exigua*). Una pieza de 1cm x 1cm de la dieta sólida de la gardama se coloca en el centro de cada taza junto con una larva. Se inyecta una alícuota de 1 µl de cada tratamiento (caldo de células enteras o extracto de un cultivo de *Burkholderia* A396 de 5 días de edad) en cada larva de tórax (lado dorsal) usando una jeringuilla de precisión Hamilton. Cada tratamiento se repite diez veces. El agua se usa como tratamiento de control negativo y el malatión como tratamiento de control positivo. Después de la inyección, cada taza se cubre con una película de cera con un agujero, y las tazas se incuban durante tres días a 26°C. Las evaluaciones de mortalidad se realizan diariamente, comenzando 24 horas después del tratamiento.

La Figuras 4 y 5 presentan los resultados de las pruebas de actividad de contacto. De acuerdo con los resultados, el caldo esterilizado por filtración de un cultivo de *Burkholderia* sp mató aproximadamente 40% de todos los insectos de ensayo en 3 días. El caldo diluido (50%) tiene menor actividad, que resulta en un control de aproximadamente 10% en ambos insectos ensayados.

#### 3.2. Actividad contra las larvas a través de la alimentación

La toxicidad directa a través de la alimentación se prueba usando las pruebas de superposición de dieta con el siguiente formato de ensayo de placa de 96 pozos usando placas de microtitulación con 200 µl de dieta sólida, artificial de la gardama en cada pozo. Se pipetea cien (100) microlitros de cada muestra de ensayo en la parte superior de la dieta (una muestra en cada pocillo) y la muestra se deja secar bajo aire fluido hasta que la superficie está seca. Cada muestra (filtrada-esterilizada a través de un filtro de 0.2 micras) se ensaya en seis repeticiones, y se usan agua y un producto comercial Bt (*B. thuringiensis*) como controles negativo y positivo, respectivamente. En cada pozo se ubica una larva del tercer estadio del insecto de ensayo (oruga de col - *Trichoplusia ni*; gardama - *Spodoptera exigua*; polilla de la col - *Plutella xylostella*), y la placa se cubre con tapa de plástico con agujeros de aire. Las placas con insectos se incuban a 26°C durante 6 días con evaluaciones de mortalidad diarias.

La Figura 5 representa datos de un estudio de superposición de dieta con larvas de tercer estadio temprano de la gardama (*Spodoptera exigua*) probadas en cuatro concentraciones diferentes de caldo: 1x (100%), 1/4x (25%), 1/8x (12.5%), 1/16x (6.125%). Los datos muestran que el caldo esterilizado por filtración no diluido es capaz de dar un control del 100% al final del período de incubación de 7 días. Se obtiene un control similar con una dilución de 4 veces del caldo, y al final del estudio, tanto los caldos no diluidos como los caldos diluidos 4 veces son comparables con el Bt usado como control positivo. Sin embargo, el efecto de Bt es significativamente más rápido que el de los caldos de *Burkholderia*. La eficacia frente a las larvas del gusano cogollero depende de la concentración de caldo y las dos concentraciones de caldo más bajas (12.5% y 6.125%), proporcionaron menos control que las dos más altas. Sin embargo, el rendimiento de la dilución del 12.5% no es mucho menor que la dilución del 25%. La dilución de 16 veces de caldo claramente no es lo suficientemente eficiente, y únicamente proporcionó el control parcial (33%) de larvas del gusano cogollero durante este estudio de 7 días. Las ratas de mortalidad correspondientes a la misma dilución de caldo utilizada en las orugas de col y en las larvas de polilla de la col son un poco mayores, con un 6.125% de caldo matando al 80% y al 50% de larvas, respectivamente.

#### 3.3. Actividad in vitro contra los insectos succionadores

Se ubicaron cinco adultos del chinche marrón marmoleado (*Euschistus* sp.) en cada recipiente de plástico de 16 oz alineado con un pedazo de toalla de papel. Un tubo de microcentrifuga que contiene 2 mL de cada muestra de ensayo (filtro de caldo entero esterilizado) se tapa con una bola de algodón y se deposita en el fondo del recipiente

de plástico. Una semilla de girasol se ubica al lado del tubo como cebo. Se usan agua y un producto comercial con una mezcla de piretrina y PBO a una rata recomendada como controles negativo y positivo, respectivamente. Cada recipiente se cierra con una tapa, y se incuban a 25°C durante 7 días con controles diarios de mortalidad.

- 5 Los resultados se presentan a continuación en la Tabla 7 y estos muestran aproximadamente 80% de control del insecto succionador (chinche marrón marmoleado) al día 7 en este sistema in vitro con caldo diluido al 50%. En este estudio, el caldo de fermentación diluido de Burkholderia A396 es más efectivo en el control de chinches marrones marmoleados que el producto comercial usado como un control positivo. Curiosamente, el caldo no diluido resultó en menor control de insectos, lo que podría ser una indicación de las propiedades del antialimentador (inhibición de la alimentación) de los metabolitos secundarios activos producidos por esta nueva especie de Burkholderia.

Tabla 7. Efecto de A396 sobre Chinche Marrón Marmoleado

Tratamiento	% de control (Día 3)	% de control (Día 5)	% de control (Día 7)
Caldo no diluido de A396 (1x)	0	0	40
Caldo diluido 50% de A396 (0.5x)	20	20	80
Piretrin+PBO (control positivo)	0	0	40
Agua (control negativo)	0	0	0

- 15 4. Ejemplo 4. Ensayo de insectos de succión in vivo
- La eficacia in vivo del caldo de células enteras filtrado se ensaya en un ensayo de plantas con plantas de mostaza y áfido de melocotón verde (*Myzus persicae*) como insecto de ensayo. Aproximadamente las plantas de mostaza de hoja ancha de Florida (*Brassica* sp.) de un mes de edad se atomizan con dos concentraciones diferentes (1x y 0.5x) del caldo de células enteras esterilizado con filtro de Burkholderia sp. que usa un aerógrafo Paasche. Se usan agua y un producto comercial de avermectina (Avid) como controles negativo y positivo, respectivamente. Se deja que las plantas se sequen en la bancada, después de lo cual se colocan en un recipiente de plástico de 6 recipientes con una tapa con orificios de aire. Se ubican diez áfidos en diversas etapas de desarrollo en cada planta de ensayo, y las plantas se incuban bajo lámparas de crecimiento durante 7 días a 25°C. Las evaluaciones diarias para el número de áfidos en cada planta (resumidas en la Tabla 8 a continuación) se hacen y se registran en un cuaderno.

Tabla 8. Eficacia in vivo de A396 en Áfidos Verdes de Melocotón

Tratamiento	# de áfidos vivos Día 0	# de áfidos vivos Día 2	# de áfidos vivos Día 4	# de áfidos vivos Día 7
Caldo no diluido de A396 (1x)	10	36	88	145
Caldo diluido 50% de A396 (0.5x)		47	138	217
Avermectin (control positivo)		0	0	0
Agua (control negativo)	10	140	364	393

- 30 De acuerdo con los resultados, ambas concentraciones del caldo esterilizado por filtración derivado de un cultivo de una nueva especie de Burkholderia son capaces de controlar el crecimiento de la población de un insecto succionador, *M. persicae*.

35 5. Ejemplo 5. Actividad Nematocida

5.1 Estudio #1

- 40 Para evaluar el efecto del caldo de cultivo de Burkholderia sp A396 esterilizado con filtro sobre la motilidad (y posterior recuperación) de los nemátodos agalladores (*Meloidogyne incognita* VW6) juveniles (J2), se realiza el siguiente ensayo en placas de cultivo celular de plástico de 24 pozos:

- 45 Se añade una alícuota de 300- $\mu$ l de cada solución de ensayo (ya sea 1x o 0.5x de caldo esterilizado por filtración) a los pozos apropiados después de lo cual, se añaden quince nematodos dispensados en 10  $\mu$ l de agua DI en cada pozo, se cerró la placa con una tapa, y se incubaron a 25°C durante 24 horas. Se usó agua y Avid en una dilución de 20,000x como controles negativo y positivo, respectivamente. El efecto de cada compuesto sobre la movilidad de los nematodos se comprueba después de 24 horas mediante sondeo de cada nematodo con una aguja, y la proporción

de nematodos inmóviles en cada tratamiento se registró en un cuaderno que usa una escala de %. Para evaluar la recuperación de la movilidad en cada tratamiento, se extrae un volumen de 200 µl de cada pozo y la solución restante en cada pozo se diluye añadiendo 2 mL de agua DI. Las placas se incuban de nuevo durante 24 horas como se ha descrito anteriormente, después de lo cual se realiza la segunda evaluación de movilidad.

Los resultados presentados en la Figura 6 muestran que el caldo esterilizado por filtración en ambas concentraciones de ensayo puede inmovilizar a los nematodos agalladores juveniles de vida libre. Este efecto dura al menos 24 horas, lo que sugiere que el caldo Burkholderia A396 puede usarse para prevenir que las plantas causen infecciones por nematodos.

## 5.2 Estudio #2

### Materiales y métodos

Ensayo Mini de Empapado: El caldo Burkholderia A396 de células enteras se ensaya en un ensayo en invernadero realizado en recipientes de 45 ml. Semillas de pepino cv. Toshka se siembran directamente en las macetas llenadas con un suelo franco arenoso. Diez días más tarde, las macetas se trataron cada una con 5 ml de una suspensión. Las cantidades específicas usadas se muestran en la Tabla 9:

Tabla 9

Compuestos	Cepa Burkholderia A396 Fostiazato (Estándar, EC 150) (control positivo)
Especies de prueba	Meloidogyne sp. aplicado a 3000 huevos por minimaceta de empapado (en 2 ml)
Planta de prueba	Cucumis sativus (pepino cv. Toschka)
Formulación de prueba	100% de formulación líquida
Concentraciones de prueba	100, 50, 25, 12.5, 6, 3, 1.5 ml/L
Aplicación de prueba	Aplicación de empapado

Como se indicó en la Tabla 9, las macetas se inoculan con 3000 huevos de *M. incognita*. Se prepararon cuatro repeticiones para cada tratamiento y rata. El ensayo se cosechó catorce días después de la aplicación del ensayo y la inoculación. Las vesículas de las raíces se evaluaron de acuerdo con el índice de vesícula de Zeck (Zeck, 1971). La fitotoxicidad se midió como una reducción de las vesículas de las raíces en comparación con el control. Los resultados se muestran en La Figuras 9 y 10.

En el Ensayo Mini de Empapamiento no. 1 (véase la Figura 9), la actividad del tratamiento fue muy alta y se observó una reducción de casi 100% cuando se aplicó en una concentración de 100 ml/L de Burkholderia A396. Se realizó el fostiazato como de costumbre (100% de control a 20 ppm).

En el Ensayo Mini de Empapamiento no. 2 (véase La Figura 10), se consiguió una reducción del 100% de las vesículas de las raíces en la concentración más alta de 100 ml/L hasta aproximadamente 50% a 1.5 ml/L. Se realizó el fostiazato como de costumbre (100% de control a 20 ppm).

## 5.3 Estudio #3

Para demostrar la actividad nematicida de Burkholderia A396, se realiza un estudio de invernadero sobre el pepino (*Cucumis sativus*) que usa un caldo de células enteras de Burkholderia A396 como producto de ensayo para controlar los nematodos agalladores (*Meloidogyne incognita*). Una planta de pepino por maceta se siembra en el suelo y se cultiva en un invernadero bajo luz artificial a 28°C. Cada maceta con una planta se trata con una alícuota (aproximadamente 80 mL) de ya sea el producto de ensayo no diluido o un producto de ensayo diluido al 5% con agua. Cada tratamiento de Burkholderia A396, así como un tratamiento de control positivo con Temik (a una rata de etiqueta) y un control negativo sin adiciones, consistió en cinco repeticiones. Las plantas se cultivan en un invernadero durante 60 días, después de lo cual cada planta fue cosechada y evaluada en los pesos frescos de los brotes y de la raíz. Se registró el número de huevos de nematodos en cada maceta y se calculó un parámetro que indicaba el número de huevos por gramo de masa de raíz. Se realizó un análisis estadístico (ANOVA) y se calcularon las diferencias estadísticas entre las medias de tratamiento a  $p < 0.1$ . Los datos presentados en la Tabla 10 a continuación muestran que, aunque no es estadísticamente diferente del control sin tratar, las macetas tratadas con caldo de células enteras A396 contenían menos huevos de nematodos que las macetas de control no tratadas. El efecto calculado como el número de huevos por masa de raíz es más claro cuando el caldo no diluido se usa como un tratamiento.

Tabla 10: El efecto del caldo de células enteras de A396 en el brote de pepino y peso de raíz, número total de *M. incognita* por maceta y el número de huevos por gramo de masa de raíz.

	peso de brote fresco	peso de brote fresco	# de huevos	# de huevos/g de raíz
no tratado	15.22 b	11.76 bc	67693 a	5252.0 ab
A396 5% v/v	11.89 b	6.914 c	56084 a	8419.4 a
A 396 no diluido	15.66 b	11.09 bc	40463 a	3929.2 ab
Temik 15 G 5 lb/a	29.54 a	29.74 a	68907 a	2604.4 b
LSD at p < 0.1	5.34	6.9879	36509.2	3317.1

## 6. Ejemplo 6. Aislamiento de Templazol A y B

### Métodos y materiales

5

Se usa el siguiente procedimiento para la purificación de Templazol A y B extraídos del cultivo celular de *Burkholderia* sp (véase la Figura 7):

10 El caldo de cultivo derivado de la fermentación *Burkholderia* (A396) de 10-L en medio de cultivo de soja Hy se extrajo con resina Amberlite XAD-7 (Asolkar et al., 2006) agitando la suspensión celular con resina a 225 rpm durante dos horas a temperatura ambiente. La resina y la masa celular se recogieron por filtración a través de una estopilla y se lavaron con agua DI para eliminar las sales. La resina, la masa celular y la estopilla se empapan después durante 2 h en acetona, después de lo cual la acetona se filtra y se seca bajo vacío usando un evaporador rotatorio para dar el extracto bruto. El extracto en bruto se fracciona a continuación usando cromatografía líquida en vacío C18 en fase inversa (H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>OH, gradiente de 90:20 a 0:100%) para dar 10 fracciones. Estas fracciones se concentran entonces a sequedad que usa un evaporador rotatorio y los residuos secos resultantes se criban para detectar la actividad biológica usando un ensayo de siembra de lechuga en placa de 96 pozos. Las fracciones activas se someten a continuación a HPLC de fase inversa (Spectra System P4000 (Thermo Scientific) para dar compuestos puros, que se someten a continuación a cribado en los bioensayos mencionados anteriormente para localizar/identificar los compuestos activos. Para confirmar la identidad del compuesto, se registran datos espectroscópicos adicionales tal como LC/MS y RMN.

25 La fracción activa 4 se purifica adicionalmente usando la columna de HPLC C-18 (Phenomenex, Luna 10u C18 (2) 100 A, 250 x 30), sistema de solvente de agua: gradiente de acetonitrilo (0-10 min, CH<sub>3</sub>CN acuoso al 80%, 10- 25 min; CH<sub>3</sub>CN acuoso del 80 - 65%, 25 - 50 min; CH<sub>3</sub>CN acuoso del 65 - 50%, 50 - 60 min; CH<sub>3</sub>CN acuoso al 50 - 70%, 60 - 80 min; 0-20% de CH<sub>3</sub>CN acuoso) a un rata de flujo de 8 mL/min y detección UV de 210 nm, para dar el templazol B, tiempo de retención 46.65 min. La otra fracción activa 6 se purifica también mediante columna HPLC C-18 (Phenomenex, Luna 10u C18 (2) 100 A, 250 x 30), sistema de solvente de agua: gradiente de acetonitrilo (0-10 minutos, CH<sub>3</sub>CN acuoso al 80%, 10-25 min; CH<sub>3</sub>CN acuoso del 80-60%, 25-50 min; CH<sub>3</sub>CN acuoso 60-40%, 50-60 min; CH<sub>3</sub>CN al 40%, 60-80 min; CH<sub>3</sub>CN acuoso al 40-0%, 80-85 min; CH<sub>3</sub>CN acuoso al 0-20%) a una rata de flujo de 8 mL/min y detección UV de 210 nm, para dar templazol A, tiempo de retención 70.82 min.

35 El análisis de espectroscopía de masas de compuestos puros se realiza en un instrumento de electroatomización (IES) de Thermo Finnigan LCQ Deca XP Plu que usa modos de ionización positiva y negativa en un modo de exploración completa (m/z 100-1500 Da) en un Espectrómetro de Masa LCQ DECA XPplus (Thermo Electron Corp., San José, CA). Instrumento de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) Thermo equipado con Finnigan Surveyor PDA más detector, muestreador automático adicional, bomba MS y una columna Luna C18 de 5 mm (Phenomenex) de 4.6 mm x 100 mm. El sistema solvente consiste en agua (solvente A) y acetonitrilo (solvente B). La fase móvil comienza con un 10% del solvente B y se aumenta linealmente hasta 100% de solvente B durante 20 min y luego se mantiene durante 4 min y finalmente se devuelve al 10% de solvente B durante 3 min y se mantiene durante 3 min. La rata de flujo es 0.5 ml/min. El volumen de inyección fue de 10 µL y las muestras se mantuvieron a temperatura ambiente en un muestreador automático. Los compuestos se analizaron mediante LC-MS que usa la LC y la cromatografía de fase inversa. El análisis de espectroscopia de masas de los presentes compuestos se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones: la rata de flujo del gas nitrógeno se fijó a 30 y 15 arb para la rata de flujo de gas de la vaina y auxiliar/barrido, respectivamente. La ionización por electroatomización se realizó con un voltaje de atomización ajustada a 5000 V y un voltaje capilar a 35.0 V. La temperatura capilar se fijó a 400°C. Los datos se analizaron en el software Xcalibur. El compuesto activo templazol A tiene una masa molecular de 298 y mostró ión m/z a 297.34 en modo de ionización negativa. El cromatograma de LC-MS para el templazol B sugiere una masa molecular de 258 y exhibió ión m/z a 257.74 en modo de ionización negativo.

50 Los espectros de RMN <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C y 2D se midieron en un espectrómetro de campo Bruker de 500 MHz y 600 MHz de gradiente. La referencia se establece en el tetrametilsilano estándar interno (TMS, 0.00 ppm).

Para la elucidación de la estructura del templazol A, el compuesto purificado con un peso molecular 298 se analiza adicionalmente usando un instrumento RMN de 500 MHz y tiene valores de RMN  $\delta$  de  $^1\text{H}$  en 8.44, 8.74, 8.19, 7.47, 7.31, 3.98, 2.82, 2.33, 1.08 y tiene valores de RMN  $\delta$  de  $^{13}\text{C}$  de 163.7, 161.2, 154.8, 136.1, 129.4, 125.4, 123.5, 123.3, 121.8, 121.5, 111.8, 104.7, 52.2, 37.3, 28.1, 22.7, 22.7. Templazol A tiene bandas de absorción UV a 226, 275, 327 nm, lo que sugiere la presencia de anillos de indol y oxazol. La fórmula molecular  $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_3$  se determinó mediante la interpretación de los datos de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , y HRESI MS  $m/z$  299.1396 (M + H) + (calculado para  $\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{N}_2\text{O}_3$ , 299.1397), lo que implica un alto grado de insaturación mostrado por 10 equivalentes de enlace doble. El espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  reveló señales para todos los 17 carbonos, que incluyen dos metilo, un metoxi, un carbono metileno, un metino alifático, un éster carbonilo y once carbonos aromáticos. La presencia de indol 3'-sustituido se reveló a partir de datos espectrales  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY y HMBC. El  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COZY y el HMBC también indicaron la presencia de un grupo metil éster del ácido carboxílico y una cadena lateral  $-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ . A partir del análisis detallado de los datos de  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COZY,  $^{13}\text{C}$  y HMBC se dedujo que el compuesto contenía un núcleo de oxazol. A partir del análisis 2D se encontró que la cadena lateral de isobutilo estaba unida en posición C-2, un metil éster del ácido carboxílico en posición C-4 y la unidad indol en posición C-5 para dar el templazol A.

El segundo compuesto herbicidamente activo, el templazol B, con un peso molecular de 258, se analiza adicionalmente usando un instrumento de RMN de 500 MHz y tiene valores de RMN  $\delta$  de  $^1\text{H}$  de 7.08, 7.06, 6.75, 3.75, 2.56, 2.15, 0.93, 0.93 y valores de RMN  $\delta$  de  $^{13}\text{C}$  de 158.2, 156.3, 155.5, 132.6, 129.5, 129.5, 127.3, 121.8, 115.2, 115.2, 41.2, 35.3, 26.7, 21.5, 21.5. La fórmula molecular se asigna como  $\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_2$ , que se determina mediante la interpretación de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  y datos de masa. El espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  reveló señales para todos los 15 carbonos, que incluyen dos metilo, dos carbonos de metileno, un metino alifático, un carbonilo de amida y nueve carbonos aromáticos. La naturaleza general de la estructura se dedujo a partir de espectros RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  que mostraban un anillo aromático para-sustituido [ $\delta$  7.08 (2H, d, J = 8.8 Hz), 6.75 (2H, d, J = 8.8 Hz), y 132.7, 129.5, 115.2, 127.3, 115.2, 129.5]. El espectro  $^1\text{H}$  RMN de esta estructura junto con los espectros de  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY y HSQC, mostró señales características para un fragmento de isobutilo [ $\delta$  0.93 (6H, d, J = 6.9 Hz), 2.15 (1H, sept., J = 6.9 Hz), 2.57 (2H, d, J = 6.9 Hz)]. Además, se encontró también un protón olefínico/aromático a ( $\delta$  7.06, s) y un grupo carbonilo de carbono ( $\delta$  158.9) en los espectros de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ . Al inspeccionar el espectro de HMBC, la señal H-1' en el fragmento de isobutilo se correlacionó con el carbono olefínico (C-2,  $\delta$  156.3) y el protón olefínico H-4 correlacionado con (C-5,  $\delta$  155.5; C-2, 156.3 & C-1", 41.2). La señal de metileno en  $\delta$  3.75 se correlacionó con C-5, C-4 así como con el C-2" del fragmento aromático para-sustituido. Todas estas correlaciones observadas sugirieron la conectividad entre los fragmento de isobutilo y bencilo para-sustituidos para el esqueleto de la estructura como se muestra. Además, el grupo carboxamida se asigna en la posición para del fragmento de bencilo en base a la correlación HMBC del protón aromático en posición H-4" y H-6". Así, en base a los datos anteriores, la estructura se designó como templazol B.

#### 7. Ejemplo 7. Aislamiento de FR90128

El caldo de células enteras de la fermentación de *Burkholderia* sp. en un medio de crecimiento indefinido se extrae con resina Amberlite XAD-7 (Asolkar et al., 2006) agitando la suspensión celular con resina a 225 rpm durante dos horas a temperatura ambiente. La resina y la masa celular se recogen por filtración a través de una estopilla y se lavan con agua DI para eliminar las sales. La resina, la masa celular y la estopilla se empapan después durante 2 h en acetona, después de lo cual la acetona se filtra y se seca bajo vacío que usa un evaporador rotatorio para dar el extracto bruto. El extracto en bruto se fracciona a continuación utilizando cromatografía líquida en vacío C18 en fase inversa ( $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{OH}$ , gradiente de 90:20 a 0:100%) para dar 10 fracciones. Estas fracciones se concentran entonces hasta sequedad usando un evaporador rotatorio y los residuos secos resultantes se criban para detectar la actividad biológica usando tanto el bioensayo de insectos como el bioensayo herbicida. Las fracciones activas se someten a continuación a HPLC de fase inversa/normal (Spectra System P4000, Thermo Scientific) para dar compuestos puros, los cuales se someten después a cribado en bioensayos herbicidas, insecticidas y nematocidas descritos a continuación para localizar/identificar los compuestos activos. Para confirmar la identidad del compuesto, se registran datos espectroscópicos adicionales tales como LC/MS y RMN.

Se realiza el análisis de espectroscopía de masas de los máximos activos en un instrumento de electroatomización (ICI) de Thermo Finnigan LCQ Deca XP Plus, que usa ambos modos de ionización positiva y negativa en un modo de exploración completa ( $m/z$  100-1500 Da) en un espectrómetro de masa LCQ DECA XP<sup>plus</sup> (Thermo Electron Corp., San Jose, CA). El instrumento de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) equipado con detector Finnigan Surveyor PDA adicional, inyector automuestreador adicional, bomba MS y una columna Luna C18 de 5  $\mu\text{m}$  (Phenomenex) de 4,6 mm x 100 mm. El sistema solvente consiste en agua (solvente A) y acetonitrilo (solvente B). La fase móvil comienza con un 10% de solvente B y se aumenta linealmente hasta un 100% de solvente B durante 20 min y luego se mantiene durante 4 min, y finalmente se devuelve a 10% de solvente B durante 3 min y se mantiene durante 3 min. La rata de flujo es de 0.5 mL/min. El volumen de inyección es de 10  $\mu\text{l}$  y las muestras se mantienen a temperatura ambiente en un muestreador automático. Los compuestos se analizan mediante LC-MS que usa la LC y la cromatografía de fase inversa. El análisis de espectroscopía de masas de los presentes compuestos se realiza bajo las siguientes condiciones: La rata de flujo del gas nitrógeno se fija a 30 y 15 arb para el flujo de la vaina y auxiliar/barrido, respectivamente. La ionización por electroatomización se realiza con un voltaje de atomización ajustada a 5000 V y un voltaje capilar a 35.0 V. La temperatura capilar se ajusta a 400°C. Los datos se



analizan en el software Xcalibur. En base al análisis de LC-MS, el compuesto insecticida activo de la fracción 5 tiene una masa molecular de 540 en modo de ionización negativa.

5 Para la elucidación de la estructura, el compuesto insecticida purificado de la fracción 5 con peso molecular 540 se analiza adicionalmente usando un instrumento RMN de 500 MHz y tiene valores de <sup>1</sup>H RMN a 6.22, 5.81, 5.69, 5.66, 5.65, 4.64, 4.31, 3.93, 3.22, 3.21, 3.15, 3.10, 2.69, 2.62, 2.26, 2.23, 1.74, 1.15, 1.12, 1.05, 1.02; y tiene valores de RMN de <sup>13</sup>C de 172.99, 172.93, 169.57, 169.23, 167.59, 130.74, 130.12, 129.93, 128.32, 73.49, 62.95, 59.42, 57.73, 38.39, 38.00, 35.49, 30.90, 30.36, 29.26, 18.59, 18.38, 18.09, 17.93, 12.51. Los datos de RMN indican que el compuesto contiene grupos amino, éster, ácido carboxílico, metil alifático, etilo, metileno, oximetileno, metino, oximetilo y azufre. El análisis RMN 1D y 2D detallado confirma la estructura del compuesto como FR90128 como un compuesto conocido.

#### 8. Ejemplo 8. Actividad herbicida de FR90128

15 La actividad herbicida del compuesto activo FR90128 (MW 540) se ensaya en un ensayo de laboratorio que usa plántulas de arrozillo (*Echinochloa crus-galli*) de una semana de edad en una plataforma de placa de 96 pozos. Se colocó una plántula de hierba en cada uno de los pozos que contenían 99 microlitros de agua DI. Se añadió una alícuota de un microlitro del compuesto puro en etanol (10 mg/mL) en cada pozo, y la placa se sella con una tapa. Se usa como control negativo un microlitro de etanol en 99 microlitros de agua. Los tratamientos se realizaron en 20 ocho repeticiones, y la placa sellada se incubó en un invernadero bajo luz artificial (ciclo de 12 horas luz/oscuridad). Después de cinco días, se leen los resultados. Las plántulas de hierba en los ocho pozos que recibieron el compuesto activo están muertas sin dejar tejido verde, mientras que las plántulas en los pozos de control negativo estaban creciendo activamente.

#### 25 9. Ejemplo 9. Actividad insecticida de FR90128

La actividad insecticida del compuesto activo FR90128 (MW 540) se ensaya en un ensayo de laboratorio que usa un sistema de bioensayo de contacto. El compuesto se disuelve en etanol al 100% en concentraciones de 0.001, 0.005, 0.01, 0.025, 0.05, 0.1, 0.25, y 0.5 µg/µL. Se ubicaron las larvas de gardama, *Spodoptera exigua*, del 3<sup>er</sup> estadio temprano individuales, en vasos de plástico de 1.25 onzas con un pieza de dieta artificial de 1 cm<sup>2</sup> (Bio-Serv). Una micropipeta de Hamilton se usa para aplicar 1 µL de compuesto al tórax de cada larva. Las copas se cubren con película de parafina estirada y un agujero individual se corta en la película de parafina para la aireación. Se tratan diez larvas por concentración. El ensayo se incuba a 25°C, 12 horas de luz/12 horas de oscuridad. Las larvas se registran a las 48 y 72 horas después de la aplicación. El análisis de Probit se realiza para evaluar el valor de LC<sub>50</sub> que se encuentra para el compuesto (MW 540) como 0.213.

#### 10. Ejemplo 10. Aislamiento de la Templamida A, B, FR901465 y FR90128

##### Métodos y materiales

40 Se usa el siguiente procedimiento para la purificación de compuestos extraídos del cultivo celular de *Burkholderia* sp (véase la Figura 7):

45 El caldo de cultivo derivado de la fermentación de 10 L de *Burkholderia* (A396) en medio de cultivo de soja Hy se extrajo con resina Amberlite XAD-7 (Asolkar et al., 2006) agitando la suspensión celular con resina a 225 rpm durante dos horas a temperatura ambiente. La resina y la masa celular se recogen por filtración a través de una estopilla y se lavan con agua DI para eliminar las sales. La resina, la masa celular y la estopilla se empapan después durante 2 h en acetona, después de lo cual la acetona se filtra y se seca bajo vacío que usa un evaporador rotatorio para dar el extracto en bruto. El extracto en bruto se fracciona a continuación usando cromatografía líquida en vacío 50 C18 en fase inversa (H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>OH, gradiente de 90:20 a 0:100%) para dar 10 fracciones. Estas fracciones se concentran hasta secarse usando un evaporador rotatorio y los residuos secos resultantes se criban para detectar la actividad biológica que usa ensayos de siembra de lechuga en placa de 96 pozos (herbicida) y ensayo de gardama (insecticida) del 3<sup>er</sup> estadio temprano. Las fracciones activas se someten entonces repetidamente a separación por HPLC en fase inversa (Spectra System P4000 (Thermo Scientific) para dar compuestos puros, que se someten 55 después a cribado en los bioensayos antes mencionados para localizar/identificar los compuestos activos. Para confirmar la identidad del compuesto, se registran datos espectroscópicos adicionales tales como LC/MS, HRMS y RMN.

60 La fracción activa 5 se purifica adicionalmente usando la columna de HPLC C-18 (Phenomenex, Luna 10u C18 (2) 100 A, 250 x 30), sistema de solvente de agua: gradiente de acetonitrilo (0-10 min; CH<sub>3</sub>CN acuoso al 80%, 10- 25 min; CH<sub>3</sub>CN acuoso del 80 - 65%, 25-50 min; CH<sub>3</sub>CN acuoso del 65 - 50%, 50-60 min; CH<sub>3</sub>CN acuoso al 50-70%, 60 - 80 min; CH<sub>3</sub>CN acuoso al 70-0%, 80-85 min; CH<sub>3</sub>CN acuoso al 0-20 %) a un rata de flujo de 8 mL/min y detección UV de 210 nm, para dar templamida A, tiempo de retención 55.64 min. La otra fracción activa 6 se purifica también mediante columna HPLC C-18 (Phenomenex, Luna 10u C18 (2) 100 A, 250 x 30), sistema de solvente de 65 agua: gradiente de acetonitrilo (0-10 minutos; CH<sub>3</sub>CN acuoso al 70-60 %, 10-20 min; CH<sub>3</sub>CN acuoso al 60-40 %, 20-

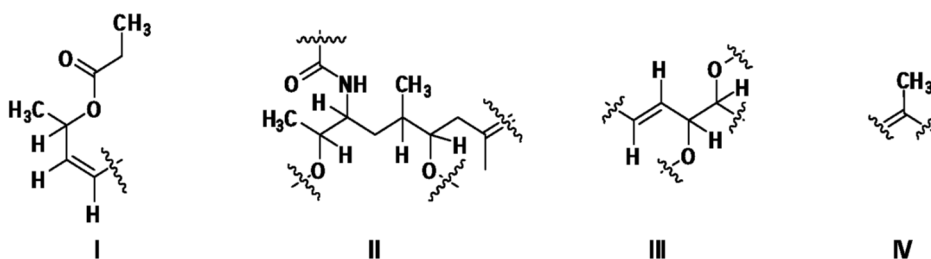
50 min; CH<sub>3</sub>CN acuoso al 40-15%, 50-75 min; CH<sub>3</sub>CN al 15-0 %, 75-85 min; CH<sub>3</sub>CN acuoso al 0-70 %) a una rata de flujo de 8 mL/min y detección UV de 210 nm, para dar templamida B, tiempo de retención 38.55 min.

El análisis de espectroscopia de masas de compuestos puros se realiza en un instrumento de electroatomización (ESI) de Thermo Finnigan LCQ Deca XP Plus que usa ambos modos de ionización positiva y negativa en un modo de exploración completa (m/z 100-1500 Da) en un Espectrómetro de Masas LCQ DECA XP<sup>plus</sup> (Thermo Electron Corp., San Jose, CA). Se usa un instrumento de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) Thermo equipado con un detector Finnigan Surveyor PDA plus, un automuestreador adicional, una bomba MS y una columna Luna C18 de 5 μm (Phenomenex) de 4,6 mm x 100 mm. El sistema solvente consiste en agua (solvente A) y acetonitrilo (solvente B). La fase móvil comienza con un 10% de solvente B y se incrementa linealmente hasta un 100% de solvente B durante 20 min y después se mantiene durante 4 min, y finalmente vuelve al 10% del solvente B durante 3 min y se mantiene durante 3 min. La rata de flujo es de 0.5 ml/min. El volumen de inyección es de 10 μL y las muestras se mantienen a temperatura ambiente en un muestreador automático. Los compuestos se analizan mediante LC-MS que usa la LC y la cromatografía de fase inversa. El análisis de espectroscopia de masas de los presentes compuestos se realiza bajo las siguientes condiciones: La rata de flujo del gas nitrógeno se fija en 30 y 15 arb para el flujo de la vaina y del flujo auxiliar/barrido, respectivamente. La ionización por electroatomización se realiza con un voltaje de atomización ajustado a 5000 V y un voltaje capilar a 45.0 V. La temperatura capilar se establece a 300°C. Los datos se analizan en el software Xcalibur. El compuesto activo templamida A tiene una masa molecular de 555 en base al máximo m/z a 556.41 [M + H]<sup>+</sup> y 578,34 [M + Na]<sup>+</sup> en modo de ionización positiva. El análisis de LC-MS en la ionización en modo positivo para la templamida B sugiere una masa molecular de 537 iones en base a m/z a 538.47 [M + H]<sup>+</sup> y 560,65 [M + Na]<sup>+</sup>. El peso molecular para los compuestos FR901465 y FR90128 se asignan como 523 y 540 respectivamente sobre la base del análisis de LCMS.

Los espectros RMN <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C y 2D se miden en un espectrómetro de campo de gradiente Bruker de 600 MHz. La referencia se establece en el estándar interno tetrametilsilano (TMS, 0,00 ppm).

Para la elucidación de la estructura de la templamida A, el compuesto purificado con peso molecular 555 se analiza adicionalmente usando un instrumento de RMN de 600 MHz y tiene valores de RMN δ de <sup>1</sup>H a 6.40, 6.39, 6.00, 5.97, 5.67, 5.54, 4.33, 3.77, 3.73, 3.70, 3.59, 3.47, 3.41, 2.44, 2.35, 2.26, 1.97, 1.81, 1.76, 1.42, 1.37, 1.16, 1.12, 1.04 y tiene valores de RMN δ de <sup>13</sup>C de 173.92, 166.06, 145.06, 138.76, 135.71, 129.99, 126.20, 123.35, 99.75, 82.20, 78.22, 76.69, 71.23, 70.79, 70.48, 69.84, 60.98, 48.84, 36.89, 33.09, 30.63, 28.55, 25.88, 20.37, 18.11, 14.90, 12.81, 9.41. El espectro de RMN de <sup>13</sup>C exhibe 28 señales de carbono discretas que se atribuyen a seis metilos, cuatro carbonos de metileno, y trece metinos que incluyen cinco sp<sup>2</sup>, cuatro carbonos cuaternarios. La fórmula molecular, C<sub>28</sub>H<sub>45</sub>NO<sub>10</sub>, se determina mediante la interpretación de los datos de RMN de <sup>13</sup>C, <sup>1</sup>H y HRESI MS. El análisis detallado de los datos espectrales <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY, HMBC y HMQC revela las siguientes subestructuras (I-IV) y dos grupos metileno y metilo individual aislados. Estas subestructuras se conectan posteriormente usando las correlaciones clave de HMBC para dar la estructura de cepillo para el compuesto, que todavía no se ha reportado en la literatura y designado como templamida A. Esta molécula de policétido contiene dos anillos de tetrahidropiranos y una amida conjugada.

40



Las subestructuras I-IV se asignan mediante el análisis de datos espectroscópicos RMN 1D y 2D.

El análisis (+) de ESIMS para el segundo compuesto herbicida, muestra iones de m/z a 538.47 [M + H]<sup>+</sup> y 560.65 [M + Na]<sup>+</sup> que corresponden al peso molecular de 537. La fórmula molecular de C<sub>28</sub>H<sub>43</sub>NO<sub>9</sub> se determina por interpretación del análisis de datos de ESIMS y RMN. El RMN de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C de este compuesto es similar al de la templamida A excepto que aparece un nuevo -CH<sub>2</sub>- aislado en lugar del grupo metileno no acoplado en la templamida A. La pequeña constante de acoplamiento germinal de 4.3 Hz es característica de la presencia de un grupo de metileno epóxido. La presencia de este epóxido se confirma adicionalmente a partir del cambio de RMN de <sup>13</sup>C de 60.98 en templamida A a 41.07 en el compuesto con MW 537. La diferencia de fórmulas moleculares entre estos dos compuestos se explica razonablemente mediante eliminación de la molécula de agua seguida de formación de epóxido. Por lo tanto, sobre la base del análisis fundamentado en RMN y MS, la estructura para el nuevo compuesto fue asignada y fue designada como templamida B.

55

Para la elucidación de la estructura, el compuesto purificado de la fracción 5 con peso molecular 523 se analiza adicionalmente usando un instrumento RMN de 600 MHz y tiene valores de RMN δ de <sup>1</sup>H a 6.41, 6.40, 6.01, 5.98, 5.68, 5.56, 4.33, 3.77, 3.75, 3.72, 3.65, 3.59, 3.55, 3.50, 2.44, 2.26, 2.04, 1.96, 1.81, 1.75, 1.37, 1.17, 1.04; y tiene

valores de RMN  $\delta$  de  $^{13}\text{C}$  de 172.22, 167.55, 144.98, 138.94, 135.84, 130.14, 125.85, 123.37, 99.54, 82.19, 78.28, 76.69, 71.31, 70.13, 69.68, 48.83, 42.52, 36.89, 33.11, 30.63, 25.99, 21.20, 20.38, 18.14, 14.93, 12.84. El análisis detallado de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  del compuesto sugirió que este compuesto era bastante similar al compuesto de templamida B; la única diferencia estaba en la cadena lateral de éster; un fragmento de acetato estaba presente en lugar de un fragmento de propionato en la cadena lateral. El análisis RMN 1D y 2D detallado confirma la estructura para el compuesto como FR901465 como un compuesto conocido.

En base al análisis de LC-MS, el otro compuesto de la fracción 5 tiene una masa molecular de 540 en modo de ionización negativa. Para la elucidación de la estructura, el compuesto purificado de la fracción 5 con peso molecular 540 se analiza adicionalmente usando un instrumento RMN de 500 MHz y tiene valores de RMN  $\delta$  de  $^1\text{H}$  a 6.22, 5.81, 5.69, 5.66, 5.65, 4.64, 4.31, 3.93, 3.22, 3.21, 3.15, 3.10, 2.69, 2.62, 2.26, 2.23, 1.74, 1.15, 1.12, 1.05, 1.02; y tiene valores de RMN de  $^{13}\text{C}$  de 172.99, 172.93, 169.57, 169.23, 167.59, 130.74, 130.12, 129.93, 128.32, 73.49, 62.95, 59.42, 57.73, 38.39, 38.00, 35.49, 30.90, 30.36, 29.26, 18.59, 18.38, 18.09, 17.93, 12.51. Los datos de RMN indican que el compuesto contiene grupos amino, éster, ácido carboxílico, metilo alifático, etilo, metileno, oximetileno, metino, oximetil y azufre. El análisis RMN 1D y 2D detallado confirma la estructura del compuesto como FR90128 como un compuesto conocido.

#### 11. Ejemplo 11. Actividad herbicida de la Templamida A, Templamida B, FR901465 y FR90128

La actividad herbicida de la templamida A, B, FR901465 y FR90128 se ensaya en un ensayo de laboratorio que usa plántulas de arrozillo (*Echinochloa crus-galli*) y lechuga (*Lactuca sativa* L.) de una sola semana en una plataforma de placas de 96 pozos. Se coloca una plántula en cada uno de los pozos que contienen 99 microlitros de agua DI. En cada pozo, se añade una alícuota de un microlitro del compuesto puro en etanol (10 mg/mL), y la placa se sella con una tapa. Se utiliza como control negativo un microlitro de etanol en 99 microlitros de agua. Los tratamientos se realizan en ocho repeticiones, y la placa sellada se incuba en un invernadero bajo luces artificiales (12 horas de ciclo de luz/oscuridad). Después de cinco días, se leen los resultados. Las plántulas de hierba en los ocho pozos que recibieron el compuesto activo están muertas sin dejar tejido verde, mientras que las plántulas en los pozos de control negativo están creciendo activamente. La actividad herbicida de la templamida A contra las plántulas de lechuga es ligeramente inferior a la de la hierba. Por otro lado, la templamida B proporciona un mejor control (100%) de las plántulas de lechuga (usadas como sistema modelo para las malezas de hoja ancha) que la templamida A (Tabla 11).

Tabla 11: Datos de bioensayos herbicidas para la Templamida A, B, FR901465 y FR90128

Compuestos <sup>1</sup>	Plántulas de hierba (% de mortalidad)	Plántulas de lechuga (% de mortalidad)
Templamida A	100	88
Templamida B	0	75
FR901465	88	100
FR90128	100	88
Control	0	0

<sup>1</sup>10  $\mu\text{g/mL}$  de concentración por pozo

#### 12. Ejemplo 12. Actividad insecticida de los compuestos activos

La actividad insecticida de la templamida A, B, FR901465 y FR90128 se ensaya en un ensayo de laboratorio que usa un ensayo de superposición de dieta de 96 pozos con larvas de gardama de 1<sup>er</sup> estadio que usan placas de microtitulación con 200  $\mu\text{l}$  de dieta de gardama sólida y artificial en cada pozo. Se pipetea cien (100)  $\mu\text{l}$  de cada muestra de ensayo en la parte superior de la dieta (una muestra en cada pozo) y la muestra se deja secar bajo corriente de aire hasta que la superficie está seca. Cada muestra se ensayó en seis repeticiones, y se usaron agua y un producto comercial Bt (*B. thuringiensis*) como controles negativo y positivo, respectivamente. Se colocó una larva del cebador estadio del insecto de prueba (gardama - *Spodoptera exigua*) en cada pozo, y la placa se cubrió con una cubierta de plástico con orificios de aire. Las placas con insectos se incubaron a 26°C durante 6 días con evaluaciones de mortalidad diarias. En base a los resultados presentados en la Tabla 12, la templamida A y B resultan en una mortalidad del 40% y del 80%, respectivamente.

Tabla 12: Datos de bioensayo insecticida para la Templamida A, B, FR901465 y FR90128 contra el gusano de gardama (*Spodoptera exigua*) del 1er estadio.

Compuestos <sup>1</sup>	(% de mortalidad)
-------------------------	-------------------

Templamida A	40
Templamida B	80
FR901465	50
FR90128	90
Bt	100
Control	0
<sup>1</sup> 10 mg/mL de concentración por pozo	

## Ejemplo 11. Actividad fungicida de FR90128 (PM 540)

5 La actividad fungicida de FR90128 (MW 540) frente a tres hongos patógenos de plantas (*Botrytis cinerea*, *Phytophthora* sp., *Monilinia fructicola*) se ensaya en un ensayo de placa PDA (agar de dextrosa de patata) in vitro. Las placas se inoculan con el hongo que usa un método de enchufe. Después de que el hongo se ha establecido e inicio su crecimiento sobre el medio de cultivo, se colocaron ocho discos de papel de filtro estériles en cada placa a aproximadamente 1 cm del borde en un círculo. Se añaden 10 microlitros de solución de etanol que contiene 20, 15, 10, 7.5, 5, 2.5 y 1.25 mg de FR90128/mL en discos de papel de filtro, y la solución se deja evaporar. Se usa un disco incrustado con 10 µL de etanol puro como un control negativo. El ensayo se realiza con tres repeticiones. Las placas se incuban a temperatura ambiente durante 5 días, después de lo cual se registra la actividad fungicida midiendo la zona de inhibición alrededor de cada disco de papel de filtro correspondiente a diferentes concentraciones de FR90128. De acuerdo con los resultados, FR90128 no tiene ningún efecto sobre el crecimiento de *Monilinia* pero es eficaz en el control del crecimiento de hifas tanto de *Botrytis* como de *Phytophthora*. Parece haber una clara respuesta a la dosificación en la inhibición con concentraciones umbral de 10 mg/mL y 1.25 mg/mL para *Botrytis* y *Phytophthora*, respectivamente (la Figura 8).

## Depósito de material biológico

20 El siguiente material biológico ha sido depositado bajo los términos del Tratado de Budapest con el Agricultural Research Culture Collection (NRRL), 1815 N. University Street, Peoria, Illinois 61604 EEU, y se les dio el siguiente número:

25	<u>Deposito</u>	<u>Número de acceso</u>	<u>Fecha de depósito</u>
	Burkholderia sp. A396	NRRL B-50319	Septiembre 15 de 2009

30 La cepa ha sido depositada bajo condiciones que aseguran que el acceso al cultivo estará disponible durante la pendencia de esta solicitud de patente a una determinada por el Comisionado de Patentes y Marcas para tener derecho a ello bajo 37 C.F.R. §1.14 y 35 U.S.C. §122. El depósito representa un cultivo sustancialmente puro de la cepa depositada. El depósito está disponible según lo requieran las leyes de patentes extranjeras en países en los que se presentan las contrapartes de la solicitud en cuestión, o su progenie. Sin embargo, debe entenderse que la disponibilidad de un depósito no constituye una licencia para practicar la presente invención en derogación de los derechos de patentes otorgados por la acción gubernamental.

35 La invención descrita y reivindicada en aquí no debe limitarse en su alcance por los aspectos específicos divulgados aquí, ya que estos aspectos se proponen como ilustraciones de varios aspectos de la invención. En el caso de conflicto, la presente divulgación que incluye definiciones controlará.

## 40 Literatura citada

Anderson, et al. "The structure of thiostrepton," *Nature* 225: 233-235. 1970.

Andra, "Endotoxin-like properties of a rhamnolipid exotoxin from *Burkholderia* (*Pseudomonas*) *plantarii*: immune cell stimulation and biophysical characterization." *Biol. Chem.* 387: 301-310. 2006.

45 Arena, et al. "The mechanism of action of avermectins in *Caenorhabditis elegans* - correlation between activation of glutamate-sensitive chloride current, membrane binding and biological activity." *J Parasitol.* 81: 286-294. 1995.

Asolkar, et al., "Weakly cytotoxic polyketides from a marine-derived Actinomycete of the genus *Streptomyces* strain CNQ-085." *J. Nat. Prod.* 69:1756-1759. 2006.

50 Burkhead, et al., "Pyrrrolnitrin production by biological control agent *Pseudomonas cepacia* B37w in culture and in colonized wounds of potatoes." *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 2031-2039. 1994.

Burkholder, W. H "Sour skin, a bacterial rot of onion bulbs." *Phytopathology* 40: 115-117.1950.

- Caballero-Mellado et al., "Burkholderia unamae sp. nov., an N<sub>2</sub>-fixing rhizospheric and endophytic species." *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54: 1165-1172. 2004.
- Cashion et al. "Rapid method for base ratio determination of bacterial ADN." *Anal. Biochem.* 81: 461-466. 1977.
- Casida, et al., US Patent No. 6,689,357.
- 5 Chen et al., "Burkholderia nodosa sp. nov., isolated from root nodules of the woody Brazilian legumes *Mimosa bimucronata* and *Mimosa scabrella*" *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57: 1055-1059. 2007.
- Cheng, A. C. and Currie, B. J. "Melioidosis: epidemiology, pathophysiology, and management." *Clin. Microbiol.* 18: 383-416. 2005.
- 10 Coenye, T. and Vandamme, P. "Diversity and significance of Burkholderia species occupying diverse ecological niches." *Environ. Microbiol.* 5: 719-729. 2003.
- Compant, et al. "Diversity and occurrence of Burkholderia spp. in the natural environment." *FEMS Microbiol. Rev.* 32: 607-626. 2008.
- De Ley et al. "The quantitative measurement of ADN hybridization from renaturation rates." *Eur. J. Biochem.* 12:133-142. 1970.
- 15 Duke et al. "Natural products as sources for herbicides: current status and future trends." *Weed Res* 40: 99-111. 2000.
- Gerwick et al., US Patent No. 7,393,812.
- Gottlieb et al., US Patent No. 4,808,207.
- Gouge et al., US Patent Application Pub. No. 2003/0082147.
- 20 Guella et al. "Almazole C, a new indole alkaloid bearing an unusually 2,5-disubstituted oxazole moiety and its putative biogenetic precursors, from a Senegalese Delesseriacean sea weed." *Helv. Chim. Acta* 77: 1999-2006. 1994.
- Guella et al. "Isolation, synthesis and photochemical properties of almazolone, a new indole alkaloid from a red alga of Senegal." *Tetrahedron.* 62: 1165-1170. 2006.
- 25 Henderson, P. J. and Lardy H. A. "Bongkreic acid. An inhibitor of the adenine nucleotide translocase of mitochondria." *J. Biol. Chem.* 245: 1319-1326. 1970.
- Hirota et al. "Isolation of indolmycin and its derivatives as antagonists of L-tryptophan." *Agri. Biol Chem.* 42: 147-151. 1978.
- 30 Hu, F.-P. and Young, J. M. "Biocidal activity in plant pathogenic *Acidovorax*, *Burkholderia*, *Herbaspirillum*, *Ralstonia*, and *Xanthomonas* spp." *J. Appl. Microbiol.* 84: 263-271.1998.
- Huss et al. "Studies of the spectrophotometric determination of ADN hybridization from renaturation rates." *System. Appl. Microbiol.* 4: 184-192. 1983.
- Jansiewicz, W. J. and Roitman J. "Biological control of blue mold and gray mold on apple and pear with *Pseudomonas cepacia*." *Phytopathology* 78: 1697-1700. 1988.
- 35 Jeddelloh et al., WO2001/055398.
- Jansen et al. "Thiangazole: a novel inhibitor of HIV-1 from *Polyangium Spec.*" *Liebigs Ann. Chem.* 4: 357-3359. 1992.
- Jeong et al. "Toxoflavin produced by *Burkholderia glumae* causing rice grain rot is responsible for inducing bacterial wilt in many field crops." *Plant Disease* 87: 890-895. 2003.
- 40 Knudsen, G. R. and Spurr, J. "Field persistence and efficacy of five bacterial preparations for control of peanut leaf spot." *Plant Disease* 71: 442-445. 1987.
- Koga-Ban et al. "cADN sequences of three kinds of beta-tubulins from rice." *ADN Research* 2: 21-26. 1995.
- Koide et al. US Patent Application Pub. No. 2008/0096879.
- Koyama et al. "Isolation, characterization, and synthesis of pimprinine, pimrinrthine, and pimprinaphine, metabolites of *Streptovercillium olivoreticuli*." *Agri. Biol. Chem.* 45: 1285-1287.1981.
- 45 Krieg et al. "*Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*: Ein neuer, gegenüber Larven von Coleopteren wirksamer Pathotyp." *Z. Angew. Entomol.*\_96:500-508. 1983.

- Kunze et al. "Thiangazole, a new thiazoline antibiotic from *Polyangium* sp (*Myxobacteria* Production, antimicrobial activity and mechanism of action." *J. Antibiot.*, 46: 1752-1755. 1993.
- Leahy et al. "Comparison of factors influencing trichloroethylene degradation by toluene-oxidizing bacteria." *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 825-833. 1996.
- 5 Lessie et al. "Genomic complexity and plasticity of *Burkholderia cepacia*." *FEMS Microbiol. Lett.* 144: 117-128. 1996.
- Lindquist, N. et al. "Isolation and structure determination of diazonamides A and B, unusual cytotoxic metabolites from the marine ascidian *Diazona chinensis*." *J. Am Chem. Soc.* 113: 2303-2304. 1991.
- Lorch, H et al. "Basic methods for counting microorganisms in soil and water. In *Methods in applied soil microbiology and biochemistry*. K. Alef and P. Nannipieri. Eds. San Diego, CA, Academic Press: pp. 146-161. 1995.
- 10 Ludovic et al. "*Burkholderia diveristy* and versatility: An inventory of the extracellular products." *J. Microbiol. Bio technol.* 17: 1407-1429. 2007.
- Lydon, J. and Duke, S. "Inhibitors of glutamine biosynthesis." in *Plant amino acids: Biochemistry and Biotechnology*. B. Singh., Ed. New York, USA, Marcel Decker. pp. 445-464. 1999.
- 15 Mahenthalingam et al. "ADN-based diagnostic approaches for identification of *Burkholderia cepacia* complex, *Burkholderia vietnamiensis*, *Burkholderia multivorans*, *Burkholderia stabilis*, and *Burkholderia cepacia* genomovars I and III." *J.Clin. Microbiol.* 38: 3165-3173. 2000.
- Ming, L.-J. and Epperson. "Metal binding and structure-activity relationship of the metalloantibiotic peptide bacitracin." *Biochemistry* 91: 46-58. 2002.
- Morita et al. "Biological activity of tropolone." *Biol. Pharm. Bull.* 26: 1487-1490.2003.
- 20 Nagamatsu, T. "Syntheses, transformation, and biological activities of 7-azapteridine antibiotics: toxoflavin, fervenulin, reumycin, and their analogs". *Recent Res. Devel. Org. Bioorg. Chem.* 4: 97 -121. 2001.
- Naik et al., "Pimprine, an extracellular alkaloid produced by *Streptomyces* CDRIL-312: fermentation, isolation and pharmacological activity." *J. Biotech.* 88: 1-10. 2001.
- 25 Nakajima et al., "Antitumor Substances, FR901463, FR901464 and FR901465. I. Taxonomy, Fermentation, Isolation, Physico-chemical Properties and Biological Activities." *J. Antibiot.* 49: 1196-1203.1996.
- Nakajima et al. US Patent No. 5,545,542.
- Nakajima et al., "Hydantocidin: a new compound with herbicidal activity." *J Antibiot.* 44: 293-300. 1991.
- N'Diaye, I. et al., "Almazole A and amazole B, unusual marine alkaloids of an unidentified red seaweed of the family Delesseriaceae from the coasts of Senegal." *Tet Lett.* 35: 4827-4830. 1994.
- 30 N'Diaye, I. et al., "Almazole D, a new type of antibacterial 2,5-disubstituted oxazolic dipeptide from a red alga of the coast of Senegal." *Tet Lett.* 37: 3049-3050. 1996.
- Nierman et al., "Structural flexibility in the *Burkholderia mallei* genome." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 14246-14251. 2004.
- 35 Okazaki et al., "Rhizobial strategies to enhance symbiotic interaction: Rhizobitoxine and 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase." *Microbes Environ.* 19: 99-111. 2004.
- Parke, J. L. and D. Gurian-Sherman, D. 2001. "Diversity of the *Burkholderia cepacia* complex and implications for risk assessment of biological control strains." *Annual Reviews in Phytopathology* 39: 225-258. 2001.
- Parke, et al. US Patent No. 6,077,505.
- Pettit, G. et al. "Isolation of Labradorins 1 and 2 from *Pseudomonas syringae*." *J. Nat. Prod.* 65: 1793-1797. 2002.
- 40 Pitt, et al., "Type characterization and antibiotic susceptibility of *Burkholderia* (*Pseudomonas*) *cepacia* isolates from patients with cystic fibrosis in the United Kingdom and the Republic of Ireland." *J. Med. Microbiol.* 44: 203-210. 1996.
- Ramette et al., "Species abundance and diversity of *Burkholderia cepacia* complex in the environment." *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 1193-1201. 2005.
- 45 Resi et al., "*Burkholderia tropica* sp. nov., a novel nitrogen-fixing, plant-associated bacterium." *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54: 2155-2162. 2004.

- Salama et al. "Potency of spore-gamma-endotoxin complexes of *Bacillus thuringiensis* against some cotton pests." *Z. Angew. Entomol.* 91: 388-398. 1981.
- Selva et al., "Targeted screening for elongation factor Tu binding antibiotics." *J. Antibiot.* 50: 22-26. 1997.
- 5 Takahashi, S. et al. "Martefragin A, a novel indole alkaloid isolated from a red alga, inhibits lipid peroxidation." *Chem Pharm. Bull.* 46: 1527-1529. 1998.
- Thompson et al. "Spinosad - a case study: an example from a natural products discovery programme." *Pest Management Science* 56: 696-702. 2000.
- Takita et al., "Chemistry of Bleomycin. XIX Revised structures of bleomycin and phleomycin." *J. Antibiot.* 31: 801-804. 1978.
- 10 Tran Van et al., "Repeated beneficial effects of rice inoculation with a strain of *Burkholderia vietnamiensis* on early and late yield component in low fertility sulphate acid soils of Vietnam." *Plant and Soil* 218: 273-284. 2000.
- Tsuruo et al., "Rhizoxin, a macrocyclic lactone antibiotic, as a new antitumor agent against human and murine tumor cells and their vincristine-resistant sublines." *Cancer Res.* 46: 381-385. 1986.
- Ueda et al., US Patent No. 7,396,665.
- 15 Umehara, K. et al. "Studies of new antiplatelet agents WS-30581 A and B." *J. Antibiot.* 37: 1153-1160. 1984.
- Vandamme et al. Polyphasic taxonomic study of the emended genus *Arcobacter* with *Arcobacter butzleri* comb. nov. and *Arcobacter skirrowii* sp. nov., an aerotolerant bacterium isolated from veterinary specimens." *Int. J. Syst. Bacteriol.* 42: 344-356. 1992.
- 20 Vanderwall et al., "A model of the structure of HOO-Co•bleomycin bound to d(CCAGTACTGG): recognition at the d(GpT)site and implications for double-stranded ADN cleavage, *Chem. Biol.* 4: 373-387. 1997.
- Vermis K., et al. "Evaluation of species-specific recA-based PCR tests for genomovar level identification within the *Burkholderia cepacia* complex." *J. Med. Microbiol* 51: 937-940. 2002.
- Watanabe, H. et al. "A new antibiotic SF2583A, 4-chloro-5-(3'indoly)oxazole, produced by *Streptomyces*." *Meiji Seika Kenkyu Nenpo* 27: 55-62. 1988.
- 25 Wayne et al., "Report of the Ad Hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics." *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 37: 463-464. 1987.
- Werner et al., "Uptake of indolmycin in gram-positive bacteria." *Antimicrob Agents Chemotherapy* 18: 858-862. 1980.
- Wilson et al. "Toxicity of rhizonin A, isolated from *Rhizopus microsporus*, in laboratory animals." *Food Chem. Toxicol.* 22: 275-281. 1984.
- 30 Zeck W.M. "Ein Bonitierungsschema zur Feldauswertung von Wurzelgallenbefall. *Pflanzenschutznachrichten.*" *Bayer* 24,1: 144-147. 1971.
- Zhang et al., US Patent No. 7,141,407.
- Zhou et al., "Antimicrobial susceptibility and synergy studies of *Burkholderia cepacia* complex isolated from patients with cystic fibrosis." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 51: 1085-088.2007.
- 35
- Listado de secuencias
- <110> Marrone Bio Innovations, Inc.
- 40 <120> CEPA BACTERIANA AISLADA DEL GÉNERO BURKHOLDERIA
- <130> MOI-42016-US
- <150> 61308287
- 45 <151> 2010-02-25
- <150> 61406541
- <151> 2010-10-25
- 50 <160> 15

<170> PatentIn version 3.5

5 <210> 1  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> cebador

10 <400> 1  
agagttgat cctggctcag 20

15 <210> 2  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> cebador

<400> 2  
ccgtcaattc cttgagttt 20

20 <210> 3  
<211> 16  
<212> ADN  
<213> cebador

25 <400> 3  
gtgccagccg ccgchg 16

30 <210> 4  
<211> 16  
<212> ADN  
<213> cebador

35 <400> 4  
gcaacgagcg caacc 16

40 <210> 5  
<211> 17  
<212> ADN  
<213> cebador

45 <400> 5  
aaggaggtgw tccarcc 17

50 <210> 6  
<211> 15  
<212> ADN  
<213> cebador

55 <400> 6  
gggttgcgct cgttg 15

<210> 7  
<211> 18  
<212> ADN  
<213> cebador

60 <400> 7  
gwattaccgc ggckgctg 18

65 <210> 8  
<211> 871  
<212> ADN  
<213> Burkholderia A396

<400> 8



ES 2 625 607 T3

tgcagtcgaa cggcagcacg ggtgcttgca cctggtggcg agtggcgaac gggtagta 60  
 tacatcggaa catgtcctgt agtgggggat agcccggcga aagccggatt aataccgcat 120  
 acgatctacg gatgaaagcg ggggatcttc ggacctcgcg ctatagggtt ggccgatggc 180  
 tgattagcta gttggtgggg taaaggccta ccaaggcgac gatcagtagc tggctgaga 240  
 ggacgatcag ccacactggg actgagacac ggcccagact cctacgggag gcagcagtgg 300  
 ggaatthttgg acaatggggg aaaccctgat ccagcaatgc cgcgtgtgtg aagaaggcct 360  
 tccggttgta aagcactttt gtccggaaag aaatcctttg ggctaatacc cccgggggat 420  
 gacggtaccg gaagaataag caccggctaa ctacgtgcca gcagccgcyg taatacgtag 480  
 ggtgcygagcg ttaatcggaa ttactgggcyg taaagcgtgc gcagggcgtt tggtaagaca 540  
 gatgtgaaat ccccgggctt aacctgggaa ctgcatttgt gactggcaag ctagagtatg 600  
 gcagaggggg gtagaattcc acgtgtagca gtgaaatgcyg tagagatgtg gaggaatacc 660  
 gatggcgaag gcagccccct gggccaatac tgacgctcat gcacgaaagc gtggggagca 720  
 aacaggatta gataccctgg tagtccacgc cctaaacgat gtcaactagt tgttggggat 780  
 tcatttcctt agtaacgtag ctacgcgtga agttgaccgc ctggggagta cggtcgcaag 840  
 attaaatmga gggtkgkktg kkggggggaa a 871

<210> 9  
 <211> 1453  
 <212> ADN  
 <213> Burkholderia A396

5

<400> 9

gtcatgaatc ctaccgtggt gaccgtcctc cttgcyggtta gactagccac ttctggtaaa 60  
 acccactccc atggtgtgac gggcgggtgtg tacaagaccg gggaacgtat tcaccgcygc 120  
 atgctgatcc gcgattacta gcgattccag cttcatgcac tcgagttgca gagtgcfaatc 180

10

ES 2 625 607 T3

cggactacga tcggttttct gggattagct ccccctcgcg ggttggcaac cctctgttcc 240  
 gaccattgta tgacgtgtga agccctaccc ataagggcca tgaggacttg acgtcatccc 300  
 caccttcctc cggttttgtca ccggcagtct ccttagagtg ctcttgcgta gcaactaagg 360  
 acaagggttg cgctcgttgc gggacttaac ccaacatctc acgacacgag ctgacgacag 420  
 ccatgcagca cctgtgtatc ggttctcttt cgagcactcc cgaatctctt caggattccg 480  
 accatgtcaa gggtaggtaa ggtttttcgc gttgcatcga attaatccac atcatccacc 540  
 gcttgtgcgg gtccccgtca attcctttga gttttaatct tgcgaccgta ctccccaggc 600  
 ggtcaacttc acgcgtagc tacgttacta aggaaatgaa tccccaaaca ctagttgaca 660  
 tcgtttaggg cgtggactac cagggtatct aatcctgttt gctccccacg ctttcgtgca 720  
 tgagcgtcag tattggccca gggggctgcc ttcgccatcg gtattcctcc acatctctac 780  
 gcatttcaact gctacacgtg gaattctacc cccctctgcc atactctagc ttgccagtca 840  
 caaatgcagt tcccaggtta agcccgggga tttcacatct gtcttaacaa accgcctgcg 900  
 cacgctttac gccagtaat tccgattaac gctcgcaccc tacgtattac cgcggtgct 960  
 ggcacgtagt tagccggtgc ttattcttcc ggtaccgtca tccccccggg gtattagccc 1020  
 aaaggatttc tttccggaca aaagtgcttt acaaccgaa ggccttcttc acacacgcgg 1080  
 cattgctgga tcagggtttc cccattgtc caaaattccc cactgctgcc tcccgtagga 1140  
 gtctgggccc tgtctcagtc ccagtgtggc tgatcgtcct ctgagaccag ctactgatcg 1200  
 tcgccttggg aggcctttac cccaccaact agctaatcag ccatcggcca accctatagc 1260  
 gcgaggtccg aagatcccc gctttcatcc gtagatcgta tgcggtatta atccggcttt 1320  
 cgccgggcta tccccacta caggacatgt tccgatgtat tactcaccgg ttcgccactc 1380  
 gccaccaggt gcaagcaccg gtgctgccgt tcgacttgca tgtgtaaggc atgccgccag 1440  
 cgttcaatct gag 1453

<210> 10  
 <211> 860  
 <212> ADN  
 <213> Burkholderia A396

5

<400> 10

ES 2 625 607 T3

ccaggcggtc acttcacgcg ttagctacgt tactaaggaa atgaatcccc aacaactagt 60  
 tgacatcggt tagggcgtgg actaccaggg tatctaatacc tgtttgctcc ccacgctttc 120  
 gtgcatgagc gtcagtattg gccaggggg ctgccttcgc catcgggtatt cctccacatc 180  
 tctacgcatt tcaactgctac acgtggaatt ctacccccct ctgccatact ctagcttgcc 240  
 agtcacaaat gcagttccca ggtaagccc ggggatttca catctgtctt aacaaaccgc 300  
 ctgcgcacgc tttacgcca gtaattccga ttaacgctcg caccctacgt attacgcgg 360  
 ctgctggcac gtagttagcc ggtgcttatt cttccggtagc cgatcatcccc ccgggggtatt 420  
 agcccaaagg atttctttcc ggacaaaagt gctttacaac ccgaaggcct tcttcacaca 480  
 cgcggcattg ctggatcagg gtttcccca ttgtccaaaa tccccactg ctgcctcccg 540  
 taggagtctg ggccgtgtct cagtcccagt gtggctgatc gtcctctcag accagctact 600  
 gatcgtcgcc ttggtaggcc tttacccac caactagcta atcagccatc ggccaaccct 660  
 atagcgcgag gtccgaagat cccccgctt catccgtaga tcgtatgcgg tattaatccg 720  
 gctttcgccg ggctatcccc cactacagga catgttccga tgtattactc acccgttcgc 780  
 cactcgccac caggtgcaag caccctgct gccgttcgac ttgcatgtgt aaggcatgcc 840  
 gccagcgttc aatctgagtg 860

5 <210> 11  
 <211> 1152  
 <212> ADN  
 <213> Burkholderia A396

10 <400> 11

ES 2 625 607 T3

tcggattact	gggcgtaagc	gtgcgcaggc	ggtttgtaa	gacagatgtg	aaatccccgg	60
gcttaacctg	ggaactgcat	ttgtgactgg	caagctagag	tatggcagag	gggggtagaa	120
ttccacgtgt	agcagtgaaa	tgcgtagaga	tgtggaggaa	taccgatggc	gaagggagcc	180
ccctgggctt	atactgacct	tcatgctcga	aagcgtgagg	acccaaccgg	attagatgcc	240
ctgataggcc	atgccccaca	ccatgccatg	tgttaggggc	ccatttcctt	agggaggcag	300
ctatggggaa	ttttggacaa	tgtgggaaac	cctgatccaa	caatgccgcg	tgtgtgaata	360
aggccttcgg	gttgtaaagc	acttttatcc	ggatagattc	cttttgggct	aaacctccgt	420
aggggatgac	ggtaccggaa	gaataaccac	cgggtaacta	cgtgccagca	gccgcggtaa	480
tacgtagggg	gcgagcgtaa	atcggaatta	ctgggcgtaa	agcgtgcgca	ggcggtttgt	540
taagacagat	gtgaaatccc	cgggcttaac	ctgggaactg	catttgtgac	tggcaagcta	600
gagtatggca	gacgggggta	gaattccacg	tgtagcagtg	aaatgcgtag	agatgtggag	660
gaataccgat	gggcgaagca	gctcctgggg	caatactgac	gctcatgcac	aagatcgtgc	720
gaaacaaaca	ggataaaacc	cctgtattcc	acgccccaaa	cgatgtccac	caagttggtg	780
gcgatccttt	ccttcgtatc	gtagctacgc	gggaatttga	ccccctgggg	actaggccgc	840
atataaaaact	caaggggaatt	ccggggacct	ccagagctgt	gtatgatgtg	attattccga	900
tgcgcggaaa	accttcctta	tctttgaatg	gcggtactcc	tgaaaattgc	ggagtgtctg	960
aaaacaccga	acccgggtct	ttctgcgtgt	cctccctcgt	gtgggatatg	ctggatatcc	1020
cgcagacgca	tctttgactt	agtgctccca	aaactgagag	ctgggaggac	tcgagagggg	1080
atccctgcct	ccccggcttg	ggtgctcccc	ttatggggga	aacaggtaca	cggggggatc	1140
atcccatacc	ta					1152

<210> 12  
 <211> 1067  
 <212> ADN  
 <213> Burkholderia A396

<400> 12

5

10

ES 2 625 607 T3

tctaaggaga ctgccggtga caaacccgag gaaggtgggg atgacgtcaa gtcctcatgg 60  
 cccttatggg tagggcttca cacgtcatac aatggtcgga acagaggggtt gccaacccgc 120  
 gagggggagc taatcccaga aaaccgatcg tagtccggat tgcactctgc aactcgagtg 180  
 catgaagctg gaatcgctag taatcgcgga tcagcatgcc gcggtgaata cgttcccggg 240  
 tcttgtacac accgcccgtc acaccatggg agtgggtttt accagaagtg gctagtctaa 300  
 ccgcaaggag gacggtcacc acggtaggat tcatgactgg ggtgaagtcg taacaaggta 360  
 gccgtatcgg aaggtgcggc tggatcacct ccttaaacc tttggcctaa taaccccggg 420  
 ggaataagta ccgaaaaaaaa aaaaaactgg ataacttccg tgccacaacc cgcggaaaaa 480  
 tctagggggg gggagcttaa atggaaattt acggggccgt aaagcgtgcg caggcggttt 540  
 gtaaacacag atgtgaaatc cccgggctta acctgggaac tgcatttgtg actggcaagc 600  
 tagagtatgg cacagggggg tagaattcca cgtgtagcat tgaatgcata gagatgagag 660  
 gataccgatg gagaagggcg cccccgggga caatatgacg cctatgccac aaagctgtgg 720  
 cacaataggt taaataacctg tgttgtcccc gcctaaacag attacacttg ttgtgggtat 780  
 tttctcataa aatactacac acgggagaat aactggggg gcttcgtcaa ttatcacaac 840  
 aatgattgcg ggcacccacg ggggtagatg ggtaataaat cgacggcaac tatctactta 900  
 cttggatgat cgcacagatt gggcgggaga gaagagaaca gcgtgtgtgt gctcctccgc 960  
 gagtgateagg taatcggaca atactttgac aggacttaac tgggtagcgg gatcgategg 1020  
 attcccgtcg gatggcctcc gcaggtacgg cagctgggga ttacatc 1067

<210> 13  
 <211> 1223  
 <212> ADN  
 <213> Burkholderia A396

5

<400> 13

ttgcttacga cttcaccoca gtcatgaatc ctaccgtggt gaccgtcctc cttgcggtta 60  
 gactagccac ttctggtaaa acccactccc atggtgtgac gggcgggtgtg tacaagacct 120  
 ggaacgtat tcaccgcggc atgctgatcc gcgattacta gcgattccag cttcatgcac 180  
 tcgagttgca gagtgcaatc cggactacga tcggttttct gggattagct ccccctcgcg 240  
 ggttggcaac cctctgttcc gaccattgta tgacgtgtga agccctacct ataagggcca 300  
 tgaggacttg acgtcatccc caccttctc cggtttgc caaggcagtct ccttagagtg 360  
 ctcttgcgta gcaactaagg acaagggttg cgctcgttgc gggacttaac ccaacatctc 420  
 acgacacgag ctgacgacag ccatgcagca cctgtgtatc ggttctcttt cgagcactcc 480  
 cgaatctctt caggattccg accatgtcaa gggtaggtaa ggtttttcgc gttgcatcga 540

10

ES 2 625 607 T3

attaatccac atcatccacc gcttgtgagg gtccccgtca attcctttga gttttaatct	600
tgcgaccgta ctccccaggc ggtcaacttc acgcgtagc tacgttacta aggaaatgaa	660
tccccaaaca ctagttgaca tcgtttaggg cgtggactac cagggtatct aatcctgttt	720
gctccccacg ctttcgtgca tgagcgtcag tattggcca gggggctgcc ttcgccatcg	780
gtattcctcc acatctctac gcatttcact gctacacgtg gaattctacc cccctctgcc	840
atactctagc ttgccagtca caaatgcagt tcccaggta agcccgggga tttcacatct	900
gtcttaacaa accgcctgcg cacgctttac gccagtaat tccgattaac gctcgcaccc	960
tacgtattac cgcggctgct ggcacgtagt tagccggtgc ttattctgcg gtaccgcat	1020
ccccgggta tagcccaaag gattctttcg acaaagtgct ttacaccga tgtctctcac	1080
acacgcgcat gctgatcagg tttccccatg tcaaagtcca ctgctgctcg taggtctgga	1140
cgggttcagt tcaatgtgac tgatcgtctt tcgacaacta ctgaacgtcc ctgtagctta	1200
cccaccaact agctatagca tgc	1223

<210> 14  
 <211> 1216  
 <212> ADN  
 <213> Burkholderia A396  
  
 <400> 14

5

ES 2 625 607 T3

ccgagctgac gacagccatg cagcacctgt gtatcggttc tctttcgagc actcccgaat 60  
 ctcttcagga ttccgacat gtcaagggta ggtaaggttt ttcgcgttgc atcgaattaa 120  
 tccacatcat ccaccgcttg tgcgggtccc cgtcaattcc tttgagtttt aatcttgcca 180  
 ccgtactccc cagggcgtca acttcacgcg ttagctacgt tactaaggaa atgaatcccc 240  
 aacaactagt tgacatcgtt tagggcgtgg actaccaggg tatctaatacc tgtttgctcc 300  
 ccacgctttc gtgcatgagc gtcagtattg gccaggggg ctgccttcgc catcggatt 360  
 cctccacatc tctacgcatt tcaactgctac acgtggaatt ctacccccct ctgccatact 420  
 ctagcttgcc agtcacaaat gcagttcca ggtaagccc ggggatttca catctgtctt 480  
 aacaaaccgc ctgcgcaacgc tttacgcca gtaattccga ttaacgctcg caccctacgt 540  
 attaccgcg gtgctggcac gtagttagcc ggtgcttatt cttccggtac cgtcatcccc 600  
 ccggggatt agcccaaagg atttctttcc ggacaaaagt gctttacaac ccgaaggcct 660  
 tcttcacaca cgcggcattg ctggatcagg gtttccccca ttgtccaaaa ttccccactg 720  
 ctgcctccc taggagtctg ggccgtgtct cagtcccagt gtggctgac gtccctctcag 780  
 accagctact gatcgtcgcc ttggtaggcc tttaccccac caactagcta atcagccatc 840  
 ggccaaccct atagcgcgag gtccgaagat cccccgctt catccgtaga tcgtatgcgg 900  
 tattaatccg gctttcgccg ggctatcccc cactacagga catgttccga tgtattactc 960  
 acccgttcgc cactcgcccc aggtgcaagc acccgtgctg ccgttcgact tgcattgtga 1020  
 gcatgcgcag cgtcatctac taaataaaca actctaagaa ttttgcccg agggcctcta 1080  
 aacactcggg gcgtcgagag agactacgga tgaggagcat ccctctgtct ctaggtatgt 1140  
 gttgtcgcct ctctcacaga ggaggggacg cacgacggag ccatcgggga cgacaacatg 1200  
 tacgatatac tatcta 1216

5 <210> 15  
 <211> 1194  
 <212> ADN  
 <213> Burkholderia A396

10 <400> 15

ES 2 625 607 T3

ttcttcggta ccgatcatccc cccgggggat tagcccaaag gatttctttc cggacaaaag	60
tgctttacaa cccgaaggcc ttcttcacac acgcggcatt gctggatcag ggtttcccc	120
attgtccaaa attccccact gctgcctccc gtaggagtct gggccgtgtc tcagtcccag	180
tgtggctgat cgtcctctca gaccagctac tgatcgtcgc cttggtaggc ctttacccca	240
ccaactagct aatcagccat cggccaaccc tatagcgcga ggtccgaaga tccccgctt	300
tcatccgtag atcgtatgcg gtattaatcc ggctttcgcg gggctatccc ccaactacagg	360
acatgttccg atgtattact cacccttcg ccaactcgcca ccagggtgcaa gcaccctgtc	420
tgccgttcga cttgcatgtg taaggcatgc cgccagcgtt caatctgagc catgatcaaa	480
ctctgagggg gggggccttc aacggaacga ctgggcaaaa agcgtgcccc ggcgttttgt	540
taagacagat gtgaaacccc ggggctaac ctggaaactg catttgtgac tggaaagcta	600
gagtatggca gaggggggta gaattccacg tgtagcattg aaatgcgtag aaatggagag	660
gaataccgat gggagagggc agccccctg ggcaaatact ggcgcttatg aacaaagttg	720
gggcgcgccg ccgggatatg ttcccctggg atatcccccc cctaaactgc ttacaaatat	780
tgtgtgggaa actttttctc taaaaaatag aacacaacgg gagatatcac ccccgggggg	840
ccaccgccag attaaacccc caaaaagtat ttggcgggca ccccccggg gggtgagatg	900
gggtaaata aatccgtgcg acgagcaaac cctccccaca cctgggatgg tcgcgaccac	960
agatgagatg cgggcggaga gaacgatacc caagcgtggt tgtttgctg catcccctcc	1020
gtcgggagtg gatatagtag agtaattacg gcacgactgc attttttttt cttcagtaca	1080
ccttatcaca ctgttggatg caccgcgaga aatccggagg tgtgagtact cccccctct	1140
cctcgggatg tgtcggcgct cccttctccc gttcaggggt gggtaagcac cgcg	1194



Reivindicaciones

1. Una cepa aislada de Burkholderia A396 (NRRL No. de Acceso B-50319) que tiene las siguientes características:

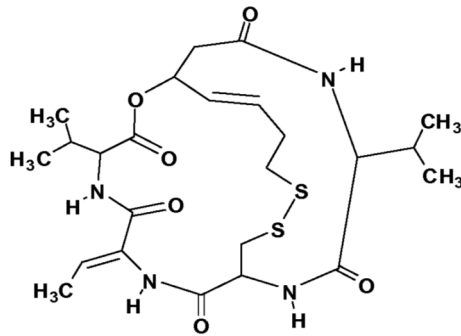
5 (A) en una secuencia genética de ARNr 16S que comprende las secuencias directas que tiene al menos 99% de identidad con las secuencias establecidas en SEQ ID NO:8, 11, y 12 y secuencias inversas que tiene al menos 99% de identidad con las secuencias establecidas en SEQ ID NO:9, 10, 13, 14 y 15;

(B) actividad pesticida;

10

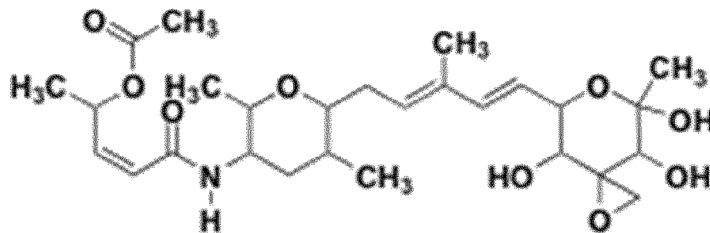
(C) produce un compuesto pesticida seleccionado de

(i) un compuesto que tiene una estructura (FR901228)



15

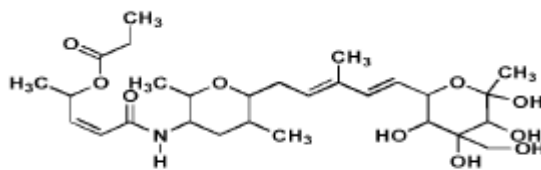
(ii) un compuesto que tiene una estructura



FR901465

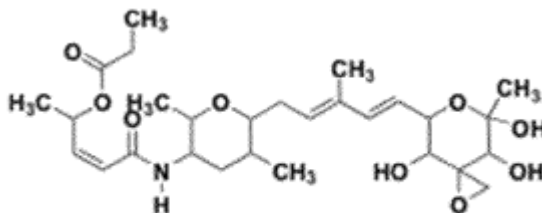
(iii) un compuesto que tiene una estructura

20



Templamida A

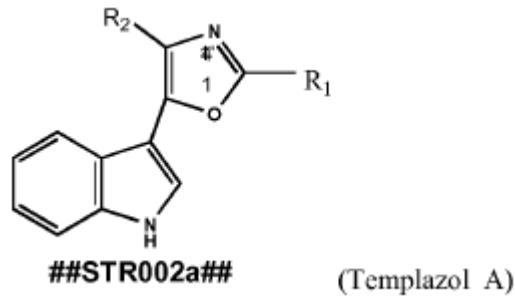
(iv) un compuesto que tiene una estructura



Templamida B

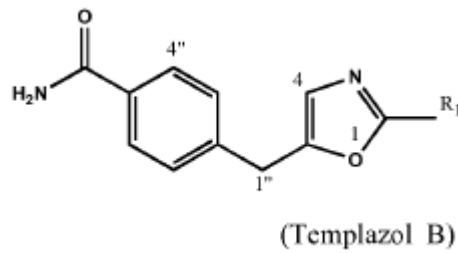
25

(v) un compuesto que tiene una estructura



en el que R1 es isobutilo y R2 es un metil éster de ácido carboxílico; y

5 (vi) un compuesto que tiene una estructura



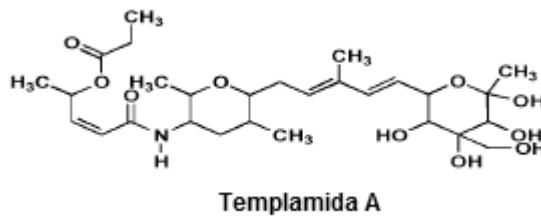
en el que R1 es isobutilo;

10 (D) no es patógena para animales vertebrados; y

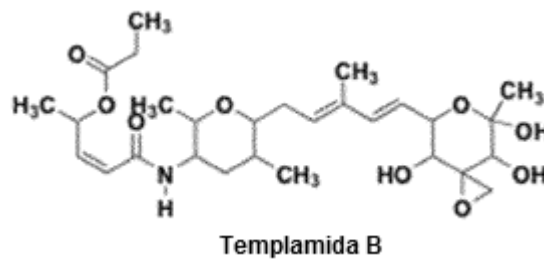
(E) es susceptible a kanamicina, cloranfenicol, ciprofloxacino, piperacilina, imipenem, y una combinación de sulfametoxazol y trimetoprim.

15 2. Un compuesto aislado que tiene actividad pesticida obtenible a partir de una especie de Burkholderia seleccionada de

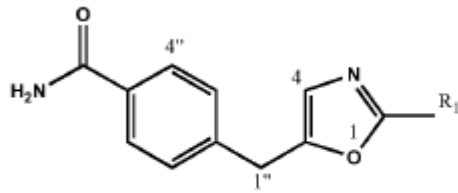
(i) un compuesto que tiene una estructura



20 (ii) un compuesto que tiene una estructura



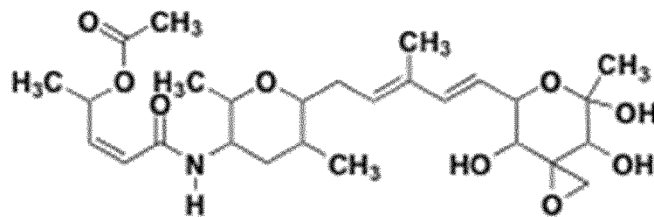
25 (iii) un compuesto que tiene una estructura



(Templazol B)

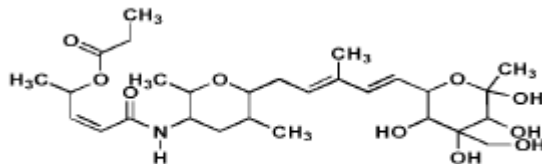
en el que R1 es isobutilo.

- 5 3. Un método para producir un compuesto de la reivindicación 2, cuyo método comprende cultivar la cepa de la reivindicación 1 y producir dicho compuesto.
4. Una composición que comprende la cepa aislada de la reivindicación 1 o un compuesto aislado de la reivindicación 2, en la que la composición tiene actividad pesticida.
- 10 5. Un método para modular la infestación de plagas en una planta que comprende aplicar a la planta y/o semillas de la misma y/o sustrato usado para cultivar dicha planta, una cantidad de una composición que comprende la cepa aislada de la reivindicación 1, o una composición que comprende el compuesto aislado que tiene actividad pesticida seleccionado de
- 15 (i) un compuesto que tiene una estructura



FR901465

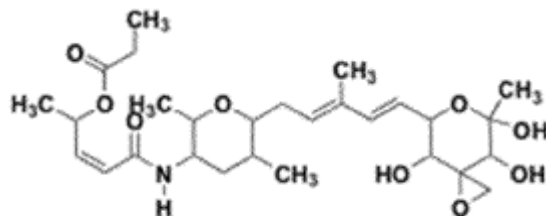
(ii) un compuesto que tiene una estructura



Templamida A

20

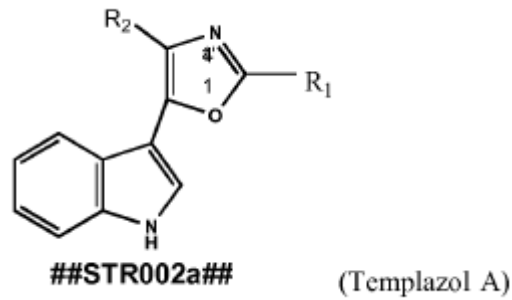
(iii) un compuesto que tiene una estructura



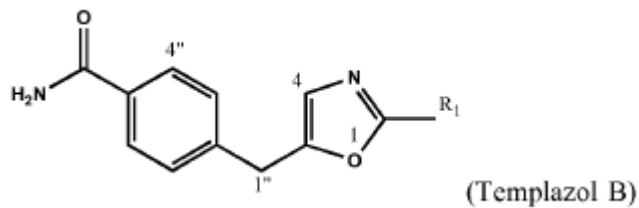
Templamida B

25

(iv) un compuesto que tiene una estructura

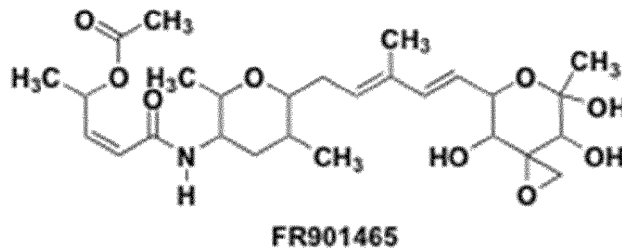


en el que R1 es isobutilo y R2 es un metil éster de ácido carboxílico; y  
(v) un compuesto que tiene una estructura



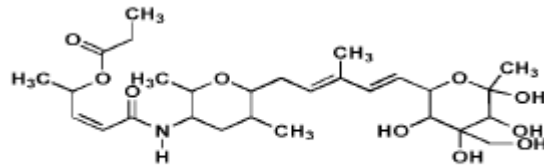
- 5
- en el que R1 es isobutilo,  
efectivo para modular dicha infestación de plagas.
- 10 6. El método de acuerdo con la reivindicación 5, en el que la plaga es un hongo.
7. El método de acuerdo con la reivindicación 5, en el que la plaga es un insecto.
8. El método de acuerdo con la reivindicación 5, en el que la plaga es una maleza monocotiledónea, juncia o dicotiledónea.
- 15 9. El método de acuerdo con la reivindicación 8, en el que el método modula la emergencia y/o el crecimiento de la maleza monocotiledónea, juncia o dicotiledónea
- 20 10. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5-9, en el que se aplica la composición que comprende la cepa aislada de la reivindicación 1.
11. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5-9, en el que se aplica la composición que comprende el compuesto aislado que tiene la estructura.

25



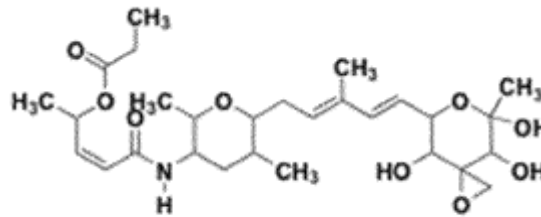
30

12. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5-9, en el que se aplica la composición que comprende el compuesto aislado que tiene la estructura.



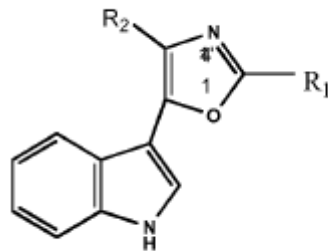
Templamida A

13. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5-9, en el que se aplica la composición que comprende el compuesto aislado que tiene la estructura.



Templamida B

5 14. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5-9, en el que se aplica la composición que comprende el compuesto aislado que tiene la estructura,

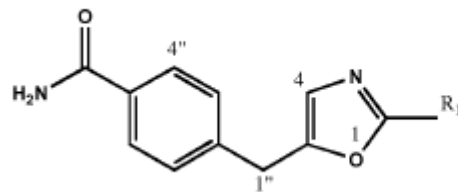


##STR002a##

(Templazol A)

10 en el que R1 es isobutilo y R2 metil éster del ácido carboxílico,

15 15. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5-9, en el que se aplica la composición que comprende el compuesto aislado que tiene la estructura,

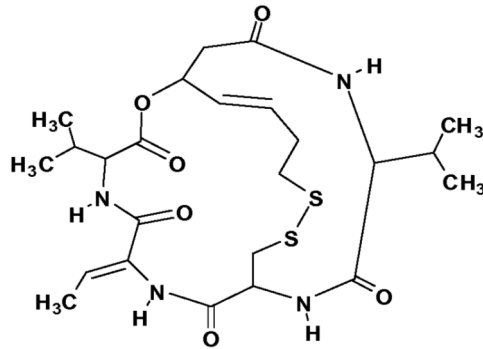


(Templazol B)

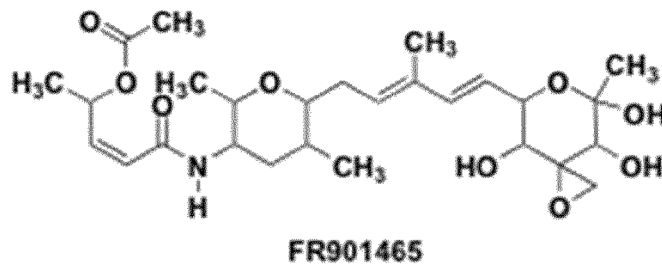
20 en el que R1 es isobutilo.

25 16. Una semilla que comprende la composición que comprende la cepa aislada de la reivindicación 1 o un compuesto aislado que tiene actividad pesticida seleccionada de

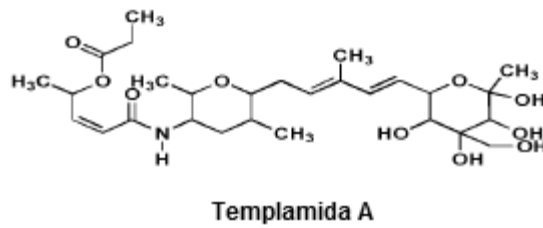
(i) un compuesto que tiene una estructura (FR901228)



5 (ii) un compuesto que tiene una estructura

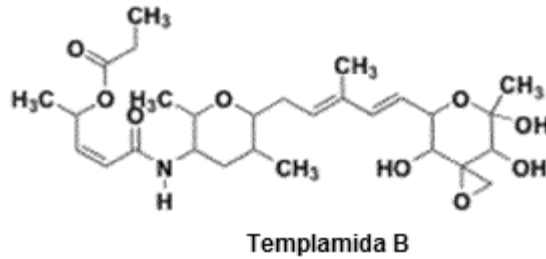


(iii) un compuesto que tiene una estructura

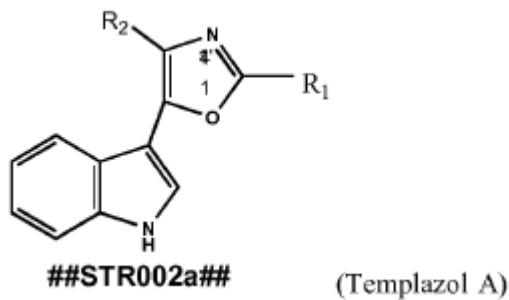


10

(iv) un compuesto que tiene una estructura

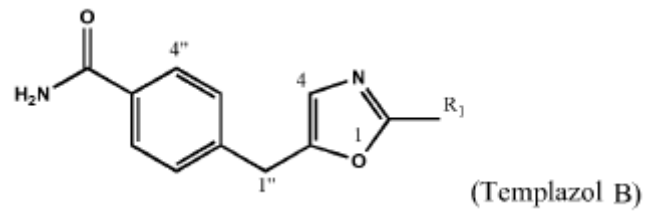


(v) un compuesto que tiene una estructura



15

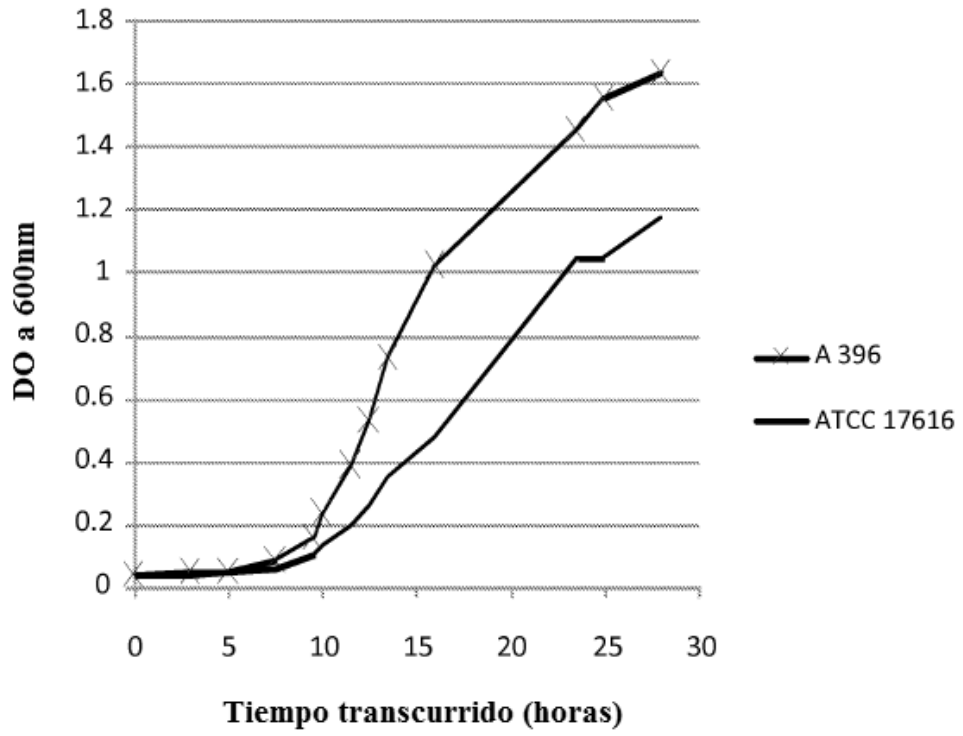
en el que R<sub>1</sub> es isobutilo y R<sub>2</sub> es un metil éster de ácido carboxílico; y  
(vi) un compuesto que tiene una estructura



en el que R1 es isobutilo.

5

Figura 1





**Figura 2**

*UTC (atrás)*  
*A396 @ 5 mg/mL (mitad)*  
*A396 @ 10 mg/mL (frente)*



**Figura 3**

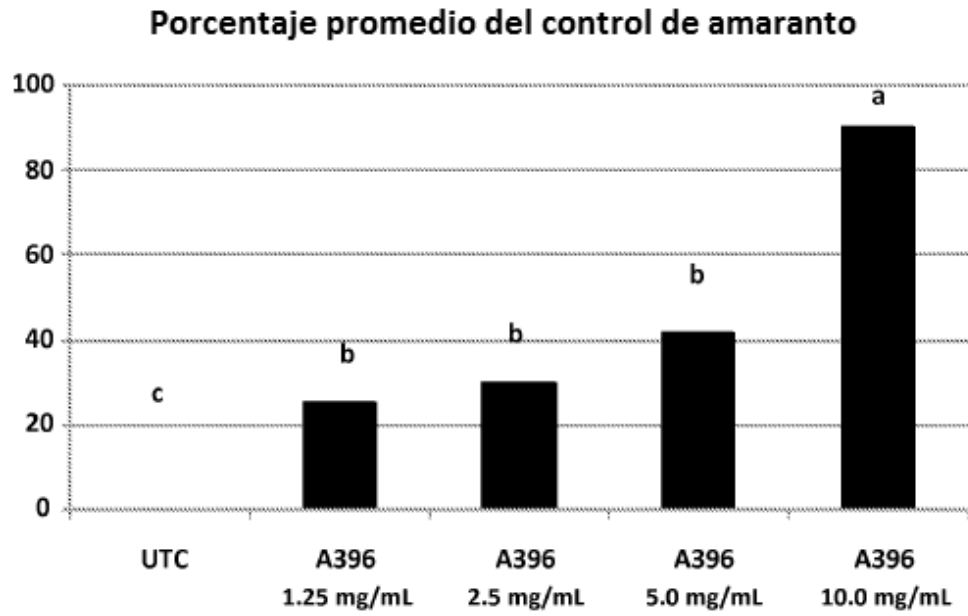
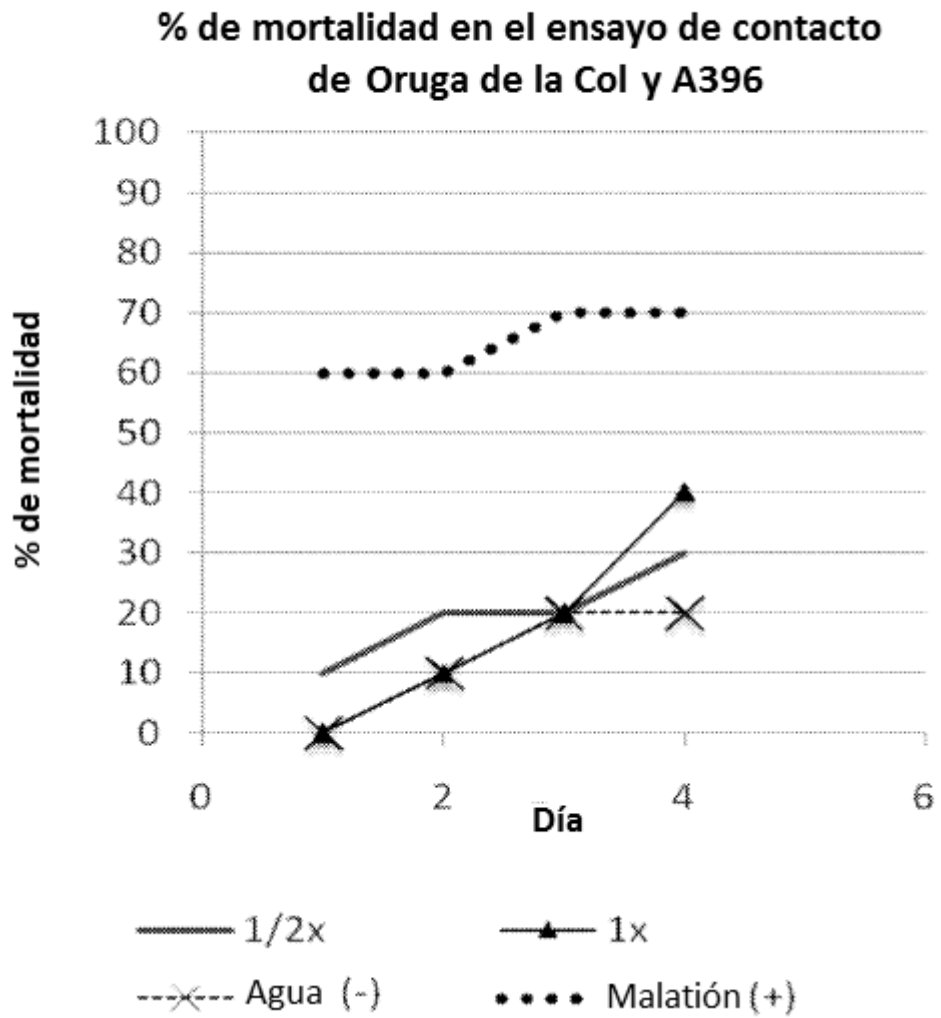


Figura 4



**Figura 5**

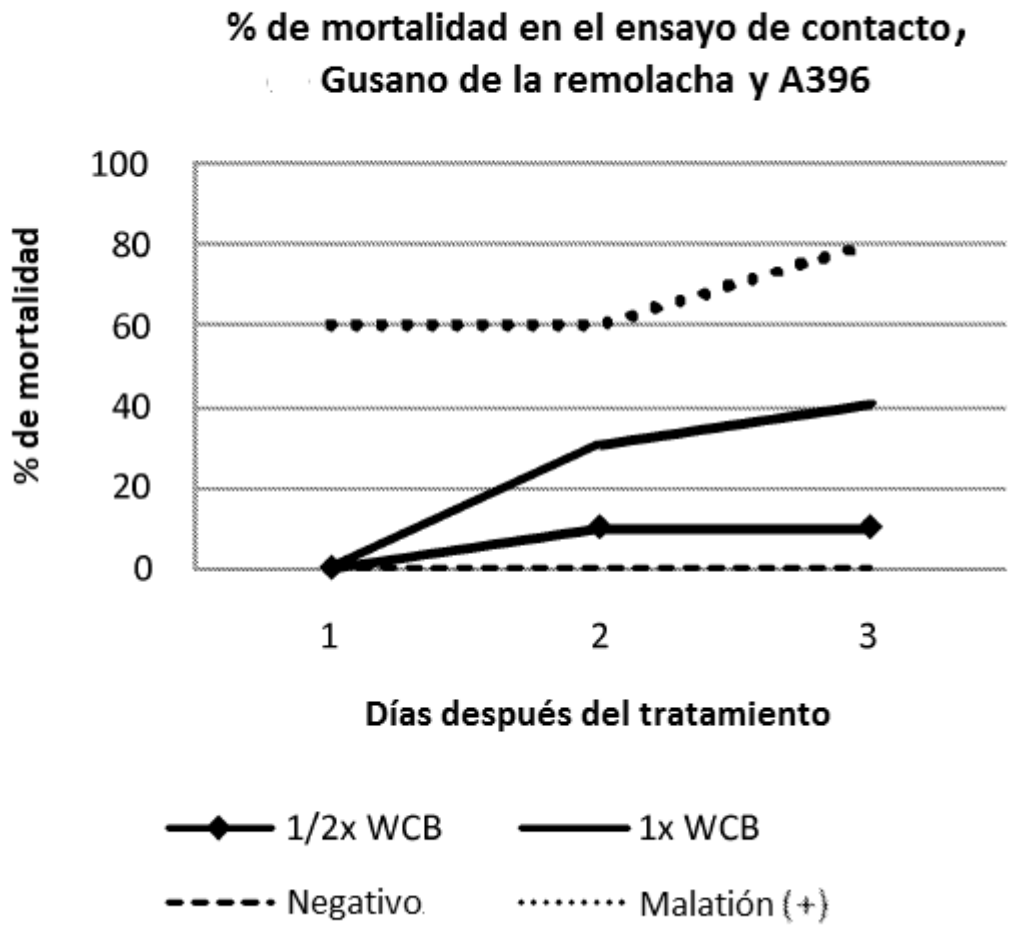
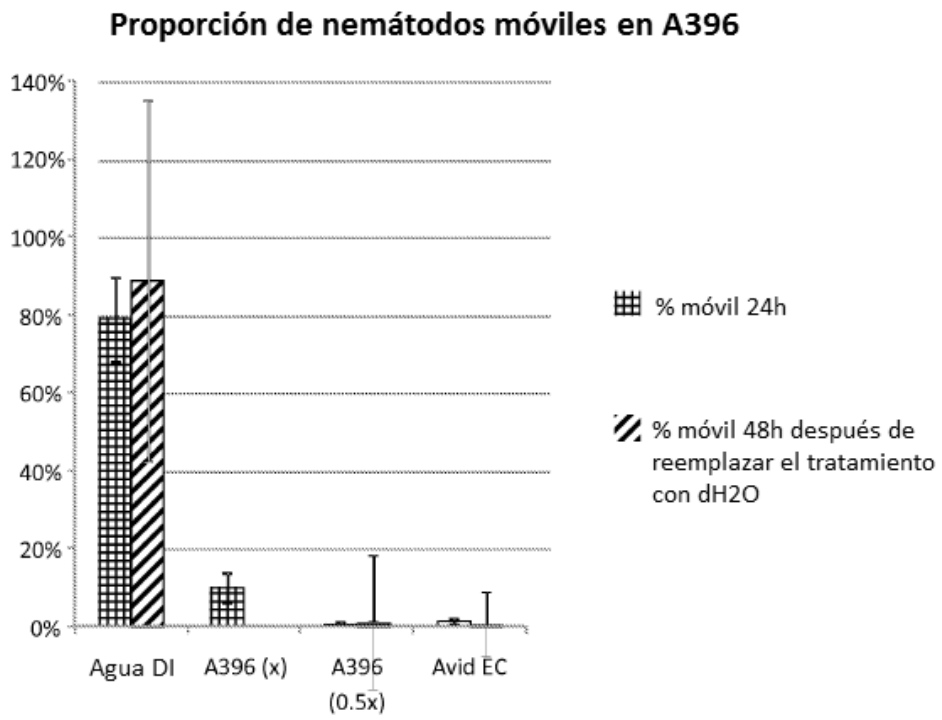
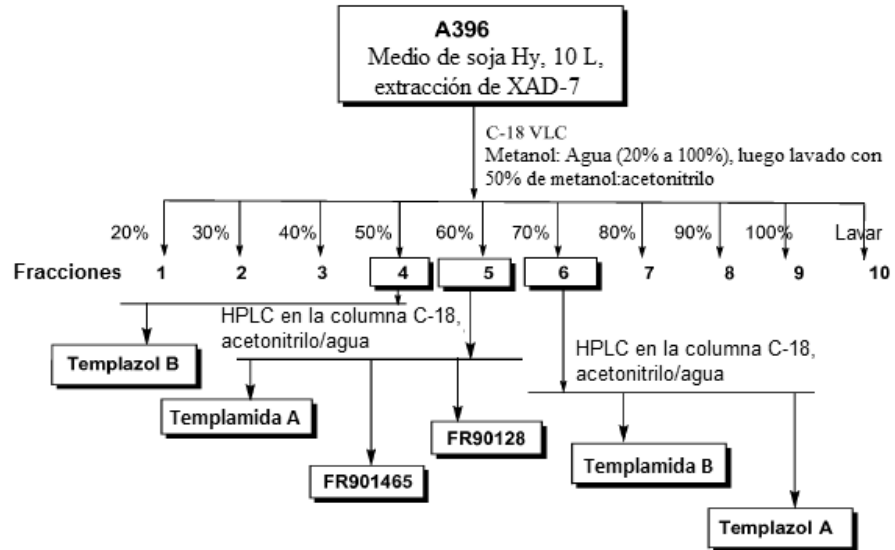


Figura 6



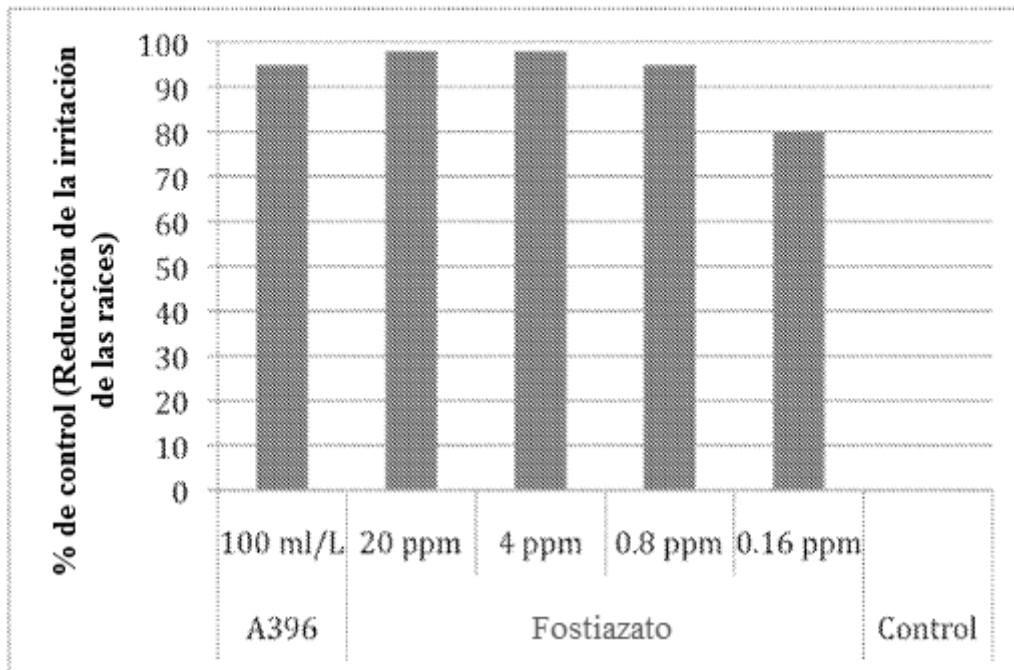
**Figura 7**



**Figura 8**



**Figura 9**





**Figura 10**

