

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 713 977**

51 Int. Cl.:

<b>C12N 1/20</b>	(2006.01)
<b>A01N 31/08</b>	(2006.01)
<b>A01N 63/02</b>	(2006.01)
<b>A01N 35/04</b>	(2006.01)
<b>A01P 5/00</b>	(2006.01)
<b>C12R 1/20</b>	(2006.01)
<b>C12P 7/26</b>	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.03.2013 PCT/US2013/030631**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **19.09.2013 WO13138398**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.03.2013 E 13761233 (9)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.01.2019 EP 2847318**

54 Título: **Cepa plaguicida de Flavobacterium y composiciones bioactivas, metabolitos y usos**

30 Prioridad:

**13.03.2012 US 201261609937 P**  
**05.12.2012 US 201261733730 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**24.05.2019**

73 Titular/es:

**MARRONE BIO INNOVATIONS, INC. (100.0%)**  
**1540 Drew Avenue**  
**Davis, CA 95618, US**

72 Inventor/es:

**CORDOVA-KREYLOS, ANA LUCIA;**  
**ASOLKAR, RATNAKAR;**  
**KOIVUNEN, MARJA;**  
**RODRIGUEZ, MARGARITA;**  
**XIN, LIJUAN y**  
**MARRONE, PAMELA**

74 Agente/Representante:

**INGENIAS CREACIONES, SIGNOS E**  
**INVENCIONES, SLP**

ES 2 713 977 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 plaguicida de *Flavobacterium* y composiciones bioactivas, metabolitos y usos

5 **Campo técnico**

En este documento se divulga una cepa plaguicida de *Flavobacterium* y composiciones bioactivas y metabolitos derivados de la misma, así como sus métodos de uso para controlar plagas y promover el crecimiento de las plantas, particularmente, la salud de las raíces.

10

**Antecedentes de la técnica**

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 la utilización de productos naturales con fines farmacéuticos. A pesar del énfasis de los productos naturales para agentes terapéuticos humanos, donde más de un 50 % se obtienen de productos naturales, únicamente un 11 % de los plaguicidas se obtienen de fuentes naturales. No obstante, los plaguicidas de producto natural tienen el potencial de desempeñar una función importante en el control de plagas en explotaciones agrícolas convencionales y orgánicas. Los metabolitos secundarios producidos por microbios (bacterias, actinomicetos y hongos) proporcionan compuestos químicos novedosos que pueden usarse en solitario o en combinación con compuestos conocidos para controlar de forma eficaz las plagas de insectos y para reducir el riesgo del desarrollo de resistencia. Hay varios ejemplos bien conocidos de productos naturales microbianos que son satisfactorios como insecticidas agrícolas (Thompson et al., 2000; Arena et al., 1995; Krieg et al., 1983).

15

20

25

El desarrollo de un plaguicida microbiano empieza con el aislamiento de un microbio en un cultivo puro. Entonces, continúa con el cribado de eficacia y espectro usando ensayos *in vitro*, *in vivo* o a escala piloto en un invernadero y en el campo. Al mismo tiempo, los compuestos activos producidos por el microbio se aíslan e identifican. Para la comercialización de un plaguicida microbiano, el microbio tiene que producirse económicamente por fermentación a una escala industrial y formularse con aditivos biocompatibles y aprobados para aumentar la eficacia y para maximizar la facilidad de aplicación.

30

Los nematodos son invertebrados de tipo gusano no segmentados, simétricos bilateralmente, que poseen una cavidad corporal y un sistema digestivo completo, pero carecen de sistema respiratorio y circulatorio. Su pared corporal contiene una cutícula de múltiples capas, una hipodermis con cuatro cuerdas longitudinales y musculatura interna (Chitwood, 2003). Sus contenidos corporales están ocupados principalmente por los sistemas digestivo y reproductor. Los nematodos pueden clasificarse como parasitarios o de vida libre. Los nematodos parasitarios pueden clasificarse por sus hospedadores (por ejemplo, parásitos de plantas). Los nematodos de vida libre pueden clasificarse de acuerdo con sus hábitos de alimentación e incluyen los siguientes grupos: (1) omnívoros; (2) alimentados por bacterias; (3) alimentados por hongos y (4) depredadores.

35

40

Los nematodos parasitarios de plantas generalmente se alimentan de partes enterradas de las plantas, tales como raíces, bulbos y tubérculos, así como partes por encima del suelo de las plantas, tales como hojas y tallos. Se ha estimado que las pérdidas anuales de cultivos causadas por nematodos parasitarios de plantas exceden los 100 mil millones de dólares americanos (Koenning et al., 1999). Los ejemplos de nematodos parasitarios de plantas incluyen, aunque sin limitación, nematodos que pertenecen a *Meloidogyne* spp. (por ejemplo, nematodos noduladores de la raíz); *Pratylenchus* spp. (por ejemplo, nematodos de lesión) *Heterodera* spp. (por ejemplo, nematodos del quiste); *Globodera* spp. (nematodos del quiste); *Ditylenchus* spp. (por ejemplo, nematodos de tallos y bulbos); *Tylenchulus* spp. (por ejemplo, nematodos de cítricos), *Xiphinema* spp. (por ejemplo, nematodos de daga), *Radopholus* spp. (nematodos cavadores); *Rotylenchulus* spp. (por ejemplo, nematodos reniformes); *Helicotylenchus* spp. y *Scutellonema* spp. (por ejemplo, nematodos espirales); *Belonolaimus* spp. (por ejemplo, nematodos de aguijón); *Bursaphelenchus* spp. (por ejemplo, nematodos del pino marchito); *Hoplolaimus* spp. (nematodos lanza), *Longidorus* spp. (nematodos aguja); *Nacobbus* spp. (nematodos noduladores de la raíz falsos); y *Aphelenchoides* spp. (nematodos foliares). El medio más eficaz para controlar los nematodos es mediante nematicidas que inhiben la eclosión de los huevos, la motilidad juvenil y/o la infectividad de las plantas. El desarrollo de un control químico para nematodos parasitarios de plantas es problemático a causa de razones ambientales y también fisiológicas: (1) la mayoría de los nematodos fitoparasitarios viven en una zona confinada en la tierra cerca de las raíces y, por tanto, el suministro de un nematicida químico es difícil y (2) la superficie exterior de los nematodos es una mala diana bioquímica, y es impermeable para muchas moléculas orgánicas (Chitwood, 2003). Además, el suministro de compuestos tóxicos mediante una vía oral es casi imposible porque la mayoría de las especies de nematodos parasitarias de plantas ingieren material únicamente después de haber penetrado e infectado las raíces de la planta. Por lo tanto, los nematicidas han tendido a ser toxinas de amplio espectro con alta volatilidad o con otras propiedades químicas y físicas que promueven su motilidad en la tierra.

45

50

55

60

65

Durante la pasada década, los hidrocarburos halogenados (por ejemplo, dibromuro de etileno, bromuro de metilo) han sido los nematicidas más usados en todo el mundo. Debido a su alta toxicidad en seres humanos y los efectos perjudiciales en la capa de ozono estratosférica, estos compuestos se prohibieron en el protocolo de Montreal, pero

- el uso de bromuro de metilo para el control de nematodos y patógenos de plantas se amplió en Estados Unidos debido a la ausencia de productos de sustitución. Junto con los organofosfatos, los carbamatos son los nematicidas no fumigantes más eficaces. Desafortunadamente, la mayoría de los carbamatos tales como aldicarb y oxamil son también muy tóxicos. A partir de agosto de 2010, el fabricante de aldicarb, Bayer, ha estado de acuerdo en cancelar todos los registros de producto en patatas y cítricos en Estados Unidos, y aldicarb será completamente retirado a final de agosto de 2018. Recientemente, abamectina - una mezcla de dos avermectinas producidas por un actinomiceto de la tierra, *Streptomyces avermitilis* - se ha registrado para uso nematicida (Faske y Starr, 2006). Syngenta comercializa este ingrediente activo como un tratamiento de semillas para algodón y hortalizas con la marca registrada Avicta®.
- Se ha informado de que varios patógenos microbianos de plantas/nematodos son activos contra nematodos parasitarios de plantas (Guerena, 2006). Estos agentes de control biológico incluyen las bacterias *Bacillus thuringiensis*, *Burkholderia cepacia*, *Pasteuria penetrans* y *P. usgae*. *Pasteuria Biosciences* ha lanzado *P. usgae* contra nematodos de aguijón de césped en el sureste de Estados Unidos. Los hongos nematicidas incluyen, aunque sin limitación, *Trichoderma harzianum*, *Hirsutella rhossiliensis*, *H. minnesotensis*, *Pochonia chlamydosporia* (sinónimo: *Verticillium chlamydosporum*), *Arthrobotrys dactyloides* y *Paecilomyces lilanicus* (comercializado como BioAct® y MeloCon® por Prophyta). Otros hongos, un hongo inactivado, *Myrothecium verrucaria* está disponible en una formulación comercial, DiTera®, por Valent Biosciences.
- Otros bionematicidas comerciales incluyen Deny® y Blue Circle® (*B. cepacia*), Activate® (*Bacillus chitinosporus*) (Quarles, 2005) y un producto israelí BioNem® (*Bacillus firmus*) (ahora comercializado por Bayer como tratamiento de semillas VOTIVO®) (Terefe et al., 2009). Se ha formulado la hipótesis de que el efecto perjudicial de aislados microbianos en la eclosión de huevos de nematodos, la motilidad juvenil y la infectividad puede atribuirse a toxinas producidas por estos organismos (Hallman y Sikora, 1996; Marrone et al., 1998; Siddiqui y Mahmood, 1999; Saxena et al., 2000; Meyer y Roberts, 2002), la capacidad de parasitar o incluso atrapar nematodos (Siddiqui y Mahmood, 1996; Kerry, 2001; Jaffee y Muldoon, 1995), la inducción de resistencia sistémica (Hasky-Gunther et al., 1998), el cambio del comportamiento de los nematodos (Sikora y Hoffman-Hergarter, 1993) o la interferencia con el reconocimiento de las plantas (Oostendorp y Sikora, 1990).
- Pueden usarse nematicidas botánicos tales como extractos vegetales y aceites esenciales para controlar los nematodos (Kokalis-Burrelle y Rodriguez-Kabana, 2006). Chitwood ha resumido las opciones del uso de compuestos derivados de plantas para el control de nematodos en este artículo de reciente revisión (Chitwood, 2002). Siddiqui y Alam (2001) demostraron que la tierra abonada modificada con partes de plantas del árbol neem (*Azadirachta indica*) y el árbol del paraíso (*Melia azadirah*) inhibía el desarrollo de nematodos noduladores de la raíz de los tomates. Sin embargo, actualmente no hay ningún producto de neem registrado en Estados Unidos para su uso contra nematodos. Un nuevo producto botánico de Chile (Nema-Q®) basado en un extracto del árbol *Quillaja saponaria* que contiene saponinas (derivados bidesmosídicos del ácido quilláico sustituido con trisacárido en C-3 y un oligosacárido en C-28) se ha registrado recientemente como nematicida orgánico a través de la EPA de EE. UU. y se ha catalogado para agricultura biológica por el Organic Materials Review Institute (OMRI). Está comercializado por Brandt.
- La rotación de cultivos a un cultivo no hospedador a menudo es adecuado por sí mismo para evitar que las poblaciones de nematodos alcancen niveles económicamente dañinos (Guerena 2006). Los aleloquímicos son compuestos producidos por plantas que afectan al comportamiento de organismos en el entorno de la planta. Ejemplos de aleloquímicos nematicidas incluyen polifenilos, glucosinolatos, alcaloides, lípidos, terpenoides, esteroides, triterpenoides y fenólicos (Kokalis-Burrelle y Rodriguez-Kabana, 2006; Chitwood, 2002). Cuando han crecido como cultivos de cobertura, los compuestos bioactivos de plantas alelopáticas se exudan durante el periodo de crecimiento y/o se liberan a la tierra durante la descomposición de la biomasa. Los cultivos de *Brassica* pueden usarse para la biofumigación, una estrategia de control de plagas basada en la liberación de compuestos volátiles biocidas durante la descomposición del tejido incorporado a la tierra (Kirkegaard y Sarwar, 1998). Sin embargo, los estudios de Roubtsova et al., (2007) sobre el efecto de tejido de brécol en descomposición en cantidades de *M. incognita* indicó que para un control apropiado, mediante mezcla del tejido vegetal con el volumen de tierra infectada con nematodos completo, era necesario.
- El futuro del control de nematodos en terrenos agrícolas depende de dos factores: el desarrollo de cultivos resistentes a nematodos y el descubrimiento y desarrollo de nuevos nematicidas menos tóxicos de amplio espectro. El coste de la investigación, desarrollo y registro de un nuevo nematicida químico es extremadamente elevado (>200 millones de dólares americanos), que limita su desarrollo. De los 497 nuevos ingredientes activos registrados para su uso como plaguicida desde 1967 a 1997, únicamente siete se registraron como nematicidas (Aspelin y Grube, 1999). Además de los métodos químicos convencionales, se ha propuesto la interferencia de ARN (iARN) como método para controlar los nematodos. El uso del silenciamiento génico mediante iARN se demostró por primera vez en *Caenorhabditis elegans* y bastante recientemente también para nematodos parasitarios de plantas tales como *Meloidogyne* spp. (Bakhetia et al., 2005). La búsqueda de nuevas cepas microbianas para su uso como fuentes para nematicidas biológicos es un objetivo importante para reducir el daño económico significativo causado por nematodos parasitarios de plantas, así como para reducir el uso de compuestos tóxicos actualmente registrados para el control de nematodos. De acuerdo con Sasser y Freckman (1987), las pérdidas de cultivos por nematodos varían de un 8 a un 20 % en cultivos principales en todo el mundo. Los nematodos parasitarios de plantas pueden causar un daño al cultivo considerable con pérdidas anuales estimadas en 87 000 millones de dólares americanos en todo el mundo (Dong y

Zhang, 2006). Los fumigantes tales como bromuro de metilo son muy eficaces en el control de enfermedades de plantas transmitidas por la tierra y de nematodos, pero debido a la alta toxicidad para mamíferos, los efectos reductores del ozono y otros efectos residuales, el uso de bromuro de metilo ya se ha prohibido en diversos países y se tiene planeada su retirada completa del mercado por acuerdo internacional (Oka et al., 2000). Las alternativas químicas tales como el yoduro de metilo, 1,3-dicloropropeno y cloropicrina también tienen problemas con la seguridad para los mamíferos y el medio ambiente. Los nematocidas no fumigantes químicos se están eliminando gradualmente y prohibiendo. Más recientemente, la EPA de EE UU anunció que aldicarb se estaba retirando gradualmente.

#### Usos de *Flavobacterium* y productos producidos por la misma

*Flavobacterium* sp., una bacteria gramnegativa, es un miembro de la familia *Flavobacteriaceae* (revisado en Bernardet et al., 2006a y 2006b). Se ha descubierto que especies de *Flavobacterium* son patógenas para peces, algas y organismos de la tierra. Se ha descubierto que *Flavobacterium* produce una diversidad de enzimas implicadas en la degradación de agar, alginato, quitina, pectina, xilano, queratina, laminarina. Por ejemplo, se cree que pueden producirse enzimas degradantes de polisacárido por *Flavobacterium*. Dichas enzimas pueden degradar la pared celular de, por ejemplo, diversos patógenos. *Flavobacterium* también puede producir proteasas. Recientemente, también se ha descubierto que *Flavobacterium* produce compuestos antifúngicos que pueden usarse para controlar patógenos del plátano.

Se ha descubierto que especies de *Flavobacterium* producen una diversidad de compuestos. Algunas especies de este género pueden oxidar una amplia gama de hidrocarburos aromáticos (véase, por ejemplo, Barnsley E. 1988).

Se descubrió que la fermentación de *Flavobacterium* sp. SC 12154 produce desacetoxicefalosprina C y una mezcla de cefalosporinas 7 sustituidas novedosas (Singh et al., 1984) que se informó que mostraban una actividad antibacteriana débil. Las flavocristamidas A y B, dos sulfonolípidos con actividad inhibitoria contra la ADN polimerasas  $\alpha$  se aislaron de una bacteria marina *Flavobacterium* sp. (Kobayashi et al., 1995) que se separó del bivalvo marino *Cristaria plicata*. El aislamiento e identificación de las quitinovorinas A, B y C, que pertenecen a la clase de antibióticos de  $\beta$ -lactama se informaron a partir del caldo de cultivo de *Flavobacterium chitinovorum* (Shoji et al., 1984). El antibiótico más fuertemente básico llamado quitinovorina D se aisló posteriormente de una *Flavobacterium* sp. PB-5246, junto con las quitinovorinas A, B y C conocidas (Shoji et al., 1985). Las sulfobacinas A y B, antagonistas novedosos del receptor del factor de von Willebrand (vWF), se aislaron del caldo de cultivo de *Chysoebacterium* sp. presentado posteriormente como *Flavobacterium* sp. NR 2993 (Kamiyama et al., 1995). Se aislaron nuevos sulfatos de carotenoide polares de la bacteria marina, cepa PC-6, identificada como una *Flavobacterium* sp., y se asignaron como (2R, 3S, 2'R, 3'R)-4-cetonostoxantina-3'-sulfato y (2R, 3S, 2'R, 3'R)-nostoxantina-3-sulfato (Yokoyama et al., 1996). La estructura química del lípido A del componente lipopolisacárido aislado de *Flavobacterium meningosepticum* IFO 12535 (Kato et al., 1998) se dilucidó basándose en espectroscopia de masas y modificación química. Se aisló un monoacildiglicosil-monoacilglicerol novedoso de la bacteria gramnegativa *Flavobacterium marinotypicum* ATCC 19260 junto con otros glucolípidos y fosfolípidos (Yagi y Maruyama, 1999). Se descubrió que la bacteria ártica de la *Cytophaga-Flavobacterium-bacteroides* producía varios compuestos orgánicos volátiles (Dickschat et al., 2005), que se denominaron metil cetonas. Las metil cetonas eran alifáticas saturadas o insaturadas, y contienen 12-18 átomos de carbono, a veces con ramificaciones de metilo terminales.

Además de los metabolitos anteriores, los otros compuestos conocidos del género *Flavobacterium* sp. son mixol (Yokoyama et al., 1995), un compuesto que pertenece a la clase de carotenoides, que se ha informado previamente de algas verde azuladas *Oscillatoria limosa* (Francis et al., 1970); decaprenoxantina, el carotenoide C<sub>50</sub> bicíclico dial de *Flavobacterium dehydrogenans* (Liaaen - Jensen, et al., 1968), que posteriormente se sintetizó debido a su interesante estructura (Ferezou y Julia, 1985).

Además, una *Flavobacterium* sp. productora de biotensioactivo, cepa MTN11 (número de acceso AY162137) aislada de muestra de terreno árido, también se ha descubierto que produce flavolípidos que son muy polares y son buenos emulsionantes (Bodour, 2004). Ejemplos incluyen artrobactina y aerobactina. Se ha sugerido que estos flavolípidos podrían usarse en tierra contaminada para mitigar la toxicidad por metales durante la biodegradación orgánica (Kaplan y Kitts, 2004). Específicamente, Kaplan y Kitts (2004), descubrieron que organismos atribuidos a *Flavobacterium* spp. y *Pseudomonas* spp. a partir de la secuencia génica de ARNr 16S estaban presentes en tierra contaminada con hidrocarburos del petróleo particularmente durante la fase de degradación de estos hidrocarburos del petróleo.

#### Breve resumen

En este documento se proporcionan composiciones que comprenden (a) una primera sustancia seleccionada del grupo que consiste en un cultivo sustancialmente puro, caldo de células completas y sobrenadante derivado de fermentación de *Flavobacterium* sp. H492 (n.º de acceso a NRRL B-50584) y (b) un vehículo, diluyente, tensioactivo o adyuvante; métodos que usan dichas composiciones, así como un método de obtención de policétidos a partir de dicha cepa.

La cepa de *Flavobacterium* spp. puede tener las siguientes características:

(A) una secuencia génica de ARNr 16S que comprende la secuencia directa que tiene al menos un 99 % de

identidad con la secuencia expuesta en la SEQ ID NO:3 y una secuencia inversa que tiene al menos un 99 % de identidad con la secuencia expuesta en la SEQ ID NO:4 y una secuencia consenso que tiene al menos un 99 % de identidad con la secuencia expuesta en la SEQ ID NO:5;

(B) actividad plaguicida;

5 (C) modulación del crecimiento y particularmente actividad promotora del crecimiento;

(D) produce un compuesto plaguicida que tiene las siguientes propiedades: (1) tiene una masa molecular de aproximadamente 150-195 determinada por cromatografía de líquidos/espectroscopia de masas (CL/EM); (2) tiene valores de RMN de <sup>1</sup>H de δ 7,60, 7,52, 6,83, 6,68, 2,74, 1,14 y tiene valores de RMN de <sup>13</sup>C de 203,96, 161,90, 145,11, 131,78, 131,78, 127,28, 123,83, 117,24, 117,24, 34,52, 8,89; (3) tiene un tiempo de retención en cromatografía de líquidos a alta presión (HPLC) de aproximadamente 8-14 minutos, y una columna de HPLC C-18 en fase (Phenomenex, Luna 5/4 C18(2) 100 A, 100 x 4,60 mm) usando agua:acetonitrilo (CH<sub>3</sub>CN) con un sistema disolvente en gradiente (0-20 min; 90-0 % de CH<sub>3</sub>CN acuoso, 20-24 min; 100 % de CH<sub>3</sub>CN, 24-27 min; 0-90 % de CH<sub>3</sub>CN acuoso, 27-30 min; 90 % de CH<sub>3</sub>CN acuoso) a caudal de 0,5 ml/min y detección de UV de 210 nm;

10 (A) es no patógeno para animales vertebrados;

15 (F) es susceptible a tetraciclina, eritromicina, estreptomina, penicilina, ampicilina, oxitetraciclina, cloranfenicol, ciprofloxacina, gentamicina, piperacilina, imipenem y sulfametoxazol-trimetoprim.

De acuerdo con la invención, la especie de *Flavobacterium* es una cepa de *Flavobacterium* que tiene las características identificativas de *Flavobacterium* sp. H492 (n.º de acceso a NRRL B-50584).

20 También se proporciona un cultivo sustancialmente puro o caldo de células completas que comprende dicha cepa o fracción celular y/o sobrenadante derivado de dicha cepa de *Flavobacterium*.

Se proporciona además una composición que comprende dicho cultivo sustancialmente puro o caldo de células completas que comprende dicha cepa o fracción celular y/o sobrenadante derivado de esta cepa de *Flavobacterium* y un vehículo, diluyente, tensioactivo, un vehículo, tensioactivo o adyuvante.

25 Por tanto, se proporciona en este documento un método para controlar la infestación por plagas en una planta, que comprende aplicar a una planta y/o semillas de la misma y/o sustrato usado para cultivar dicha planta, una cantidad de un cultivo sustancialmente puro, caldo de células completas que comprende la cepa de especie de *Flavobacterium* H492, o fracción celular y/o sobrenadante, derivado de dicha cepa de especie de *Flavobacterium* o el compuesto 1-(4-hidroxifenil)pent-1-en-3-ona en una cantidad eficaz para modular dicha infestación por plagas. En una realización particular, la plaga es un nematodo. En una realización más particular, la plaga es un nematodo parasitario de plantas.

30 También se proporciona en este documento una combinación plaguicida sinérgica para al menos una plaga, que comprende como componentes activos: (a) cultivo sustancialmente puro, caldo de células completas que comprende una cepa de especie de *Flavobacterium* H492 o fracción celular y/o sobrenadante derivado de dicha cepa o derivado de dicho cultivo sustancialmente puro o caldo de células completas que comprende dicha cepa de especie de *Flavobacterium* y (b) otra sustancia plaguicida, en la que (a) y (b) están presentes en cantidades sinérgicas. La plaga, en una realización particular, puede ser un nematodo, pero también puede incluir, aunque sin limitación, una plaga de insectos, hongo de plantas, virus de plantas y bacteria de plantas y malezas. Además, la combinación puede ser una composición. La otra sustancia plaguicida puede ser (a) derivada de un microorganismo; (b) un producto natural y/o (b) un plaguicida químico y en particular un insecticida o nematicida químico.

35 En un aspecto relacionado, en este documento se proporciona un método para modular de forma sinérgica la infestación de al menos una plaga o especie de plaga en o sobre una planta, que comprende aplicar a una planta y/o semillas de la misma y/o sustrato para cultivar dicha planta, las combinaciones expuestas anteriormente con una cantidad de la combinación eficaz para modular la infestación de dicha plaga o especie de plaga. También se divulgan en este documento compuestos aislados que se pueden obtener o derivar de especies de *Flavobacterium*, o como alternativa, organismos que pueden producir estos compuestos que pueden usarse para controlar diversas plagas y/o también particularmente, plagas nematicidas.

40 Se proporciona además un método para promover el crecimiento en una planta (por ejemplo, cultivos tales como frutales (por ejemplo, fresa, plátano, sandía, bayas), verduras (por ejemplo, tomate, pepino, calabaza, pimiento, berenjena) o cultivos en hilera (por ejemplo, soja, trigo, arroz, maíz, algodón, cacahuete, patata), árboles (por ejemplo, pinos), flores, plantas ornamentales, arbustos (por ejemplo, rosales), plantas de bulbo (por ejemplo, cebolla, ajo), césped (por ejemplo, Bermudagrass, pasto azul de Kentucky, festucas) o viñas (por ejemplo, vid) que comprende aplicar a una planta y/o semillas de la misma y/o sustrato usado para cultivar dicha planta, una cantidad de cultivo sustancialmente puro o caldo de células completas que comprende dicha cepa, o fracción celular y/o sobrenadante derivado de dicha cepa de especie de *Flavobacterium* o 1-(4-hidroxifenil)pent-1-en-3-ona y opcionalmente otra sustancia promotora del crecimiento que modula y en particular promueve el crecimiento por, por ejemplo, modulación o en particular, por promoción del establecimiento de las raíces en dicha planta.

45 En un aspecto relacionado, en este documento se proporciona un método para modular de forma sinérgica el crecimiento de una planta, que comprende aplicar a una planta y/o semillas de la misma y/o sustrato para cultivar dicha planta, las combinaciones expuestas anteriormente con una cantidad de la combinación eficaz para modular el crecimiento de dicha planta. También se divulgan en este documento compuestos aislados que se pueden obtener o

derivar de especies de *Flavobacterium*, o como alternativa, organismos que pueden producir estos compuestos que pueden usarse para controlar el crecimiento de dichas plantas.

5 El cultivo sustancialmente puro o caldo de células completas que comprende dicha cepa de una especie de *Flavobacterium* o fracción celular y/o sobrenadante derivado de dicha cepa o 1-(4-hidroxifenil)pent-1-en-3-ona puede aplicarse a las raíces de una planta antes de trasplantarla a la tierra, así como las partes por encima del suelo de la planta. Por tanto, se proporciona un método para modular la extensión de las raíces y los brotes en una planta, que comprende: (a) tratar una o más raíces y brotes de una planta con dicho cultivo, caldo de células completas y/o sobrenadante o 1-(4-hidroxifenil)pent-1-en-3-ona derivado de dicha *Flavobacterium* sp. y opcionalmente otra sustancia  
10 promotora del crecimiento en una cantidad eficaz para modular la prolongación de las raíces y los brotes cuando se trasplanta a la tierra; (b) trasplantar la planta tratada de (a) a la tierra.

15 En un aspecto relacionado, también se proporciona el uso de un cultivo sustancialmente puro o caldo de células completas que comprende o fracción celular y/o sobrenadante derivado de dicha cepa de especie de *Flavobacterium* o 1-(4-hidroxifenil)pent-1-en-3-ona y opcionalmente otra sustancia promotora del crecimiento o agente para modular el crecimiento en una planta y particularmente para modular la prolongación de las raíces. Además, en un aspecto relacionado, se proporciona una combinación para el uso de un cultivo sustancialmente puro o caldo de células completas que comprende dicha cepa o fracción celular y/o sobrenadante derivado de dicha cepa de especie de *Flavobacterium* o dicho cultivo o caldo de células completas o 1-(4-hidroxifenil)pent-1-en-3-ona en la modulación del  
20 crecimiento en una planta por, por ejemplo, la modulación y en particular, el aumento de la biomasa de una planta, altura de una planta, número de raíces, peso de las raíces, que comprende un sobrenadante de dicha cepa de *Flavobacterium* sp. o 1-(4-hidroxifenil)pent-1-en-3-ona y opcionalmente otra sustancia promotora del crecimiento o agente para modular el crecimiento en una planta. La combinación puede ser una combinación sinérgica.

25 También se proporciona un uso de un cultivo sustancialmente puro o caldo de células completas que comprende la especie de *Flavobacterium* H492 o fracción celular y/o sobrenadante derivado de dicha cepa de especie de *Flavobacterium* o 1-(4-hidroxifenil)pent-1-en-3-ona y opcionalmente otra sustancia promotora del crecimiento que modula la germinación de una semilla en una planta, en el que dicha planta incluye, aunque sin limitación, cultivos tales como frutales (por ejemplo, fresa), verduras (por ejemplo, tomate, pepino, calabaza, pimiento, berenjena) o  
30 cultivos en hilera (por ejemplo, soja, trigo, arroz, maíz, algodón, cacahuete, patata), árboles (por ejemplo, pinos), flores, plantas ornamentales, arbustos (por ejemplo, rosales), césped (por ejemplo, Bermudagrass, pasto azul de Kentucky, festucas), plantas de bulbo (por ejemplo, cebolla, ajo) o viñas (por ejemplo, vid) para modular dicha germinación. En un aspecto relacionado, se proporciona un método para modular la germinación de una semilla en una planta tratando dicha planta con una cantidad de un cultivo sustancialmente puro o caldo de células completas que comprende una  
35 cepa de la especie de *Flavobacterium* H492 o fracción celular y/o sobrenadante derivado de dicha cepa de especie de *Flavobacterium* o 1-(4-hidroxifenil)pent-1-en-3-ona y opcionalmente otra sustancia promotora del crecimiento en una planta eficaz para modular dicha germinación de una semilla en una planta. La semilla en una realización particular puede ser una semilla modificada genéticamente.

40 En un aspecto relacionado, también se proporciona una combinación para su uso en la modulación de la germinación de una semilla en una planta, que comprende un cultivo sustancialmente puro o caldo de células completas que comprende la especie de *Flavobacterium* H492 o fracción celular y/o sobrenadante derivado de especie de *Flavobacterium* H492 o 1-(4-hidroxifenil)pent-1-en-3-ona que modula la germinación de una semilla en una planta y  
45 opcionalmente al menos una de una segunda sustancia, en la que dicha segunda sustancia es un agente de recubrimiento de semillas. La combinación puede ser una combinación sinérgica.

El compuesto 1-(4-hidroxifenil)pent-1-en-3-ona puede obtenerse por (a) cultivo de una cepa de *Flavobacterium* en un medio de cultivo en condiciones suficientes para producir dicho compuesto para obtener un cultivo de *Flavobacterium* y (b) aislamiento de dicho compuesto producido en (a) del caldo de células completas de (a). En particular, el  
50 compuesto de la etapa (b) puede aislarse por (i) aplicación del caldo de células completas a al menos una de una columna de intercambio iónico, una columna de exclusión molecular o una columna de HPLC en fase inversa para obtener fracciones de columna; (ii) ensayo de las fracciones de columna para la actividad plaguicida y (iii) concentración de las fracciones de columna de (ii) para obtener el compuesto aislado. Como alternativa, el compuesto puede obtenerse por síntesis química y puede usarse como un compuesto puro y/o también como un producto en  
55 bruto.

**Breve descripción de las figuras**

- La FIG. 1 muestra la respuesta a dosis para caldo de células completas H492 y el marcador de tasa avid usando bioensayo de inmotilidad en agar con agua de 6 pocillos.
- 5 La FIG. 2 muestra el peso de brotes frescos (barras negras) y el peso de raíces frescas (barras con líneas verticales) de plantas de pepino usadas en el ensayo de tubo de 50 ml y tratadas con diferentes concentraciones de caldo de células completas H492.
- La FIG. 3 muestra el índice de agallas de raíces de pepino tratadas con diferentes dosis de caldo de células completas de H492 dos semanas después de inoculación con *Meloidogyne incognita*.
- 10 La FIG. 4 muestra las agallas/gramo de raíz de raíces de pepino tratadas con diferentes dosis de caldo de células completas de H492 dos semanas después de inoculación con *M. incognita*.
- La FIG. 5 muestra el efecto de caldo de células completas de *Flavobacterium* sp. H492 (MBI-302) sobre nematodos noduladores de las raíces (*Meloidogyne incognita*, *Dorylaimus* spp. y otros nematodos no parasitarios en 100 ml de tierra en la recolección en el ensayo de pepino.
- 15 La FIG. 6 muestra el efecto de caldo de células completas de *Flavobacterium* sp. H492 (MBI-302) sobre nematodos noduladores de las raíces (*Meloidogyne incognita*) y nematodos no parasitarios en raíces de pepino (raíces totales) en la recolección.
- La FIG. 7 muestra el efecto de caldo de células completas de *Flavobacterium* sp. H492 (MBI-302) sobre nematodos noduladores de las raíces (*Meloidogyne incognita*) y nematodos no parasitarios en raíces de pepino (por gramo) en la recolección.
- 20 La FIG. 8 muestra el efecto de caldo de células completas de *Flavobacterium* sp. H492 (MBI-302) sobre el índice de agallas y el número de agallas de nematodos noduladores de las raíces (*Meloidogyne incognita*) en raíces pepino en la recolección.
- La FIG. 9 muestra el efecto de caldo de células completas de *Flavobacterium* sp. H492 (MBI-302) sobre la biomasa de planta de pepino y el vigor en la recolección en el ensayo de nematodos noduladores de las raíces (*Meloidogyne incognita*) con pepino.
- 25 La FIG. 10 muestra el efecto de caldo de células completas de *Flavobacterium* sp. H492 (MBI-302) sobre nematodos reniformes (*Rotylenchulus reniformis*, *Dorylaimus* spp. y otros nematodos no parasitarios en tierra en el ensayo de pepino.
- 30 La FIG. 11 muestra el efecto de caldo de células completas de *Flavobacterium* sp. H492 (MBI-302) sobre nematodos reniformes (*Rotylenchulus reniformis*) y nematodos no parasitarios en raíces de pepino (raíces totales) en la recolección.
- La FIG. 12 muestra el efecto de caldo de células completas de *Flavobacterium* sp. H492 (MBI-302) sobre nematodos reniformes (*Rotylenchulus reniformis*) y nematodos no parasitarios en raíces de pepino (por gramo de raíz) en la recolección.
- 35 La FIG. 13 muestra el efecto de caldo de células completas de *Flavobacterium* sp. H492 (MBI-302) sobre la biomasa de planta de pepino y el vigor en la recolección en el ensayo de nematodos reniformes (*Rotylenchulus reniformis*) con pepino.
- La FIG. 14 muestra el efecto de caldo de células completas de *Flavobacterium* sp. H492 (MBI-302) sobre nematodos de lesión de raíces (*Pratylenchus* spp.), nematodos espirales (*Helicotylenchulus* spp), nematodos de raíz voluminosa (*Paratrichodorus* spp.), *Dorylaimus* spp. y otros nematodos no parasitarios en el ensayo de maíz.
- 40 La FIG. 15 muestra el efecto de caldo de células completas de *Flavobacterium* sp. H492 (MBI-302) sobre nematodos de lesión de raíces (*Pratylenchus* spp.), nematodos espirales (*Helicotylenchulus* spp.) y nematodos no parasitarios en raíces de maíz (raíces totales) en la recolección con maíz.
- 45 La FIG. 16 muestra el efecto de caldo de células completas de *Flavobacterium* sp. H492 (MBI-302) sobre nematodos de lesión de raíces (*Pratylenchus* spp.), nematodos espirales (*Helicotylenchulus* spp.) y nematodos no parasitarios en raíces de maíz (por gramo de raíz) en la recolección en el ensayo de maíz.
- La FIG. 17 muestra el efecto de caldo de células completas de *Flavobacterium* sp. H492 (MBI-302) sobre la biomasa de planta de maíz y el vigor en la recolección en el ensayo de nematodo de lesión de la raíz (*Pratylenchus* spp.) con maíz.
- 50 La FIG. 18 muestra el efecto de caldo de células completas de *Flavobacterium* sp. H492 (MBI-302) sobre nematodos de los quistes de la soja (*Heterodera glycines*) en el ensayo de soja.
- La FIG. 19 muestra el efecto de caldo de células completas de *Flavobacterium* sp. H492 (MBI-302) y agua sobre nematodos no parasitarios en el ensayo de soja.
- 55 La FIG. 20 es una representación esquemática del esquema de purificación para obtener los compuestos de la invención del caldo de cultivo.
- La FIG. 21 y 22 representan los resultados de bioensayos de diversas fracciones de H492 (MBI-302).
- La FIG. 23 muestra el efecto de la respuesta a dosis de H492 (MBI-302) sobre el % de inmovilización (inmotilidad).
- La FIG. 24 muestra el efecto de policétido 1 sobre el número de agallas/raíz.
- 60 La FIG. 25 muestra el efecto de policétido 1 sobre el índice de agallas.
- La FIG. 26 muestra el efecto de policétido 1 sobre el peso superior fresco.

**Descripción detallada de la invención**

- 65 Salvo que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo significado que el comprendido habitualmente por un experto en la materia a la que pertenece esta invención.

Debe apreciarse que, como se usa en este documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un/uno", "una" y "el", "la" incluyen referencias plurales salvo que el contexto indique claramente lo contrario.

- 5 Como se define en este documento, "derivado de" significa aislado u obtenido directamente de una fuente particular o como alternativa que tiene características identificadoras de una sustancia u organismo aislado u obtenido de una fuente particular. En el caso de que la "fuente" sea un organismo, "derivado de" significa que puede aislarse u obtenerse del propio organismo o medio usado para cultivar o hacer crecer dicho organismo.
- 10 Como se define en este documento, "caldo de cultivo completo" o "caldo de células completas" se refiere a un cultivo líquido que contiene tanto células como medio. Si se cultivan bacterias en una placa, las células pueden recogerse en cultivo completo acuoso u otro líquido. Las expresiones "caldo de cultivo completo" y "caldo de células completas" se usan indistintamente.
- 15 Como se define en este documento, "sobrenadante" se refiere al líquido que queda cuando las células crecen en caldo o se recogen en otro líquido de una placa de agar y se retiran por centrifugación, filtración, sedimentación u otro medio bien conocido en la técnica.
- 20 Como se define en este documento, "filtrado" se refiere al líquido de un cultivo de caldo completo que se ha pasado a través de una membrana.
- Como se define en este documento, "extracto" se refiere a la sustancia líquida retirada de las células por un disolvente (agua, detergente, tampón, disolvente orgánico) y separado de las células por centrifugación, filtración u otro método.
- 25 Como se define en este documento, "metabolito" se refiere a un compuesto, sustancia o subproducto de una fermentación de un microorganismo, o sobrenadante, filtrado o extracto obtenido de un microorganismo que tiene actividad plaguicida y, particularmente, actividad nematocida.
- 30 Como se define en este documento, un "compuesto aislado" está esencialmente libre de otros compuestos o sustancias, por ejemplo, al menos aproximadamente un 20 % puro, preferiblemente al menos aproximadamente un 40 % puro, más preferiblemente aproximadamente un 60 % puro, incluso más preferiblemente aproximadamente un 80 % puro, mucho más preferiblemente aproximadamente un 90 % puro, e incluso mucho más preferiblemente aproximadamente un 95 % puro, determinado por métodos analíticos, incluyendo, aunque sin limitación, métodos cromatográficos, métodos electroforéticos. Un compuesto "derivado de" una especie de *Flavobacterium* también abarca un metabolito.
- 35 Como se define en este documento, "vehículo" es un material orgánico o inorgánico inerte, con el que se mezcla el ingrediente activo o se formula para facilitar su aplicación a la planta u otro objeto a tratar, o su almacenamiento, transporte y/o manipulación.
- 40 Como se define en este documento, "modular", se usa para indicar la alteración de la cantidad de infestación por la plaga, crecimiento de la planta, extensión de las raíces, germinación de las semillas o tasa de propagación de la infestación de la plaga, tasa de crecimiento de la planta, tasa de extensión de las raíces, tasa de germinación de las semillas.
- 45 Como se define en este documento, "infestación de la plaga", es la presencia de una plaga en una cantidad que causa un efecto dañino, incluyendo una enfermedad o afección en una población hospedadora o la aparición de maleza indeseada en un sistema de cultivo.
- 50 Como se define en este documento, "plaguicida" es una sustancia derivada de un producto biológico o sustancia química que aumenta la mortalidad o inhibe la tasa de crecimiento de las plagas de plantas e incluye, aunque sin limitación, nematocidas, alguicidas, herbicidas, insecticidas, fungicidas de plantas, bactericidas de plantas y viricidas de plantas.
- 55 Como se define en este documento, un "nematodo parasitario de planta" es un nematodo que se alimenta sobre y causa lesión sobre cualquier parte de una planta.
- 60 Como se define en este documento, "un nematodo no parasitario" es un nematodo que existe independientemente en el terreno y no causa daños o lesión a ninguna parte de una planta.
- 65 Como se define en este documento, el término "alquilo" se refiere a un grupo hidrocarbonado de cadena lineal o ramificada monovalente que tiene de uno a aproximadamente 12 átomos de carbono, incluyendo metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, *terc*-butilo, *n*-hexilo, y similares.
- Como se define en este documento, "alquilo sustituido" se refiere a grupos alquilo que albergan además uno o más sustituyentes seleccionados de hidroxilo, alcoxi, mercapto, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, heterociclilo, heterociclilo

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.

5 Como se define en este documento, "alquenilo" se refiere a grupos hidrocarbonado de cadena lineal o ramificada que tienen uno o más dobles enlaces carbono-carbono y que tienen en el intervalo de aproximadamente 2 hasta 12 átomos de carbono, y "alquenilo sustituido" se refiere a grupos alquenilo que albergan además uno o más sustituyentes expuestos anteriormente.

10 Como se define en este documento, "alquinilo" se refiere a grupos hidrocarbonado de cadena lineal o ramificada que tiene al menos un triple enlace carbono-carbono y que tiene en el intervalo de aproximadamente 2 hasta 12 átomos de carbono, y "alquinilo sustituido" se refiere a grupos alquinilo que albergan además uno o más sustituyentes expuestos anteriormente.

15 Como se define en este documento, "arilo" se refiere a grupos aromáticos que tienen en el intervalo de 6 hasta 14 átomos de carbono y "arilo sustituido" se refiere a grupos arilo que albergan además uno o más sustituyentes expuestos anteriormente.

20 Como se define en este documento, "heteroarilo" se refiere a anillos aromáticos que contienen uno o más heteroátomos (por ejemplo, N, O, S o similares) como parte de la estructura del anillo, y que tienen en el intervalo de 3 hasta 14 átomos de carbono, y "heteroarilo sustituido" se refiere a grupos heteroarilo que albergan además uno o más sustituyentes expuestos anteriormente.

25 Como se define en este documento, "alcoxi" se refiere al resto --O-alkilo-, en el que alkilo como se define anteriormente, y "alcoxi sustituido" se refiere a grupos alcoxi que albergan además uno o más sustituyentes expuestos anteriormente.

30 Como se define en este documento, "tioalquilo" se refiere al resto --S-alkilo-, en el que alkilo como se define anteriormente, y "tioalquilo sustituido" se refiere a grupos tioalquilo que albergan además uno o más sustituyentes expuestos anteriormente.

35 Como se define en este documento, "cicloalquilo" se refiere a grupos alkilo que contienen anillo que contienen en el intervalo de aproximadamente 3 hasta 8 átomos de carbono, y "cicloalquilo sustituido" se refiere a grupos cicloalquilo que albergan además uno o más sustituyentes expuestos anteriormente.

40 Como se define en este documento, "heterociclilo", se refiere a grupos cíclicos (es decir, que contienen anillo) que contienen uno o más heteroátomos (por ejemplo, N, O, S o similares) como parte de la estructura del anillo, y que tienen en el intervalo de 3 hasta 14 átomos de carbono, y "heterociclilo sustituido" se refiere a grupos heterocíclicos que albergan además uno o más sustituyentes expuestos anteriormente.

#### 40 Sustancias

Las sustancias usadas en las composiciones y métodos expuestos anteriormente se obtienen de la cepa de *Flavobacterium* H492 (n.º de acceso a NRRL B-50584). Como se define en este documento, "derivado de" u "obtenido de" significa que un compuesto puede aislarse de o producirse por un cultivo celular, caldo de células completas, filtrado, sobrenadante, fracción o extracto. Por tanto, un compuesto derivado de una especie o cepa de *Flavobacterium* también incluye un compuesto aislado o producido por dicha especie o cepa. Un compuesto "producido por" un cultivo celular, caldo de células completas, filtrado, sobrenadante, fracción celular o extracto también puede mencionarse como "un metabolito". El extracto "derivado de" una cepa de *Flavobacterium* puede obtenerse no solamente de un cultivo celular o caldo de células completas, sino también de un filtrado, sobrenadante, extracto o fracción celular derivada de dicho caldo de células completas o cultivo celular.

En una realización particular, la cepa de *Flavobacterium* spp. puede tener las siguientes características:

55 (A) una secuencia génica de ARNr 16S que comprende la secuencia directa que tiene al menos un 99 % de identidad con la secuencia expuesta en la SEQ ID NO:3 y una secuencia inversa que tiene al menos un 99 % de identidad con la secuencia expuesta en la SEQ ID NO:4 y una secuencia consenso que tiene al menos un 99 % de identidad con la secuencia expuesta en la SEQ ID NO:5;

(B) actividad plaguicida;

(C) modulación del crecimiento y particularmente actividad promotora del crecimiento;

60 (D) produce un compuesto plaguicida que tiene las siguientes propiedades: (1) tiene una masa molecular de aproximadamente 150-195 determinada por cromatografía de líquidos/espectroscopia de masas (CL/EM); (2) tiene valores de RMN de <sup>1</sup>H de δ 7,60, 7,52, 6,83, 6,68, 2,74, 1,14 y tiene valores de RMN de <sup>13</sup>C de 203,96, 161,90, 145,11, 131,78, 131,78, 127,28, 123,83, 117,24, 117,24, 34,52, 8,89; (3) tiene un tiempo de retención en cromatografía de líquidos a alta presión (HPLC) de aproximadamente 8-14 minutos, en una columna de HPLC C-18 en fase (Phenomenex, Luna 5 μ C18(2) 100 A, 100 x 4,60 mm) usando agua:acetonitrilo (CH<sub>3</sub>CN) con un sistema disolvente en gradiente (0-20 min; 90-0 % de CH<sub>3</sub>CN acuoso, 20-24 min; 100 % de CH<sub>3</sub>CN, 24-27 min; 0-

90 % de CH<sub>3</sub>CN acuoso, 27-30 min; 90 % de CH<sub>3</sub>CN acuoso) a caudal de 0,5 ml/min y detección de UV de 210 nm; (E) es no patógeno para animales vertebrados; (F) es susceptible a tetraciclina, eritromicina, estreptomina, penicilina, ampicilina, oxitetraciclina, cloranfenicol, ciprofloxacina, gentamicina, piperacilina, imipenem y sulfametoxazol-trimetoprim.

5 La especie de *Flavobacterium* es una cepa de *Flavobacterium* H492 (n.º de acceso a NRRL B-50584).

10 También se proporciona una composición que comprende dicho cultivo sustancialmente puro o caldo de células completas o fracción celular y/o sobrenadante derivado de esta cepa de *Flavobacterium* y un vehículo, diluyente, tensioactivo, un vehículo, tensioactivo o adyuvante.

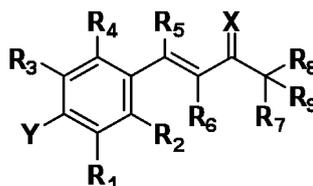
15 Los compuestos de policétido pueden obtenerse de dicha cepa de *Flavobacterium*, y pueden ser un compuesto que (a) tiene actividad plaguicida; (b) tiene una masa molecular de aproximadamente 150-195 determinada por cromatografía de líquido/espectroscopia de masas (CL/EM) y (c) tiene un tiempo de retención en cromatografía de líquidos de alta presión (HPLC) de aproximadamente 8-14 minutos en una columna de HPLC C-18 de fase inversa usando un sistema de disolvente en gradiente de agua:acetonitrilo (CH<sub>3</sub>CN) (0-20 min; 90 - 0 % de CH<sub>3</sub>CN acuoso, 20-24 min; 100 % de CH<sub>3</sub>CN, 24-27 min; 0-90 % de CH<sub>3</sub>CN acuoso, 27-30 min; 90 % de CH<sub>3</sub>CN acuoso) a caudal de 0,5 ml/min y detección de UV de 210 nm; y (d) se puede obtener de la especie de *Flavobacterium*.

20 En una realización particular, el compuesto tiene una estructura de policétido aromático hidroxilado que comprende al menos un resto de cetona, al menos un anillo aromático de 6 miembros, al menos un resto α,β insaturado, al menos un grupo hidroxilo, al menos un grupo metileno y al menos un grupo metilo; una masa molecular de 150 a aproximadamente 195 en la estructura el núcleo; al menos 9 carbonos y al menos 2 oxígenos.

25 El compuesto (a) se puede obtener de la especie de *Flavobacterium*; (b) es tóxico para una plaga; (c) tiene una masa molecular de aproximadamente 150-195 y más particularmente, 176 determinada por cromatografía de líquido/espectroscopia de masas (CL/EM); (d) tiene valores de RMN de <sup>1</sup>H de δ 7,60, 7,52, 6,83, 6,68, 2,74, 1,14 y tiene valores de RMN de <sup>13</sup>C de 203,96, 161,90, 145,11, 131,78, 131,78, 127,28, 123,83, 117,24, 117,24, 34,52, 8,89; (e) tiene un tiempo de retención en cromatografía de líquidos a alta presión (HPLC) de aproximadamente 8-14 minutos, más específicamente de aproximadamente 11 minutos e incluso más específicamente de aproximadamente 11,31 min en una columna de HPLC C-18 de fase inversa (Phenomenex, Luna 5 μ C18(2) 100 A, 100 x 4,60 mm) usando agua:acetonitrilo (CH<sub>3</sub>CN) con un sistema disolvente en gradiente (0-20 min; 90-0 % de CH<sub>3</sub>CN acuoso, 20-24 min; 100 % de CH<sub>3</sub>CN, 24-27 min; 0-90 % de CH<sub>3</sub>CN acuoso, 27-30 min; 90 % de CH<sub>3</sub>CN acuoso) a un caudal de 0,5 ml/min y detección de UV de 210 nm.

35 Se analizan compuestos que incluyen, aunque sin limitación:

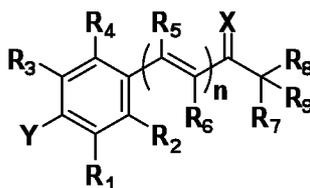
(A) un compuesto que tiene la estructura ##STR001##



40 ##STR001##

45 o una sal aceptable como plaguicida o esteroisómeros del mismo, en el que Y es OH, SH, NR, OR, SR, R en el que -R es alquilo de cadena inferior que contiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 restos alquilo, arilo o resto arilalquilo, alquilo inferior sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterociclilo, heterociclilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, tioalquilo, tioalquilo sustituido, hidroxilo, halógeno, amino, amido, carboxilo, -C(O)H, acilo, oxiacilo, carbamato, sulfonilo, sulfonamida o sulfurilo; X es O, NH, NR o S; R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub>, R<sub>8</sub>, R<sub>9</sub> es cada uno independientemente H, alquilo, alquilo sustituido, alqueno, alqueno sustituido, alquino, alquino sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterociclilo, heterociclilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, tioalquilo, tioalquilo sustituido, hidroxilo, halógeno, amino, amido, carboxilo, -C(O)H, acilo, oxiacilo, carbamato, sulfonilo, sulfonamida o sulfurilo;

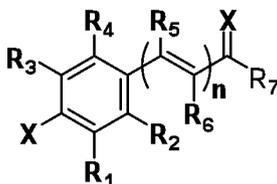
50 (B) un compuesto que tiene una estructura ##STR001a##



##STR001a##

o una sal aceptable como plaguicida o esteroisómeros del mismo, en el que Y es OH, SH, NR, OR, SR, R en el que -R es alquilo de cadena inferior que contiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 restos alquilo, arilo o resto arilalquilo, alquilo inferior sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterociclilo, heterociclilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, tioalquilo, tioalquilo sustituido, hidroxilo, halógeno, amino, amido, carboxilo, -C(O)H, acilo, oxiacilo, carbamato, sulfonilo, sulfonamida o sulfurilo; X es O, NH, NR o S; n es 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9; R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub>, R<sub>8</sub>, R<sub>9</sub> es cada uno independientemente H, alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterociclilo, heterociclilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, tioalquilo, tioalquilo sustituido, hidroxilo, halógeno, amino, amido, carboxilo, -C(O)H, acilo, oxiacilo, carbamato, sulfonilo, sulfonamida o sulfurilo;

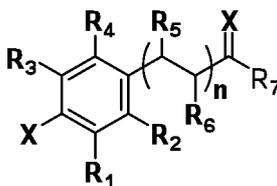
(C) un compuesto que tiene la estructura ##STR001b##



##STR001b##

o una sal aceptable como plaguicida o esteroisómeros del mismo, en el que Y es OH, SH, NR, OR, SR, R en el que -R es alquilo de cadena inferior que contiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 restos alquilo, arilo o resto arilalquilo, alquilo inferior sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterociclilo, heterociclilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, tioalquilo, tioalquilo sustituido, hidroxilo, halógeno, amino, amido, carboxilo, -C(O)H, acilo, oxiacilo, carbamato, sulfonilo, sulfonamida o sulfurilo; X es O, NH, NR o S; n es 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9; R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub> es cada uno independientemente H, alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterociclilo, heterociclilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, tioalquilo, tioalquilo sustituido, hidroxilo, halógeno, amino, amido, carboxilo, -C(O)H, acilo, oxiacilo, carbamato, sulfonilo, sulfonamida o sulfurilo;

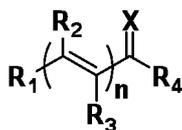
(D) un compuesto que tiene la estructura ##STR001c##



##STR001c##

o una sal aceptable como plaguicida o esteroisómeros del mismo, en el que Y es OH, SH, NR, OR, SR, R en el que -R es un alquilo de cadena inferior que contiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 restos alquilo, arilo o resto arilalquilo, alquilo inferior sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterociclilo, heterociclilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, tioalquilo, tioalquilo sustituido, hidroxilo, halógeno, amino, amido, carboxilo, -C(O)H, acilo, oxiacilo, carbamato, sulfonilo, sulfonamida o sulfurilo; X es O, NH, NR o S; n es 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9; R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub> es cada uno independientemente H, alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterociclilo, heterociclilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, tioalquilo, tioalquilo sustituido, hidroxilo, halógeno, amino, amido, carboxilo, -C(O)H, acilo, oxiacilo, carbamato, sulfonilo, sulfonamida o sulfurilo;

(E) un compuesto que tiene la estructura ##STR001c##

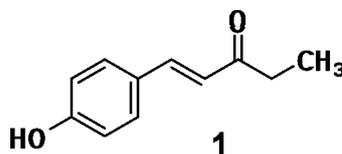


##STR001d##

o una sal aceptable como plaguicida o estereoisómeros del mismo, en el que X es O, NH, NR o S; n es 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9; R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> es cada uno independientemente H, alquilo, alquilo sustituido, alqueno, alqueno sustituido, alquino, alquino sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterociclilo, heterociclilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, tioalquilo, tioalquilo sustituido, hidroxilo, halógeno, amino, amido, carboxilo, -C(O)H, acilo, oxiacilo, carbamato, sulfonilo, sulfonamida o sulforilo;

en el que cuando R<sub>4</sub> es un arilo sin sustituir, R<sub>1</sub> no es etilo o arilo y en el que cuando R<sub>4</sub> es un alqueno sustituido, sustituido con arilo o alqueno sustituido, R<sub>1</sub> no es un alqueno sustituido, sustituido con un arilo o arilo sustituido.

En particular, el compuesto es el policétido aromático C<sub>6</sub>-C<sub>5</sub>, 1-(4-hidroxifenil)pent-1-en-3-ona (1).



El compuesto puede ser (E)-4-fenilbut-3-en-2-ona, benzalacetofenona, (E)-4-(2-hidroxifenil)but-3-en-2-ona, (3E,5E)-6-fenilhexa-3,5-dien-2-ona, (2E,4E)-1,5-difenilpenta-2,4-dien-1-ona, (E)-1-(2-hidroxifenil)pent-1-en-3-ona, (E)-3-(2-hidroxifenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona, (E)-1-(2-hidroxifenil)-5-metilhex-1-en-3-ona, (E)-3-(4-hidroxifenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona, (E)-1-(4-hidroxifenil)-5-metilhex-1-en-3-ona, (E)-4-(3-hidroxifenil)but-3-en-2-ona, (E)-4-(2-hidroxifenil)but-3-en-2-ona, 2-(2'-fenil-2-oxoetoxi)benzaldehído, (E)-4-(2-hidroxifenil)-3-metilbut-3-en-2-ona, (E)-1-fenilpent-2-en-1-ona, (3E,7Z)-deca-3,7-dien-2-ona, (E)-4-(3-hidroxifenil)but-3-en-2-ona, (1E,4E)-1,5-bis(3-hidroxifenil)penta-1,4-dien-3-ona, (E)-1,4-difenilbut-2-en-1-ona, (E)-1-(4-hidroxifenil)-4-fenilbut-2-en-1-ona, (1E,4E)-1,5-bis(3-hidroxifenil)-2-metilpenta-1,4-dien-3-ona, (E)-3-(3-hidroxifenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona, (E)-1-fenilpent-1-en-3-ona, (E)-4-(4-hidroxifenil)-3-metilbut-3-en-2-ona, (E)-5-metil-1-fenilhex-1-en-3-ona, 2-bromo-1-feniletanona, (E)-1-(3-hidroxifenil)-5-metilhex-1-en-3-ona, (E)-4-(4-hidroxifenil)but-3-en-2-on, 3-hidroxibenzaldehído, 4-hidroxibenzaldehído, 2-hidroxibenzaldehído, benzaldehído, gamma-dodecalactona, gamma-octalactona, 2-octanona, 2-heptanona, 2-undecanona, cis-4-heptenal, 4-metil-2-pentanona, isobutirilaldehído, (E)-4-fenilbut-2-enal, (E)-4-(4-hidroxifenil)but-2-enal, (E)-4-(3-hidroxifenil)but-2-enal, (E)-4-(2-hidroxifenil)but-2-enal, 3-fenilpropanal, 3-(4-hidroxifenil)propanal, 3-(3-hidroxifenil)propanal, 3-(2-hidroxifenil)propanal, 2-fenilacetaldehído, 2-(4-hidroxifenil)acetaldehído, 2-(3-hidroxifenil)acetaldehído, 2-(2-hidroxifenil)acetaldehído, cinnamalaldehído, (E)-3-(4-hidroxifenil)acrilaldehído, (E)-3-(3-hidroxifenil)acrilaldehído, (E)-3-(2-hidroxifenil)acrilaldehído, (2E,4E)-5-fenilpenta-2,4-dienal, (2E,4E)-5-(4-hidroxifenil)penta-2,4-dienal, (2E,4E)-5-(3-hidroxifenil)penta-2,4-dienal, (2E,4E)-5-(2-hidroxifenil)penta-2,4-dienal, pentan-2-ona, hexan-2-ona, 3-metilheptan-2-ona 3-metiloctan-2-ona, 3-metilnonan-2-ona y estereoisómeros de los mismos (por ejemplo, diaestereoisómeros, isómeros cis-trans, enantiómeros).

#### Método de producción

Como se aprecia anteriormente, los compuestos o metabolitos pueden obtenerse, son obtenibles o derivan de un organismo que tiene las características identificadoras de una especie de *Flavobacterium*, o como alternativa de cualquier otro microorganismo. Los métodos comprenden cultivar estos organismos y obtener los compuestos y/o composiciones de la presente invención aislando estos compuestos del cultivo de estos organismos.

En particular, los organismos se cultivan en medio nutriente usando métodos conocidos en la técnica. Los organismos pueden cultivarse por cultivo en matraz de agitación, fermentación a pequeña escala o a gran escala (incluyendo, aunque sin limitación, fermentación continua, discontinua, semidiscontinua o en estado sólido) en fermentadores de laboratorio o industriales realizada en medio adecuado y en condiciones que permiten el crecimiento celular. El cultivo puede tener lugar en medio nutriente adecuado que comprende fuentes de carbono y nitrógeno y sales inorgánicas, usando procedimientos conocidos en la técnica. El medio adecuado puede estar disponible de fuentes comerciales o prepararse de acuerdo con composiciones publicadas.

Después del cultivo, puede usarse un cultivo sustancialmente puro o caldo de células completas que comprende dicha cepa, o fracción celular, sobrenadante, filtrado, compuesto (por ejemplo, puede usarse un metabolito y/o extracto de o derivado de dicha *Flavobacterium* sp. en la formulación de una composición plaguicida. Como alternativa, después del cultivo, los compuestos y/o metabolitos pueden extraerse del caldo de cultivo.

El extracto puede fraccionarse por cromatografía. Las fracciones cromatográficas pueden ensayarse para la actividad tóxica contra, por ejemplo, nematodos de vida libre y nematodos parasitarios de plantas, *M. incognita* y/o *M. hapla* usando métodos conocidos en la técnica. Este proceso puede repetirse una o más veces usando los mismos métodos cromatográficos o diferentes.

5

## Composiciones

Las composiciones pueden comprender cultivos de caldo completo, cultivos líquidos o suspensiones que comprenden una cepa de una *Flavobacterium* sp., así como fracciones celulares, sobrenadantes, derivados de dicha cepa de una *Flavobacterium* sp., o combinaciones de los anteriores que tienen en particular actividad nematocida.

10

Las composiciones expuestas anteriormente pueden formularse de cualquier manera. Ejemplos no limitantes de formulaciones incluyen, aunque sin limitación, concentrados emulsionables (EC), polvos humectables (WP), líquidos solubles (SL), aerosoles, soluciones de concentrado de volumen ultra bajo (ULV), polvos solubles (SP), microencapsulación, gránulos dispersados en agua, fluidos (FL), microemulsiones (ME), nanoemulsiones (NE), etc. En cualquier formulación descrita en este documento, el porcentaje del ingrediente activo está dentro de un intervalo de aproximadamente un 0,01 % a un 99,99 %.

15

Las composiciones pueden estar en forma de un líquido, gel o sólido. Una composición sólida puede prepararse suspendiendo un vehículo sólido en una solución de uno o más ingredientes activos y secando la suspensión en condiciones suaves, tales como evaporación a temperatura ambiente o evaporación al vacío a 65 °C o inferior. Una composición puede comprender uno o más ingredientes activos encapsulados en gel. Dichos materiales encapsulados en gel pueden prepararse mezclando un agente formadores de gel (por ejemplo, gelatina, celulosa o lignina) con un cultivo o suspensión de *Flavobacterium* sp. viva o inactivada, o fracción celular de un cultivo o suspensión de *Flavobacterium* sp., o un cultivo secado por pulverización o congelación, célula o fracción celular o en una solución de compuestos plaguicidas usados en el método de la invención; e induciendo la formación de gel del agente.

20

25

La composición puede comprender adicionalmente un tensioactivo a usar con el fines de emulsificación, dispersión, humedecimiento, propagación, integración, control de la disgregación, estabilización de los ingredientes activos y mejora de la fluidez o inhibición de la roya. En una realización particular, el tensioactivo es un tensioactivo no iónico no fitotóxico que pertenece preferiblemente a la lista de EPA 4B. En otra realización particular, el tensioactivo no iónico es monolaurato de polioxietileno (20) sorbitán. La concentración de tensioactivos puede variar entre aproximadamente un 0,1 - 35 % de la formulación total; un intervalo preferido es aproximadamente un 5 - 25 %. La elección de agentes de dispersión y emulsión, tales como agentes de dispersión y emulsión no iónicos, aniónicos, anfóteros y catiónicos, y la cantidad empleada se determina por la naturaleza de la composición y la capacidad del agente de facilitar la dispersión de las composiciones de la presente invención.

30

35

La composición expuesta anteriormente puede combinarse con otro microorganismo y/o plaguicida (por ejemplo, nematocida, fungicida, insecticida). El microorganismo puede incluir, aunque sin limitación, un agente derivado de *Bacillus* sp. (por ejemplo, *B. firmus*, *B. thuringiensis*, *B. pumilus*, *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis*), *Paecilomyces* sp. (*P. lilacinus*), *Pasteuria* sp. (*P. penetrans*), *Pseudomonas* sp., *Brevibacillus* sp., *Lecanicillium* sp., *Ampelomyces* sp., *Pseudozyma* sp., *Streptomyces* sp. (*S. bikiniensis*, *S. costaricanus*, *S. avermitilis*), *Burkholderia* sp., *Trichoderma* sp., *Gliocladium* sp., avermectina, *Myrothecium* sp., *Paecilomyces* spp., *Sphingobacterium* sp., *Arthrobotrys* sp., *Chlorosplrnium* sp, *Neobulgaria* sp, *Daldinia* sp, *Aspergillus* sp, *Chaetomium* sp, *Lysobacter* sp, *Lachnum papyraceum*, *Verticillium suchlasporium*, *Arthrobotrys oligospora*, *Pochonia chlamydosporia* (sinónimo: *Verticillium chlamydosporium*), *Hirsutella minnesotensis*, *Hirsutella rhossiliensis*, *Pleurotus ostreatus*, *Omphalotus olearius*, *Lampteromyces japonicas*, *Brevudimonas* sp., *Muscodor* sp.

40

45

El pesticida puede ser un aceite natural, producto oleoso o plaguicida químico. En particular, el agente puede ser un aceite natural o producto oleoso que tiene actividad nematocida, fungicida y/o insecticida (por ejemplo, aceite parafínico, aceite del árbol del té, aceite de limoncillo, aceite de clavo, aceite de canela, aceite de cítricos incluyendo, aunque sin limitación, naranja amarga, naranja, limón; aceite de romero, piretro, pimienta inglesa, bergamota, eucalipto, camomila, citronela, jasmín común, enebro común, lavanda común, mirra común, hierbabuena silvestre, fresa, santolina gris, hipericón, albahaca sagrada, árbol del incienso, jasmín, lavanda, caléndula, hierbabuena, menta, caléndula cultivada, menta verde, árbol de ylang-ylang, saponinas).

50

55

El plaguicida químico puede ser agente antifúngico de un único sitio que puede incluir, aunque sin limitación, benzimidazol, un inhibidor de la desmetilación (DMI) (por ejemplo, imidazol, piperazina, pirimidina, triazol), morfolina, hidroxipirimidina, anilino pirimidina, fosforotiolato, inhibidor externo de quinona, quinolina, dicarboximida, carboximida, fenilamida, anilino pirimidina, fenilpirrol, hidrocarburo aromático, ácido cinámico, hidroxianilida, antibiótico, polioxina, acilamina, ftalimida, benzenoide (xililalanina), un inhibidor de la desmetilación seleccionado del grupo que consiste en imidazol, piperazina, pirimidina y triazol (por ejemplo, bitertanol, miclobutanilo, penconazol, propiconazol, triadimefón, bromuconazol, ciproconazol, diniconazol, fenbuconazol, hexaconazol, tebuconazol, tetraconazol), miclobutanilo y un inhibidor externo de quinona (por ejemplo, estrobilurina). La strobilurina puede incluir, aunque sin limitación, azoxistrobina, cresoxim-metoil o trifloxiestrobina. En otra realización particular más, el agente antifúngico es una quinona, por ejemplo, quinoxifeno (éter 4-fluorofenílico de 5,7-dicloro-4-quinolilo). El agente antifúngico también puede

60

65

obtenerse de un extracto de *Reynoutria*. El plaguicida químico también puede ser un fungicida químico no inorgánico de múltiples sitios seleccionado del grupo que consiste en cloronitrilo, quinoxalina, sulfamida, fosfonato, fosfito, ditiocarbamato, cloralquitos, fenilpiridina-amina, ciano-acetamida oxima.

- 5 Los nematicidas pueden incluir, aunque sin limitación, nematicidas de avermectina (por ejemplo, abamectina); nematicidas botánicos (por ejemplo, carvacrol); nematicidas de carbamato (por ejemplo, benomil carbofurano, carbosulfano, cloetocarb); nematicidas de oxima de carbamato (por ejemplo, alanycarb, aldicarb, aldoxicarb, oxamil tirpato); nematicidas fumigantes (por ejemplo, disulfuro de carbono, cianógeno, 1,2-dicloropropano, 1,3-dicloropropeno, ditioéter, bromuro de metilo, yoduro de metilo, tetratiocarbonato de sodio); nematicidas organofosforados, que incluyen, aunque sin limitación, nematicidas organofosfáticos (por ejemplo, diamidafos, fenamifos, fostietano, fosfamidona); nematicidas organotiofosfáticos (por ejemplo, cadusafos, clorpirifos, diclofention dimetoato etoprofos, fensulfotión, fostiazato, heterofos, isamidofos, isazofos, forato, fosfocarb, terbufos, tionazina, triazofos); nematicidas fosfonotioato (por ejemplo, imiciafos, mecarfona); nematicidas no clasificados (por ejemplo, acetoprol, benclotiaz, cloropicrina, dazomet, DBCP, DCIP, fluensulfona, furfural, metam, isotiocianato de metilo, xilenoles, espiritetramat)

La composición también puede usarse en combinación con otros agentes promotores del crecimiento tales como fertilizantes sintéticos u orgánicos (por ejemplo, fosfato de diamonio en forma granulada o líquida), té de compost, extractos de algas, hormonas del crecimiento de plantas tales como IAA (ácido indolacético) usadas en un tratamiento hormonal de raíces para trasplantes en solitario o en combinación con reguladores del crecimiento de plantas tales como IBA (ácido indolebutírico) y NAA (ácido naftaleno acético), y, microbios promotores del crecimiento, tales como *Bacillus* spp., *Pseudomonads*, *Rhizobia*, *Trichoderma* spp.

Además, la composición puede usarse en combinación con agentes de recubrimiento de semillas. Dichos agentes de recubrimiento de semillas incluyen, aunque sin limitación, etilenglicol, carboximetilcelulosa, metilcelulosa, polietilenglicol, quitosano, carboximetil quitosano, musgo de turbera, resinas y ceras o fungicidas químicos o bactericidas con un modo de acción de un único sitio, de múltiples sitios o desconocido. Las composiciones pueden aplicarse usando métodos conocidos en la técnica. Específicamente, estas composiciones pueden aplicarse a y alrededor de plantas o partes de plantas. Debe entenderse que las plantas significan, en el presente contexto, todas las plantas y poblaciones de plantas tales como plantas silvestres o plantas de cultivo deseadas e indeseadas (incluyendo plantas de cultivo de origen natural). Las plantas de cultivo pueden ser plantas que se pueden obtener mediante procedimientos convencionales de reproducción y optimización de plantas o mediante procedimientos biotecnológicos y de ingeniería genética, o mediante combinaciones de estos procedimientos, incluyendo las plantas transgénicas e incluyendo las variedades de cultivo de plantas que se pueden proteger o no por los derechos de obtentores de plantas. Debe entenderse que las partes de plantas significa todas las partes y órganos de plantas por encima y por debajo del suelo, tales como el brote, hoja, flor y raíz, cuyos ejemplos que pueden mencionarse son hojas, agujas, ramas, tallos, flores, cuerpos fructíferos, frutos, semillas, raíces, tubérculos y rizomas. Las partes de plantas también incluyen, aunque sin limitación, material recolectado y material de propagación vegetativa y generativa, por ejemplo, esquejes, tubérculos, rizomas, retoños y semillas. Las plantas que pueden tratarse incluyen, aunque sin limitación: (A) Cultivos alimenticios comestibles principales, que incluyen, aunque sin limitación (1) Cereales (por ejemplo, arroz africano, cebada, trigo duro, trigo cultivado, farro, mijo dedo, mijo, garranchuelo peludo, mijo de cuadra indio, mijo de cuadra japonés, maíz, nance, avena, mijo perla, mijo común, arroz, centeno, sorgo, *Sorghum* spp., centeno, trigo espelta); (2) Frutas (por ejemplo, abiu, acerola, achacha, mangostán africano, grosella alpina, jobo indio, grosella espinosa americana, caqui americano, manzana, albaricoque, arazá, palma asiática de Siria, pera asiática, atemoya, pasa del desierto australiano, aguacate, acerola, babaco, membrillo de Bengala, plátano, grosella espinosa de Barbados, bergamota, nuez de betel, bignay, arándano, bilimbi, mango blanco, biriba, naranja amarga, aronia negra, mora negra, zapote negro, zarzamora, madreselva de baya azul, borojó, pana, uva birmana, mango botón, cacao, calamansi, zapote amarillo, melón, grosella espinosa del cabo, anacardo, cassabanana, jaca de la India, charichuelo, chirimoya, cereza, cereza del Rio Grande, ciruelo cerezo, espinillo chino, pera blanca china, aronia, cidra, cocona, coco, coco morado, café, café arábica, café robusta, pitahaya de Costa Rica, grosellas, chirimoya, dátil, dátil ciruela, rosa silvestre, fruta del dragón, durián, baya del saúco, manzana del elefante, berenjena etiope, aligonero europeo, manzano silvestre europeo, feijoa, higo, gac, genipapo, badea, grosella espinosa, goumi, uva, pomelo, fruta del paraíso, claudia, guayaba, kiwi hardy, jobo, melón cornudo, mango de caballo, higo indio, azufaifo indio, jaboticaba, almez, yaca, caqui japonés, frambuesa japonesa, jocote, azufaifo, lima kafir, karanda, manzana kei, manzana kepel, limonero, kitambilla, kiwi, korlan, kupal, mango kuwini, kwai muk, langsat, arándano grande, limón, café liberiano, longan, níspero japonés, lichi, manzana malaya, zapote mamey, mamey amarillo, mango, mangostán, maprang, marang, níspero, melón, ciruela mirabel, fruta del milagro, fruta de los monos, palma moriche, papaya de montaña, guanábana de montaña, morera, naranjilla, ciruela natal, arándano septentrional, oliva, grosella espinosa estrellada, kumquat ovalado, papaya, paraguayana, fruta de la pasión, asimina, melocotón, palmera melocotón, pera, pepino, piña, pitomba *Eugenia luschnathiana*, pitomba *Talisia esculenta*, plátano, ciruela, granado, pomelo, pulasan, cornijuelo modado, membrillo, rambután, ciruela del gobernador, frambuesa, aronia roja, grosella roja, morera roja, fresa roja, guayaba, ruibarbo, manzana rosa, rosa de Jamaica, safou, salak, frambuesa salmón, santol, chicozapote, mandarina satsuma, uva de playa, soncoya, cerezo ácido, guanábana, mamoncillo, tamarindo español, caimito, carambola, fresa, guayaba fresa, madroño, manzana azucarada, cereza de Surinam, rosa rubiginosa, granadilla dulce, lima dulce, tamarillo, tamarindo, mandarina, tomatillo, palmera tucuma, *Vaccinium* spp., mabolo, wampi, sandía, manzana de rosa acuosa, manzana de Java, grosella blanca, morera blanca, zapote blanco, udala, goji (*Lyceum barbarum*, *L. chinense*),

jobo, pitahaya amarilla, fresa amarilla, guayaba, (3) Verduras (por ejemplo, achee, agate, papa voladora, *Amaranthus* spp., cacahuete americano, berenjena africana, alficoz, arracacha, oreja de elefante, arrurruz, alcachofa, calabaza china, espárragos, aguacate, judía azuki, cacahuete bambara, bambú, plátano, grosella espinosa de Barbados, remolacha, remolacha roja, melón amargo, yero, vernonia, mostaza negra, rábano negro, salsifi negro, apio en rama,

5 pana, haba, brécol, coles de Bruselas, hierba estrella, calabaza botón de oro, calabaza moscada, repollo, caigua, calabaza de peregrino, semillas de alcaravea, algarrobo, zanahoria, cassabanana, yuca, catjang, coliflor, apionabo, apio, lechuga china, acelga, chayote, garbanzo, achicoria, chilacayote, chile (*Capsicum annuum*, *C. baccatum*, *C. chinense*, *C. frutescens*, *C. pubescens*), repollo chino, castaña de agua china, ñame chino, cebollino, chufa, crucíferos, judía común, verdolaga común, canónigo, frijol, berro, pepino, calabaza pipian, moringa, eddo, berenjena, patata de

10 Telinga, ajo elefante, endivia, ensete, berenjena etíope, hinojo de Florencia, calabaza acanalada, gac, rúcula, ajo, cacahuete geocarpa, espinaca de Lincolnshire, almorta, cacahuete, guar, gramo del caballo, rábano rusticano, judía de Egipto, planta de hielo, higo indio, espinaca india, calabaza hiedra, alcachofa de Jerusalén, jícama, yute, col rizada, colirrábano, lengua del diablo, kurrat, puerro, lenteja, lechuga, judía de Lima, loto, luffa, maca, maíz, remolacha forrajera, mashua, bambú moso, frijol mate, judía mungo, col china, nim, oca, quimbombó, bambú de Oldham, oliva,

15 cebolla, chirivía, guisantes, guandú, plátano, calabaza puntiaguda, patata, calabazas, calabazín, quinoa, rábano, colza, amaranto rojo, ruibarbo, calabacín acanalado, frijol arroz, raíz de perejil, judías pintas, colinabo, palmera de sagú, salsifi, cebolleta, col marina, ascalonia, calabacín serpiente, tirabeque, acedera, soja, hierba de los dientes, espinaca, acelga común, batata, malanga, tarwi, calabaza teasle, frijol tépari, calabaza india, tomate, guisante tuberoso, nabo, nabo arraigado perifollo, frijol negro, castaña de agua *trapa bicornis*, castaña de agua *trapa natans*,

20 espinaca de agua, berro, cebolla de Gales, okra de África occidental, pepinillo de India occidental, pata de gallo blanca, ñame blanco, frijol alado, verdolaga de Cuba, yacón, ñame, judía espárrago, zapallos); (4) Cultivos alimenticios (por ejemplo, abiu, acerola, achacha, achee, mangostán africano, arroz africano, agate, papa voladora, grosella alpina, *Amaranthus* spp., ambarrella, grosella espinosa americana, cacahuete americano, caqui americano, berenjena africana, manzana, albaricoque, arazá, alficoz, arracacha, oreja de elefante, arrurruz, alcachofa, calabaza china, palma

25 asiática de Siria, pera asiática, espárragos, atemoya, pasa del desierto australiano, aguacate, acerola, judía azuki, babaco, membrillo de Bengala, cacahuete bambara, bambú, plátano, grosella espinosa de Barbados, cebada, remolacha, remolacha roja, bergamota, nuez de betel, bignay, arándano, bilimbi, mango blanco, biriba, melón amargo, naranja amarga, yero, vernonia, aronia negra, grosella negra, mora negra, mostaza negra, rábano negro, salsifi negro, zapote negro, zarzamora, apio en rama, madre selva de baya azul, borojó, pana, haba, brécol, coles de Bruselas,

30 hierba estrella, trigo sarraceno, uva birmana, calabaza botón de oro, calabaza moscada, mango botón, repollo, cacao, caigua, calabaza de peregrino, calamansi, zapote amarillo, melón, grosella espinosa del cabo, semillas de alcaravea, algarrobo, zanahoria, anacardo, yuca, catjang, coliflor, apionabo, apio, lechuga china, jaca de la India, acelga, charichuelo, chayote, chirimoya, cereza, cereza del Río Grande, ciruelo cerezo, garbanzo, achicoria, chilacayote, chile (*Capsicum annuum*, *C. baccatum*, *C. chinense*, *C. frutescens*, *C. pubescens*), repollo chino, espino chino, castaña de

35 agua china, pera blanca china, ñame chino, cebollinos, aronia, chufa, cidra, cocona, coco, coco morado, café, café (tipos Arábica y Robusta), crucíferos, judía común, verdolaga común, canónigo, pitahaya de Costa Rica, frijol, berro, pepino, grosellas, calabaza pipian, chirimoya, dátil, dátil ciruela, rosa silvestre, fruta del dragón, moringa, durián, trigo duro, eddo, berenjena, trigo cultivado, baya del saúco, manzana del elefante, patata de Telinga, ajo elefante, espelta, endivia, ensete, berenjena etíope, aligonero europeo, manzano silvestre europeo, feijoa, higo, mijo dedo, hinojo de

40 Florencia, calabaza acanalada, mijo, gac, rúcula, ajo, genipapo, cacahuete geocarpa, badea, espinaca de Lincolnshire, grosella espinosa, goumi, uva, pomelo, almorta, fruta del paraíso, claudia, cacahuete, cereza de Brasil, guar, guayaba, garranchuelo peludo, kiwi hardy, jobo, melón cornudo, gramo del caballo, mango de caballo, rábano rusticano, judía de Egipto, planta de hielo, mijo de cuadro indio, higo indio, azufaifo indio, espinaca india, calabaza hiedra, jaboticaba, fruta de chacal, yaca, jambolán, mijo de cuadro japonés, caqui japonés, frambuesa japonesa, alcachofa de Jerusalén,

45 jocote, azufaifo, yute, lima kafir, col rizada, karanda, manzana kei, manzana kepel, limonero, kitambilla, kiwi, colirrábano, lengua del diablo, korlan, kubal, kurrat, mango kuwini, kwai muk, langsat, arándano grande, puerro, limón, lenteja, lechuga, café liberiano, alubia de Lima, longan, níspero japonés, loto, luffa, lichi, maca, maíz, manzana malaya, mamey zapote, mamey amarillo, remolacha forrajera, mango, mangostán, maprang, marang, mashua, níspero, melón, ciruela mirabel, fruta del milagro, fruta de monje, fruta de los monos, palma moriche, bambú moso, frijol mate, papaya

50 de montaña, guanábana de montaña, morera, judía mungo, setas, nance, col china, naranjilla, ciruela natal, nim, arándano septentrional, avena, oca, palma oleaginosa, quimbombó, bambú de Oldham, oliva, cebolla, naranja, grosella espinosa estrellada, kumquat ovalado, papaya, paraguayana, chirivía, fruta de la pasión, asimina, guisantes, melocotón, palmera melocotón, pera, mijo perla, pepino, guandú, piña, Pitomba (*Eugenia luschnathiana*, *Talisia esculenta*), plátano, ciruela, calabaza puntiaguda, granado, pomelo, patata, mijo común, pulasan, calabazas y

55 calabacines, cornijuelo modado, membrillo, quinoa, rábano, rambután, ciruela del gobernador, colza, frambuesa, amaranto rojo, aronia roja, grosella roja, morera roja, fresa roja guayaba, ruibarbo, calabacín acanalado, arroz, frijol arroz, raíz de perejil, manzana rosa, rosa de Jamaica, judías pintas, colinabo, centeno, safou, palmera de sagú, salak, frambuesa salmón, salsifi, santol, chicozapote, mandarina satsuma, cebolleta, col marina, uva de playa, ascalonia, calabacín serpiente, tirabeque, soncoya, sorgo, *Sorghum* spp., acedera, guinda, guanábana, soja, mamoncillo,

60 tamarindo español, trigo espelta, hierba de los dientes, espinaca, acelga común, caimito, carambola, fresa, guayaba fresa, madroño, manzana azucarada, remolacha azucarera, caña de azúcar, cereza de Surinam, rosa rubiginosa, granadilla dulce, lima dulce, batata, tamarillo, tamarindo, mandarina, malanga, tarwi, calabaza teasle, tef, frijol tépari, calabaza india, tomatillo, tomate, guisante tuberoso, palmera tucuma, nabo, nabo arraigado perifollo, frijol negro, *Vaccinium* spp., mabolo, wampi, castaña de agua (*Trapa bicornis*, *T. natans*), espinaca de agua, berro, sandía,

65 manzana de rosa acuosa, manzana de Java, cebolla de Gales, okra de África occidental, pepinillo de India occidental, trigo, grosella blanca, pata de gallo blanca, morera blanca, zapote blanco, udala, ñame blanco, frijol alado, verdolaga

de Cuba, goji (*Lycium barbarum*, *L. chinense*), yacón, ñame, fresa china, judía espárrago, jobo, pitahaya amarilla, fresa amarilla guayaba, calabacín; (B) Otros cultivos comestibles, que incluyen, aunque sin limitación, (1) Hierbas (por ejemplo, ajeno, alexander, albahaca, laurel común, nuez de betel, camomila, perifollo, chile (*Capsicum annuum*, *C. baccatum*, *C. chinense*, *C. frutescens*, *C. pubescens*), chiles, cebollinos, mirra, ruda común, tomillo común, cilantro, berro, coriander, perejil rizado, eneldo, epazote, hinojo, perejil liso, ginseng, santolina gris, hipericón, albahaca sagrada, lúpulo, jazmín, lima kafir, lavanda, toronjil, albahaca de limón, limoncillo, levístico, mejorana, hierbabuena, orégano, perejil, menta, perilla, caléndula cultivada, rooibos, romero, salvia, espino cerval de hoja brillante, acedera, menta verde, ajedrea de jardín, estragón, albahaca tailandesa, valeriana, berro, betel silvestre, ajedrea, yerba mate); (2) Especies (por ejemplo, hierba de obispo, pimienta inglesa, anís, laurel común, cardamomo negro, mostaza negra, pimienta negra, alcaparra, semillas de alcaravea, cardamomo, chile (*Capsicum annuum*, *C. baccatum*, *C. chinense*, *C. frutescens*, *C. pubescens*), chiles, canela, clavo, enebro común, cilantro, comino, hinojo, fenogreco, ajo, jengibre, lima kafir, regaliz, nuez moscada, orégano, pandan, perejil, azafrán, anís estrellado, cúrcuma, vainilla, mostaza blanca); (2) Plantas medicinales (por ejemplo, ajeno, alfalfa, aloe vera, anís, alcachofa, albahaca, laurel común, betel, nuez de betel, arándano, cardamomo negro, mostaza negra, pimienta negra, eucalipto, borojó, manzanilla, alcaparra, cardamomo, semilla de ricino, chiles, ñame chino, cebollinos, nuez de cola, jazmín común, lavanda común, mirra común, ruda común, cilantro, comino, eneldo, rosa silvestre, epazote, hinojo, fenogreco, gac, ajo, jengibre, santolina gris, goma arábica, hipericón, albahaca sagrada, rábano rusticano, árbol del incienso, lavanda, limoncillo, regaliz, levístico, marihuana, mejorana, fruta de monje, nim, opio, orégano, menta, caléndula cultivada, quinina, acacia roja, grosella roja, rooibos, cártamo, salvia, espino cerval de hoja brillante, acedera, hierba de los dientes, anís estrellado, estragón, té, cúrcuma, valeriana, frijol terciopelo, berro, mostaza blanca, zapote blanco, betel silvestre, goji (*Lycium barbarum*, *L. chinense*), yerba mate); (3) Estimulantes (por ejemplo, betel, nuez de betel, cacao, chile (*Capsicum annuum*, *C. baccatum*, *C. chinense*, *C. frutescens*, *C. pubescens*), chiles, café, café (Árabe, Robusta), nuez de cola, khat, café liberiano, té, tabaco, betel silvestre, yerba mate); (4) Frutos secos (por ejemplo, almendra, nuez de betel, nuez de Brasil, anacardo, castaña, castaña de agua china, coco, nuez de cola, nuez común, cacahuete, avellana, bellota japonesa, macadamia, nuez moscada, nuez del paraíso, nuez pecan, pistacho, nuez); (5) Semillas comestibles (por ejemplo, pimienta negra, nuez de Brasil, chilacayote, nuez de cola, calabaza acanalada, loto, opio, quinoa, sésamo, pipa de girasol, castaña de agua (*Trapa bicornis*, *T. natans*); (6) Aceites vegetales (por ejemplo, mostaza negra, camelina, semilla de ricino, coco, algodón, linaza, maíz, nim, semilla de niger, palma oleaginosa, oliva, opio, colza, cártamo, sésamo, soja, pipa de girasol, tung asiático, nabo); (7) Cultivos de azúcar (por ejemplo, palma asiática de siria, palmera datilera plateada, sorgo, remolacha azucarera, caña de azúcar); (8) Pseudocereales (por ejemplo, *Amaranthus* spp., trigo sarraceno, quinoa, amaranto rojo); (9) Afrodisiacos (por ejemplo, borojó, apio, durián, rúcula, ginseng, maca, acacia roja, frijol terciopelo); (C) Categorías no alimenticias, incluyendo, aunque sin limitación, (1) forraje y cultivos de cuscuta (por ejemplo, agate, alfalfa, remolacha, haba, camelina, catjang, almorta, guar, gramo del caballo, mijo de cuadra indio, mijo de cuadra japonés, lespedeza, altramúz, maíz, remolacha forrajera, morera, semilla de niger, colza, frijol arroz, centeno); (2) Cultivos de plantas fibrosas (por ejemplo, coco, algodón, fique, cáñamo, henequén, yute, capok, kenaf, linaza, cáñamo de Manila, lino de Nueva Zelanda, ramio, rosa de Jamaica, sisal, morera blanca); (3) Cultivos energéticos (por ejemplo, eucalipto, camelina, yuca, maíz, colza, sorgo, soja, pasto del Sudán, remolacha azucarera, caña de azúcar, trigo); (4) Producción de alcohol, (por ejemplo, cebada, ciruela, patata, caña de azúcar, trigo, sorgo); (5) Cultivos secos (por ejemplo, raíz de chay, alheña, índigo, mora, cártamo, azafrán, cúrcuma); (6) Aceites esenciales (por ejemplo, pimienta inglesa, bergamota, naranja amarga, eucalipto, camomila, citronela, clavo, jazmín común, enebro común, lavanda común, mirra común, hierbabuena silvestre, fresa, santolina gris, hipericón, albahaca sagrada, árbol del incienso, jazmín, lavanda, limón, caléndula, hierbabuena, naranja, menta, caléndula cultivada, menta verde, árbol de ylang-ylang); (6) Abono verde (por ejemplo, alfalfa, trébol, encaje Phacelia, cáñamo marrón, trébol, frijol terciopelo, algarroba); (7) Prevención de la erosión (por ejemplo, bambú, coco morado); (8) Mejora de la tierra (por ejemplo, altramúz, algarroba); (9) Cultivos de cobertura (por ejemplo, alfalfa, lacy Phacelia, rábano); (10) Pesticidas botánicos (por ejemplo, jícama, caléndula, nim, piretro); (11) Flores cortadas (por ejemplo, clavel, crisantemo, narciso, dalia, fresa, gerbera, caléndula, rosa, girasol, tulipán); (12) Plantas ornamentales (por ejemplo, mangostán africano, aloe vera, grosella alpina, aster, aronia negra, pana, calamansi, clavel, cassabanana, semilla de ricino, ciruelo cerezo, aronia, crisantemo, coco morado, lavanda común, crocus, narciso, dalia, fresa, gerbera, jacinto, bellota japonesa, jazmín, lacy Phacelia, loto, altramúz, caléndula, lino de Nueva Zelanda, opio, cornijuelo modado, ramio, aronia roja, rosa, pipa de girasol, tulipán, morera blanca); (D) Árboles, incluyendo, aunque sin limitación, abelia, almendro, manzano, albaricoquero, arborvitae nigra americano, arborvitae, fresno, álamo, azalea, ciprés calvo, Kolkwitzia, haya, abedul, tupelo negro, zarzamora, arándano azul americano, boj, falso castaño, lila de verano, calabaza moscada, camelia, catalpa, cedro, cerezo, castaño, árbol cafetero, manzano cangrejo, manzano silvestre, árbol de Júpiter, ciprés, cornejo, abeto de Douglas, ébano, saúco americano, olmo, abeto, forsitia, ginkgo, árbol de lluvia dorada, almez, espino, avellano, cicuta, carya, acebo, acacia negra, castaño de Indias, hortensia, enebro, lila, tilo, magnolio, arce, celinda, sorbus, roble, oliva, melocotón, pera, nogal pecanas, pino, pistacho, plátano de sombra, ciruela, álamo, ligustro, frambuesa, árbol del amor, tuya gigante, secoya roja, rododendro, rosa de Sharon, sasafrás, secoya, guillomos, árbol del humo, árbol de jaboncillo, oxidendro, abeto, madroño, calicanto, sicomoro, tulípero, viburnum, nogal, weigela, sauce, acebo canadiense, hamamélide de Virginia, olmo asiático; (E) Césped incluyendo, aunque sin limitación, pasto azul de Kentucky, festuca alta, césped Bermuda, césped zoysia, césped ballico perenne, festucas finas (por ejemplo; festuca roja, festuca de Chewings, dura o ovina).

El tratamiento de las plantas y las partes de planta con las composiciones expuestas anteriormente puede realizarse directamete o permitiendo que las composiciones actúen sobre sus alrededores, hábitat o espacio de almacenamiento por, por ejemplo, inmersión, pulverización, evaporación, nebulización, dispersión, tinción, inyección.

En el caso de que la composición se aplique a una semilla, la composición puede aplicarse a la semilla como uno o más recubrimientos antes de plantar la semilla usando uno o más recubrimientos usando métodos conocidos en la técnica.

## 5 Usos

Las composiciones, cultivos, sobrenadantes, metabolitos y compuestos plaguicidas expuestos anteriormente pueden usarse como plaguicidas y en particular, pueden usarse como insecticidas y nematocidas, en solitario o en combinación con una o más sustancias plaguicidas expuestas anteriormente y aplicarse a plantas, partes de planta, sustrato para el crecimiento de plantas o semillas expuestos anteriormente.

Específicamente, los nematodos que pueden controlarse usando el método expuesto anteriormente incluyen, aunque sin limitación, nematodos parasitarios tales como nematodos nodulares de la raíz, reniformes, de quiste y de lesiones, incluyendo, aunque sin limitación, *Meloidogyne* sp., *Tylenchorhynchus* sp., *Belonolaimus* sp., *Hoplolaimus* sp., *Helicotylenchus* sp., *Pratylenchus* sp., *Rotylenchulus* sp., *Heterodera* sp., *Globodera* sp., *Trichodorus* sp., *Paratrichodorus* sp., *Xiphinema* sp. y *Criconema* sp. En particular, los nematodos parasitarios pueden incluir, aunque sin limitación, nematodos de las agallas de la semilla (*Afrina wevelli*), nematodos de bentgrass (*Anguina agrostis*), nematodos de la agalla del brote (*Anguina* spp.), nematodos de la agalla del brote (*Anguina* spp., *A. amsinckiae*, *A. balsamophila*, *A. tritici*), nematodos de la agalla de la hoja de festuca (*A. graminis*), nematodos de espiga arrugada (o agalla del trigo) (*Anguina tritici*), nematodos de yema y hoja (o foliar) (*Aphelenchoides* spp., *A. subtenuis*), nematodos de la hoja de begonia (o helecho, o de rizado primaveral, o foliares de la fresa, o nematodos de la fresa, o enana de verano) (*A. fragariae*), nematodos del helecho (*A. olesistis*), nematodos del arroz (*A. oryzae*), nematodos de la grosella (*A. ribes*), nematodos de la grosella negra (o crisantemo) (*A. ritzemabosi*), nematodos foliares o la hoja del crisantemo (*A. ritzemabosi*), nematodos punta blanca de arroz (o enana de primavera o brote de fresa) (*A. besseyi*), nematodos alimentados de hongos (champiñón) (*Aphelenchoides composticola*), *Atalodera* spp. (*Atalodera lonicerae*, *Atalodera ucri*), nematodos espina (*Bakernema variable*), nematodos de picadura (*Belonolaimus* spp., *B. gracilis*, *B. longicaudatus*), nematodos de la madera del pino (*Bursaphelenchus* spp., *B. xylophilus*, *B. mucronatus*), nematodos sésiles (*Cacopaurus* spp., *C. epacris*, *C. pestis*), nematodos del quiste del amaranto (*Cactodera amaranthi*), nematodos del quiste del abedul (*C. betulae*), nematodos del quiste del cactus (*C. cacti*), nematodos del quiste estonio (*C. estonica*), nematodos del quiste de Thome (*C. thornei*), nematodos del quiste de la hierba pejiquera (*C. weissi*), nematodos de anillo (*Criconema* spp.), nematodos espina (*Criconema* spp., *C. civellae*, *C. decalineatum*, *C. spinalineatum*), nematodos de anillo (*Criconemella axeste*, *C. curvata*, *C. macrodora*, *C. parva*), nematodos de anillo (*Criconemoides* spp., *C. citri*, *C. simile*), nematodos de columna (*Crossonema fimbriatum*), nematodos cistoides del eucalipto (*Cryphodera eucalypti*), pero, nematodos del tallo y bulbo (*Ditylenchus* spp., *D. angustus*, *D. dipsaci*, *D. destructor*, *D. intermedius*), nematodos de los micelios (*D. myceliophagus*), nematodos punzón (*Dolichodorus* spp., *D. heterocephalus*, *D. heterocephalous*), nematodos lanza (*Dorylaimus* spp.), nematodos de atrofia (*Geocenamus superbus*), nematodos de quiste (*Globodera* spp.), nematodos del quiste de aquilea (*G. achilleae*), nematodos del quiste de milenrama (*G. millefolii*), nematodos del quiste del manzano (*G. mali*), nematodos del quiste blanco de la patata (*G. pallida*), nematodos dorados (*G. rostochiensis*), nematodos del quiste del tabaco (*G. tabacum*), nematodos del quiste de Osborne (*G. tabacum solanacearum*), nematodos del quiste de la ortiga de Bull (*G. tabacum virginiae*), nematodos alfiler (*Gracilacus* spp., *G. idalimus*), nematodos de espiral (*Helicotylenchus* spp., *H. africanus*, *H. digonicus*, *H. dihystra*, *H. erythrinae*, *H. multicinctus*, *H. paragirus*, *H. pseudorobustus*, *H. solani*, *H. spicaudatus*), nematodos de las vainas (*Hemicriconemoides* spp., *H. biformis*, *H. californianus*, *H. chitwoodi*, *H. floridensis*, *H. wessonii*), nematodos vaina (*Hemicycliophora* spp., *H. arenaria*, *H. biosphaera*, *H. megalodiscus*, *H. parvana*, *H. poranga*, *H. sheri*, *H. similis*, *H. striatula*), nematodos quísticos (*Heterodera* spp.), nematodos del quiste del almendro (*H. amygdali*), nematodos del quiste de la avena (o cereales) (*H. avenae*), nematodos del quiste de Cajanus (o guandú) (*H. cajani*), nematodos del quiste del césped Bermuda (o forma de corazón, o Valentine) (*H. cardiolata*), nematodos del quiste de la zanahoria (*H. carotae*), nematodos del quiste del repollo o nematodo dorado de la raíz de *Brassica* (*H. cruciferae*), nematodos del quiste de nutgrass (o juncia) (*H. cyperi*), nematodos del quiste japonés (*H. elachista*), nematodos del quiste de la higuera (o ficus, o caucho) (*H. ficii*), nematodos del quiste de galeopsis (*H. galeopsidis*), nematodos del quiste de la soja (*H. glycines*), nematodos del quiste de la raíz de la alfalfa (o quiste quisante) (*H. goettingiana*), nematodos del quiste sarraceno (*H. graduni*), nematodos del quiste de la cebada (*H. hordecalis*), nematodos del quiste del lúpulo (*H. humuli*), nematodos del quiste del cereal mediterráneo (o trigo) (*H. latipons*), nematodos del quiste de lespedeza (*H. lespedezae*), nematodos del quiste de Kansas (*H. longicolla*), nematodos dorados de la raíz de los cereales o nematodos del quiste de la avena (*H. major*), nematodos del quiste del césped (*H. mani*), nematodos del quiste de la alfalfa (*H. medicaginis*), nematodos del quiste de cyperus (o motha) (*Heterodera mothi*), nematodos del quiste del arroz (*H. oryzae*), nematodos Amu-Darya (o quiste del espino de camello) (*H. oxiana*), nematodos del quiste de acedera (*H. rosii*), nematodos del quiste de rumex (*H. rumicis*), nematodos del quiste de la remolacha azucarera (*H. schachtii*), nematodos del quiste del sauce (*H. salixophila*), nematodos del quiste de knawel (*H. scleranthii*), nematodos del quiste de la cerraña (*H. sonchophila*), nematodos del quiste de tayikos (*H. tadshikistanica*), nematodo del quiste turcomano (*H. turcomanica*), nematodos del quiste del trébol (*H. trifolii*), nematodos del quiste de la ortiga (*H. urticae*), nematodos del quiste de Ustinov (*H. ustinovii*), nematodos del quiste del mijo (*H. vigni*), nematodos del quiste del maíz (*H. zaeae*), nematodos de la raíz del arroz (*Hirschmanniella* spp., *H. belli*, *H. caudacrena*, *H. gracilis*, *Horyzae*), nematodos lanza (*Hoplolaimus* spp.), nematodos Columbia (*H. columbus*), nematodos lanza de Cobb (*H. galeatus*), nematodos coronados lanza (*H. tylenchiformis*), nematodos pseudonodulares de la raíz (*Hypsoperine graminis*), nematodos aguja (*Longidorus* spp., *L. africanus*, *L. sylphus*), nematodos de anillo

(*Macroposthonia* (= *Mesocriconema*) *xenoplax*), nematodos quísticos (*Meloidodera* spp.), nematodos quísticos del pino (*M. floridensis*), nematodos quísticos de tayikos (*M. tadshikistanica*), nematodos quísticos del cuerpo (*Meloidoderita* spp.), nematodos de atrofia (*Merlinius* spp., *M. brevidens*, *M. conicus*, *M. grandis*, *M. microdorus*), nematodos noduladores de la raíz (*Meloidogyne* spp., *M. acronea*, *M. arenaria*, *M. artiellia*, *M. brevicauda*, *M. camelliae*, *M. carolinensis*, *M. chitwoodi*, *M. exigua*, *M. graminicola*, *M. hapla*, *M. hispanica*, *M. incognita*, *M. incognita acrita*, *M. indica*, *M. inornata*, *M. javanica*, *M. kikuyuensis*, *M. konaensis*, *M. mali*, *M. microtyla*, *M. naasi*, *M. ovalis*, *M. platani*, *M. querciana*, *M. sasserii*, *M. tadshikistanica*, *M. thamesi*), nematodos de centaurea (*Mesoanguina picridis*), nematodos del abeto de Douglas (*Nacobdodera chitwoodi*), nematodos noduladores de la raíz falsos (*Nacobbus aberrans*, *N. batatiformis*, *N. dorsalis*), nematodos de pasta ácida (*Panagrellus redivivus*), nematodos de la cerbeza (*P. silusiae*), nematodos aguja (*Paralongidorus microlaimus*), nematodos de espiral (*Paratotylenchus* spp.), nematodos de la raíz voluminosa (*Paratrichodorus allius*, *P. minor*, *P. porosus*, *P. renifer*), nematodos alfiler (*Paratylenchus* spp., *P. baldaccii*, *P. bukowinensis*, *P. curvatus*, *P. dianthus*, *P. elachistus*, *P. hamatus*, *P. holdemani*, *P. italiensis*, *P. lepidus*, *P. nanus*, *P. neoamplycephalus*, *P. similis*), nematodos de lesión (o de pradera) (*Pratylenchus* spp., *P. alleni*, *P. brachyurus*, *P. coffeae*, *P. convallariae*, *P. crenatus*, *P. flakkensis*, *P. goodeyi*, *P. hexincisus*, *P. leioccephalus*, *P. minyus*, *P. musicola*, *P. neglectus*, *P. penetrans*, *P. pratensis*, *P. scribneri*, *P. thornei*, *P. vulnus*, *P. zaeae*), nematodos de la agalla del tallo (*Pterotylenchus cecidogenus*), nematodos del quiste del césped (*Punctodera punctate*), nematodos de atrofia (*Quinisulcius acutus*, *Q. capitatus*), nematodos excavadores (*Radopholus* spp.), nematodos de la raíz del platanero (*R. similis*), nematodos de la raíz del arroz (*R. oryzae*), nematodos de anillo rojo (o del cocoo palmera cocotera) (*Rhadinaphelenchus cocophilus*), nematodos reniformes (*Rotylenchulus* spp., *R. reniformis*, *R. parvus*), nematodos de espiral (*Rotylenchus* spp., *R. buxophilus*, *R. christiei*, *R. robustus*), nematodos lanza de Thome (*R. uniformis*), *Sarisodera hydrophylla*, nematodos de espiral (*Scutellonema* spp., *S. blaberum*, *S. brachyurum*, *S. bradys*, *S. clathricaudatum*, *S. christiei*, *S. conicephalum*), nematodos de las agallas de la raíz del césped (*Subanguina radicola*), nematodos quísticos circulares (*Thecavermiculatus andinus*), nematodos de la raíz voluminosa (*Trichodorus* spp., *T. christiei*, *T. kurumeensis*, *T. pachydermis*, *T. primitivus*), anguilas del vinagre (o nematodos) (*Turbatrix acetii*), nematodos de atrofia (o estilete) (*Tylenchorhynchus* spp., *T. agri*, *T. annulatus*, *T. aspericutis*, *T. claytoni*, *T. ebriensis*, *T. elegans*, *T. golden*, *T. graciliformis*, *T. martini*, *T. mashhoodi*, *T. microconus*, *T. nudus*, *T. oleraceae*, *T. penniseti*, *T. punensis*), nematodos de los cítricos (*Tylenchulus semipenetrans*), nematodos daga (*Xiphinema* spp., *X. americanum*, *X. bakeri*, *X. brasiliense*, *X. brevicolle*, *X. chambersi*, *X. coxi*, *X. diversicaudatum*, *X. index*, *X. insigne*, *X. nigeriense*, *X. radicola*, *X. setariae*, *X. vulgariae*, *X. vuittenezi*). En otra realización aún más particular, los nematodos, incluyendo, aunque sin limitación, *Meloidogyne incognita* (nematodos noduladores de la raíz), así como *Globodera rostochiensis* y *Globodera pallida* (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* (nematodo del quiste del cereal) y *Rotylenchulus reniformis* (nematodos reniformes) (*Pratylenchus* spp.) (nematodos de lesión), *Belonolaimus* sp. (nematodo de aguijón), *Hoplolaimus* sp. (nematodo lanza), *Bursapkaienckus* spp., (por ejemplo, nematodos de la madera del pino), *Ditylenchus* spp. (por ejemplo, nematodos del tallo).

Se proporciona la aplicación de una cantidad eficaz de control plaguicida de un cultivo sustancialmente puro, o caldo de células completas o sobrenadante, fracción celular derivada de *Flavobacterium* sp. H492 (n.º de acceso a NRRL B-50584) o la aplicación de combinaciones de lo anterior. El cultivo sustancialmente puro, caldo de células completas, sobrenadante, expuestos anteriormente se aplica, en solitario o en combinación con otra sustancia plaguicida, en una cantidad eficaz de control de plagas o plaguicida. Una cantidad eficaz se define como aquella cantidad de células de microorganismo, sobrenadante, caldo de células completas, filtrado, fracción celular o extracto, metabolito y/o compuesto en solitario o en combinación con otra sustancia plaguicida que es suficiente para modular la infestación por plagas. La tasa eficaz puede verse afectada por la especie de plaga presente, la fase del crecimiento de la plaga, la densidad de población de plaga y factores ambientales tales como la temperatura, velocidad del viento, lluvia, momento del día y estacionalidad. La cantidad que estará dentro de un intervalo eficaz en un caso particular puede determinarse por ensayos de laboratorio o de campo.

Dichas composiciones, cultivo sustancialmente puro, caldo de células completas, sobrenadante, expuestos anteriormente puede usarse para modular o más particularmente promover el crecimiento de plantas e incluso más particularmente promover el establecimiento prematuro de las raíces de dichas plantas.

Las composiciones, cultivos, sobrenadantes, un cultivo sustancialmente puro, caldo de células completas o sobrenadante derivado de *Flavobacterium* sp. expuestos anteriormente también pueden usarse para modular la germinación de una o más semillas en una o más plantas. En particular, el efecto modulador del crecimiento de dichas composiciones, un cultivo sustancialmente puro, caldo de células completas o sobrenadante expuestos anteriormente pueden determinarse usando métodos conocidos en la técnica, que pueden incluir, aunque sin limitación, recuentos de plantas por maceta, altura de los brotes (cm), peso de los brotes secos (g), peso de las raíces frescas (g), valoración del vigor de la planta, valoración de las raíces usando una escala para evaluar la salud de las raíces.

Las composiciones expuestas anteriormente pueden modular la infestación por plagas por varios mecanismos. Estos incluyen, aunque sin limitación, exterminación de dichas plagas en diversas fases del ciclo vital (huevos, larvas o adultos) o afectando la motilidad de dichas plagas.

Dicho producto formulado puede usarse en solitario o simultáneamente con el otro componente o componentes expuestos anteriormente, tales como agentes que promueven el crecimiento en una mezcla en depósito o en un programa (aplicación secuencial llamada rotación) con un orden predeterminado e intervalo de aplicación durante la

temporada de cultivo. Cuando se usa en una combinación con los

productos mencionados anteriormente, a concentración inferior a la recomendada en la etiqueta del producto, la eficacia combinada de los dos o más productos es, en una realización preferida, mayor que el efecto de cada componente individual añadidos juntos. Por tanto, el efecto se potencia por sinergia entre estos dos (o más) productos, y se reduce el riesgo de desarrollo de resistencia al plaguicida entre las cepas patógenas de plantas.

Las composiciones expuestas anteriormente pueden aplicarse por inmersión de las raíces en trasplante, específicamente tratando una fruta u hortaliza con la composición sumergiendo las raíces de la fruta u hortaliza en una suspensión de dicha composición (de aproximadamente un 0,25 a aproximadamente un 1,5 % y más particularmente de aproximadamente un 0,5 % a aproximadamente un 1,0 % en volumen por volumen) antes de trasplantar la fruta u hortaliza a la tierra.

Como alternativa, la composición puede aplicarse por goteo u otro sistema de irrigación. Específicamente, la composición de *Flavobacterium* puede inyectarse en un sistema de irrigación por goteo. En una realización particular, la composición puede aplicarse a una tasa de aproximadamente 25,72 a 9,35 litros por hectárea (de 11 a 4 cuartos por acre).

En otra realización más, la composición puede añadirse como una aplicación en surco. Específicamente, la composición puede añadirse como una pulverización en surco al cultivo usando pulverizadores calibrados para suministrar un rendimiento total de 18,7 - 56,1 litros/hectárea (2 - 6 galones/acre). Los pulverizadores se colocan en el arado en la sembradora de modo que la aplicación del plaguicida y la caída de la semilla en el surco sean simultáneas. Las mezclas expuestas anteriormente y, cuando sea apropiado, se prepara un adyuvante sólido o líquido de manera conocida. Por ejemplo, las mezclas pueden prepararse mezclando homogéneamente y/o moliendo los ingredientes activos con diluyentes tales como disolventes, vehículos sólidos y, cuando sea apropiado, compuestos tensoactivos (tensoactivos). Las composiciones también pueden contener además ingredientes tales como estabilizantes, reguladores de la viscosidad, aglutinantes, adyuvantes, así como fertilizantes u otros ingredientes activos para obtener efectos especiales.

### 30 Ejemplos

La composición y los métodos expuestos anteriormente se ilustrarán adicionalmente en los siguientes ejemplos no limitantes.

### 35 Ejemplo 1: Aislamiento e identificación del microorganismo

#### **Aislamiento del microorganismo**

Se asiló *Flavobacterium* sp. cepa H492 de una muestra de material vegetal en descomposición de una playa de Hawái. La bacteria se recuperó de la muestra por métodos tradicionales de dilución en placa como se describe por Lorch et al., (1995). En resumen, la muestra se resuspendió en agua desionizada estéril. Se prepararon diluciones en serie de la muestra resuspendida en agua estéril. Algunas de estas diluciones se propagan en placas de agar (por ejemplo, agar con dextrosa de patata) y se incubaron en la oscuridad y a temperatura ambiente. Después de varios días de incubación, las colonias se recuperaron de la superficie de la placa de agar.

El aislado crece como colonias pequeñas transparentes, que desarrollan un pigmento translúcido de rojizo a naranja a lo largo del tiempo. La bacteria aislada es una bacteria con forma de varilla gramnegativa.

#### **Identificación del microorganismo**

El aislado se identificó como una especie de *Flavobacterium* mediante amplificación por PCR y secuenciación del gen de ARNr 16S usando cebadores bacterianos universales.

El crecimiento de una placa de PDA (agar con dextrosa de patata) de 24 horas se raspó con un inóculo estéril y se resuspendió en tampón de extracción de ADN. El ADN se extrajo usando un kit de extracción de ADN microbiano MoBio Ultra Clean. El extracto de ADN se comprobó para la calidad/cantidad procesando una alícuota de 5 µl en un gel de agarosa al 1 %.

Las reacciones de PCR para la amplificación del gen de ARNr 16S se establecieron combinando 2 µl del extracto de ADN limpio con 25 µl de GoTaq Green Mastermix, 1,5 µl de cebador directo (SEQ ID NO:1) y 1,5 µl de cebador inverso (SEQ ID NO:2). El volumen de reacción se compensó hasta 50 µl usando agua sin nucleasa estéril. La reacción de PCR se procesó en una máquina termocicladora en las siguientes condiciones: 10 minutos a 95 °C (desnaturalización inicial), 30 ciclos de 45 segundos a 94 °C, 45 segundos a 55 °C y 2 minutos a 72 °C, seguido por 5 minutos a 72 °C (prolongación final) y una temperatura de mantenimiento final de 10 °C.

El tamaño, calidad y cantidad del producto de PCR se evaluaron procesando una alícuota de 5 µl en un gel de agarosa

al 1 %, y comparando la banda del producto con una escala de masa. Se retiró el exceso de cebadores, nucleótidos, enzima y molde del producto de PCR usando el kit de limpieza de PCR MoBio. El producto de PCR limpio se sometió a secuenciación directa usando los cebadores descritos anteriormente. Las secuencias directa (SEQ ID NO:3) e inversa (SEQ ID NO:4) se alinearon usando el programa informático BioEdit, y se creó una secuencia consenso de 1416 pb.

La secuencia consenso del gen de ARNr 16S de *Flavobacterium* sp. H492 se comparó con las secuencias disponibles de representantes del dominio bacteriano usando BLAST. La cepa H492 está muy relacionada con miembros del género *Flavobacterium*. La coincidencia más cercana fue con un clon bacteriano no cultivado (número de acceso FJ716008.1) con un 97 % de similitud. La cepa H492 mostró <97 % de similitud con otros miembros conocidos del grupo *Flavobacterium*.

### Condiciones de crecimiento

Se evaluó el crecimiento de *Flavobacterium* sp. H492 en agar con dextrosa de patata a 16, 25, 30 y 37 °C, en agar de soja tréptica a pH 4-12 a incrementos de 0,5 unidades y en L-agar con concentraciones de NaCl de un 0, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4 y 5 %. El crecimiento se produce a 25 y 30 °C, pero no a 16 y 37 °C, 0-1 % de NaCl y a pH 5,5-8,5 (óptimo entre pH 6 y 8). Fue positivo en el ensayo de pigmento de tipo flexirrubina. No absorbió rojo Congo. Fue positivo a oxidasa y negativo a catalasa. Se hidrolizó caseína, almidón, CM-celulosa, pectina y ADN, pero no alginato de sodio y quitina. No se produjo pigmento pardo difundible en el agar con L-tirosina. El crecimiento se produce en agares PDA, NA, TSA, R2A, Anacker y de Ordal, LB, Mueller-Hinton y Czapek Dox, pero no se produce crecimiento en agar marino 2216, agar MacConkey y agar MRS.

### Caracterización

El aislado se caracterizó usando varios procedimientos convencionales incluyendo tinción Gram, producción de catalasa y oxidasa (ensayos comerciales, Difco) e hidrólisis de caseína (Atlas 2010 "Handbook of Microbiological Media", modificada al 5 % p/v), almidón (1 % p/v), CM-celulosa (1 % p/v), quitina (1 % p/v), pectina (1 % p/v) y ADN (usando el ensayo de DNasa en agar con verde metilo, Difco). Se evaluó la absorción de rojo Congo y se evaluó la producción de pigmentos de tipo flexirrubina observando un cambio de color de las colonias cuando se anegaban con KOH al 20 % (Bernardet et al., 2002). El crecimiento se evaluó en agar marino 2216 (Difco), agar nutriente (Difco), agar con soja y triptona (Remel), R2A (Difco), Anacker y agar de Ordal (Atlas 2010 "Handbook of Microbiological Media"), agar MacConkey (Difco), agar MRS (Difco) y agar Czapek Dox (Atlas 2010 "Handbook of Microbiological Media").

Se evaluaron las características bioquímicas y fisiológicas usando los sistemas API ZYM y API 20NE (bioMerieux) siguiendo las instrucciones del fabricante.

La actividad enzimática se detecta para fosfatasa alcalina, esterasa C4, esterasa lipasa C8 (débil), leucina arilamidasa, valina arilamidasa, fosfatasa ácida, naftol-AS-BI-fosfahidrolasa, β-galactosidasa (débil), α-glucosidasa y β-glucosidasa, pero no lipasa C4, cisteína arilamidasa, tripsina, α-quimotripsina, α-galactosidasa, β-glucuronidasa, N-acetil-β-glucosaminidasa, α-manosidasa y α-fructosidasa (API ZYM). Dio reacción positiva débil para β-galactosidasa, pero reacciones negativas para reducción de nitrato, producción de indol, fermentación de glucosa, arginina dihidrolasa, ureasa, hidrólisis de aseculina e hidrólisis de gelatina. Asimila D-glucosa, D-manosa, N-acetil-glucosamina y D-maltosa, pero no L-arabinosa, D-manitol, gluconato de potasio, ácido cáprico, ácido adípico, ácido málico, citrato de trisodio o ácido fenilacético (API 20NE).

### Composición de ácidos grasos

Después de incubación durante 24 horas a 28 °C, se recogió un inóculo completo de células que han crecido bien y se prepararon los ésteres metílicos de ácido graso, se separaron e identificaron usando el sistema de identificación microbiano de Sherlock (MIDI) como se describe por Vandamme et al., (1992). Los ácidos grasos predominantes presentes en la *Flavobacterium* sp. H492 se muestran en la tabla 1 a continuación:

Tabla 1: Composición de ácidos grasos de *Flavobacterium* sp. H492

FAME	Porcentaje	FAME2	Porcentaje
13:0 iso	0,27	15:0 anteiso	1,49
13:1 a 12-13	0,16	15:1 w6c	0,74
14:0	0,77	16:1 iso H	0,29
15:1 iso G	5,22	Suma en la propiedad 2	0,45
15:0 iso	34,96	16:0 iso	0,64
Suma en la propiedad 3	9,97	16:0 iso 3OH	1,18
16:1 w5c	0,41	16:0 3OH	2,11

FAME	Porcentaje	FAME2	Porcentaje
16:0	3,73	18:1 w9c	0,65
15:0 iso 3OH	9,77	17:0 iso 3OH	15,24
15:0 2OH	0,19	17:0 2OH	0,34
Suma en la propiedad 9	7,51	17:1 w8c	0,28
Suma en la propiedad 4	1,68	17:1 w6c	0,69
17:0 iso	1,28		

Una comparación de la composición de ácidos grasos de *Flavobacterium* sp.H492 con los de cepas microbianas conocidas en la base de datos MIDI sugirió que los ácidos grasos en la cepa novedosa de *Flavobacterium* sp. H492 eran más similares con los de *Flavobacterium johnsoniae* (índice de similitud de 0,5) y *Flavobacterium hydatis* (índice de similitud de 0,307).

### Resistencia a antibióticos

Se ensayó la susceptibilidad a antibióticos de *Flavobacterium* sp. H492 usando discos de antibiótico en medio Muller-Hinton como se describe en la hoja de datos técnicos en PML Microbiological's n.º 535. Los resultados obtenidos después de incubación de 48 horas a 25 °C se presentan en la tabla 2.

**Tabla 2: Susceptibilidad de *Flavobacterium* sp. H492 a diversos antibióticos**

	Concentración (ug)	Susceptible
Tetraciclina	30	+++
Kanamicina	30	-
Eritromicina	15	+++
Estreptomina	10	++
Penicilina	10	+++
Ampicilina	10	+++
Oxitetraciclina	30	+++
Cloranfenicol	30	+++
Ciprofloxacina	5	+++
Gentamicina	10	++
Piperacilina	100	+++
Cefuroxima	30	-
Imipenem	10	+++
Sulfametoxazol-Trimetoprim	23,75/25	++

+++ : muy susceptible; ++ : moderadamente susceptible; + : susceptible; - : no susceptible

### 15 Producción de *Flavobacterium* sp. H492 por fermentación

#### Hibridación de ADN-ADN

También se identificó la secuencia consenso de *Flavobacterium* sp. H492 usando el servidor EzTaxon-e (<http://eztaxone.ezbiocloud.net/>; Kim et al., 2012) basándose en los datos de secuencia de ARNr 16S. Las coincidencias principales estaban todas en el umbral para diferenciación de especies. Se seleccionaron *Flavobacterium defluvii* y *Flavobacterium johnsoniae* para experimentos de hibridación de ADN-ADN.

Las células se alteraron usando un Constant Systems TS 0.75 KW (IUL Instruments, Alemania) y se purificó el ADN en el lisado crudo por cromatografía en hidroxipatita como se describe por Cashion et al., (1977). La hibridación de ADN-ADN se realizó como se describe por De Ley et al., (1970) considerando las modificaciones descritas por Huss et al., (1983) usando un modelo Cary 100 Bio de espectrofotómetro de UV/VIS equipado con un cambiador multicelular 6 x 6 Peltier-termoregulado y un controlador de la temperatura con una sonda de temperatura *in situ* (Varian). Los resultados se muestran en la tabla 3 a continuación.

**Tabla 3: Comparación de secuencia de ADN de *Flavobacterium* H492, *johnsoniae* y *defluvii***

% de similitud de ADN-ADN (en SSC 2 x a 63 °C)	<i>Flavobacterium</i> sp cepa H492
<i>Flavobacterium johnsoniae</i> DSM 2064 <sup>T</sup>	30,7 (29,4)
<i>Flavobacterium defluvii</i> DSM 17963 <sup>T</sup>	8,3 (15,2)

(Los valores en paréntesis son resultados de mediciones por duplicado)

*Flavobacterium* sp cepa H492 no pertenecía a la especie *Flavobacterium johnsoniae* DSM 2064<sup>T</sup> (ID 12-1016) ni a la especie *Flavobacterium defluvii* DSM 17963<sup>T</sup> cuando se consideran las recomendaciones de un valor umbral de un 70 % de similitud de ADN-ADN para la definición de especies bacterianas por el comité especial (Wayne et al., 1987).

5 Basándose en los datos bioquímicos, de ácidos grasos, de ARNr 16S y de hibridación recogidos, parece que *Flavobacterium* sp. H492 es una nueva especie dentro del género *Flavobacterium*, y que es diferente a cualquier otra especie de *Flavobacterium* en vigor descrita hasta la fecha.

#### 10 **Producción de *Flavobacterium* sp H492 por fermentación**

Se produjo un sobrenadante con actividad nematocida mediante fermentación sumergida de la cepa H492 en condiciones aeróbicas y en medio V8 líquido.

15 Se inició una placa de siembra estriando una placa de agar con dextrosa de patata fresca con una pequeña cantidad de cepa H492 usando un inóculo estéril. La placa se incubó a 25 °C durante 2-3 días o hasta que fue evidente suficiente biomasa sobre la superficie de la placa.

20 Se inoculó un matraz de siembra de 50 ml de medio V8 con un inóculo completo de material recogido de la superficie de la placa de agar. La siembra se incubó en un agitador a 200 rpm durante 2 días.

Se inoculó de forma aséptica un matraz Fernbach sin deflectores, de vidrio de 2,8 l que contenía 500 ml de medio V8, con un 2 % de siembra. Se permitió que la fermentación continuara a 25 °C durante 5 días con agitación constante a 150-200 rpm.

25 El sobrenadante se obtuvo por separación de las células del caldo de fermentación usado por centrifugación, u otro medio de separación.

La actividad del sobrenadante se verificó mediante el bioensayo descrito a continuación.

#### 30 **Ensayo de respuesta a dosis in vitro contra *Meloidogyne incognita***

Para evaluar la eficacia y estabilidad de *Flavobacterium* sp.H492, se ensayó un caldo de células completas (WCB) a diferentes tasas de dilución con agua: 100 % = 100 µl de WCB; 70 % = 70 µl de H492: 30 µl de agua; 50 % = 50 µl de H492: 50 µl de agua; 20 % = 20 µl de H492: 80 µl de agua. En este bioensayo, los juveniles se expusieron a los tratamientos indicados durante 24 horas y después se transfirieron a placas de 6 pocillos que contenían agar acuoso al 1,2 % durante 24 horas adicionales para medir finalmente su movimiento. Este experimento está diseñado para medir la motilidad de los juveniles basándose en el número de juveniles tratados que se mueven de una gota inicial que se coloca en la placa de 6 pocillos donde se ensaya cada tratamiento en 6 réplicas: Una exposición inicial de 100 µl de cada muestra microbiana se distribuye en su pocillo correspondiente seguido de adición de 50 µl de solución de nematodos que contiene aproximadamente 300 nematodos. Veinticuatro horas después del tratamiento inicial, los juveniles se transfieren a placas de 6 pocillos que contienen agar acuoso al 1,2 % que se incuban durante otras 24 horas a 25 °C. Se calcula el porcentaje de inmotilidad basándose en el número inicial de juveniles transferidos. El porcentaje de inmotilidad se calcula basándose en el número inicial de juveniles transferidos. Los resultados se muestran en la figura 1 e indican que las diluciones de H492 al 100 %, al 70 %, al 50 % y al 20 % muestran un control de la respuesta a dosis para juveniles de *M. incognita* en comparación con las mismas diluciones de marcador de tasa avid.

#### 50 **Ejemplo 2: Actividad nematocida de sobrenadante de *Flavobacterium* sp. H492 en presencia de planta hospedadora**

##### **Ensayo de plántulas en agar: *Meloidogyne incognita* en pepino**

55 Para evaluar el efecto del sobrenadante de H492 en J2 de *M. incognita*, se realizó el siguiente ensayo en placas de Petri de 60 mm de diámetro.

Se germinaron semillas de pepino (*Cucumis sativus*, cv. White Wonder) en papel de seda húmedo en placas de Petri a temperatura ambiente. Una semana después, las plántulas germinadas se transfirieron a agar acuoso en placas de Petri a una tasa de una plántula por placa. Se añadió una alícuota de 300 µl de sobrenadante de fermentación de *Flavobacterium* sp. H492 en cada placa después de lo cual se añadieron 300 J2 de *M. incognita* en 150 µl de agua desionizada. Las placas de Petri se cubrieron e incubaron a 25 °C durante 7 días. Se usó agua, blanco de medio y avid (0,1 %) como controles negativo y positivo, respectivamente. El efecto de cada sustancia en la patogenicidad de nematodos se comprobó después de 7 días contando el número de agallas en raíces de pepino. El número de agallas en cada tratamiento se calculó como un % del control de agua. Los experimentos se procesaron por duplicado.

El sobrenadante de *Flavobacterium* sp. H492 redujo significativamente el número de agallas en raíces de pepino en comparación con el control de agua en ambos ensayos. Se observó más de un 80 % de reducción de agallas, lo que indica que H492 es eficaz contra *M. incognita* en pepino.

5

#### Ensayo de plántulas en agar: *Meloidogyne hapla* en tomate

Para evaluar el efecto del sobrenadante principal de H492 en J2 de *M. hapla*, se realizó el siguiente ensayo en placas de Petri de 90 mm de diámetro. Se germinaron semillas de tomate (cv. UC 82) en papel seda húmedo en placas de Petri a temperatura ambiente. Una semana después, las plántulas germinadas se transfirieron a agar acuoso en placas de Petri a una tasa de 4 plántulas por placa. Se añadió una alícuota de 300 µl de sobrenadante de H492 a cada placa después de lo cual se distribuyeron 700 J2 de *M. hapla* en 150 µl de agua desionizada. Se distribuyeron soluciones líquidas uniformemente alrededor de las cuatro plántulas. Las placas de Petri se cubrieron e incubaron a 25 °C durante 96 horas. Se usó agua y avid (0,5 %) como controles negativo y positivo, respectivamente. Se comprobó el efecto de cada compuesto sobre la motilidad de los nematodos después de 96 horas registrando el número de nematodos móviles en cada tratamiento y la tasa de mortalidad relativa se comparó con el control de agua. Las raíces de tomate se tiñeron (Thies et al., 2002) y se observó la infección de juveniles en las raíces bajo un microscopio compuesto a aumento 100 x.

10

15

20

Los juveniles se detectaron únicamente en las raíces del control de agua. No se observó infección por nematodos en otros tratamientos. El sobrenadante de H492 redujo significativamente el número de nematodos móviles en comparación con el control de agua (tabla 4). H492 puede inmovilizar los juveniles de nematodos de nudos de las raíces y protege a las plantas de su infección.

25

**Tabla 4. Efectos de sobrenadante de *Flavobacterium* sp. H492 en *Meloidogyne hapla* en tomate en un ensayo de agar acuoso.**

Tratamiento	N.º de J2 móviles/placa	Tasa de mortalidad relativa (%) <sup>z</sup>
H492	140 ± 17 b	44 ± 7 b
Avid (0,5 %)	105 ± 25 b	60 ± 10 b
Agua	248 ± 35 a	0 ± 10 a

Las medias seguidas por la misma letra en la misma columna no son diferentes, de acuerdo con la mínima diferencia significativa de Fisher a  $P \leq 0,05$ ; <sup>z</sup> tasa de mortalidad de nematodos respecto al control de agua.

#### Recuperación de *Meloidogyne hapla* después de exposición a sobrenadante de *Flavobacterium* sp. H492

30

Para evaluar el efecto de sobrenadante de H492 sobre la motilidad y la posterior recuperación de J2 de *M. hapla*, se realiza el siguiente ensayo en placas de cultivos celular de plástico de 96 pocillos.

35

Se añade una alícuota de 50 µl de cada solución de ensayo en pocillos apropiados después de lo cual se añaden 50 nematodos distribuidos en 30 µl de agua desionizada en cada pocillo. La placa se cierra con una tapa y se incuba a 25 °C durante 72 horas. Se usa agua y Avid (1 %) como controles negativo y positivo, respectivamente. Se comprueba el efecto de cada compuesto sobre la motilidad de los nematodos después de 24, 48 y 72 horas añadiendo una gota de NaOH 1 N en cada pocillo, y se registra la proporción de nematodos móviles en cada tratamiento usando una escala del 0 al 100 %. Para evaluar la recuperación de la motilidad en cada tratamiento, se retira un volumen de 70 µl de cada pocillo y la solución restante en cada pocillo se diluye añadiendo 100 µl de agua desionizada. Las placas se incuban de nuevo durante 24 horas como se describe anteriormente, después de lo cual se realiza la segunda evaluación de la motilidad. Hay tres réplicas para cada tratamiento y el estudio se realiza dos veces.

40

45

Los resultados se muestran en la tabla 5 para todos los tiempos de exposición después del lavado. El porcentaje de nematodos móviles (también mencionados como "con movilidad") expuestos al sobrenadante de H492 se disminuyó con el tiempo aumentado de incubación, y la tasa más baja de un 17,5 % se observó 72 horas después de la incubación. El sobrenadante de H492 reduce la motilidad de J2 de nematodos nodulares de la raíz y su efecto puede durar al menos durante 72 horas.

**Tabla 5. Tasa de recuperación porcentual de *Meloidogyne hapla* después de 24, 48 y 72 horas de incubación con sobrenadante de *Flavobacterium* sp. H492.**

Candidato	24	24-24	48-24	72-24
Agua	95 ± 3,2 a	97,5 ± 2,7 a	95 ± 4,5 a	90 ± 4,5 a
Avid (1 %)	10 ± 4,5 d	13,3 ± 2,6 d	11,7 ± 2,6 d	10 ± 4,5 d
H492 (3303-52)	45 ± 5,5 c	45 ± 5,5 c	22,5 ± 2,7 c	17,5 ± 2,7 c

Los datos son las medias de dos estudios. Las medias seguidas de la misma letra en la misma columna no son significativamente diferentes, de acuerdo con la mínima diferencia significativa de Fisher a  $P \leq 0,05$ . 24: Observación hecha directamente 24 h después de incubación en sobrenadante de H492 24-24: Incubación durante 24 h en la solución de cada tratamiento y después 24 h en agua 48-24: Incubación de 48 h en la solución de cada tratamiento y después 24 h en agua 72-24: incubación de 72 h en la solución de cada tratamiento y después 24 h en agua

**Motilidad de *Meloidogyne hapla* después de exposición a sobrenadante de *Flavobacterium* sp. H492 a niveles de pH**

5 Para evaluar el efecto de cambiar el pH del sobrenadante de H492 sobre la motilidad de J2 de *M. hapla*, se realiza el siguiente ensayo en placas de cultivos celular de plástico de 96 pocillos.

10 Se añade una alícuota de 50 µl de cada solución de ensayo en pocillos apropiados después de lo cual, se añadió la cantidad apropiada de HCl o NaOH 1 N para ajustar el pH de las soluciones de ensayo en el intervalo de 3 a 12 como se enumera en la tabla 5. Se distribuyeron cincuenta nematodos juveniles (J2) en 30 µl de agua desionizada y se añadieron en cada pocillo, la placa se cierra con una tapa y se incuba a 25 °C durante 24 horas. Se comprueba el efecto de cada tratamiento sobre la motilidad de los nematodos después de 24 horas añadiendo una gota de NaOH 1 N en cada pocillo, y se registra la proporción de nematodos móviles en cada tratamiento usando una escala del 0 al 100 %. Hay tres réplicas para cada tratamiento y este estudio se realizó dos veces.

15 Tanto aumentando como disminuyendo los valores de pH del sobrenadante de H492 se redujo el porcentaje de nematodos móviles (tabla 6). Sin embargo, aumentando el nivel del pH se inmovilizaron los nematodos más que disminuyéndolo, con la mínima motilidad a pH = 12. Se observó menor motilidad a pH = 10 que a pH = 5. En conclusión, las condiciones alcalinas tuvieron un efecto más fuerte que las ácidas en la supresión o inmovilización de nematodos.

**Tabla 6. Efectos de cambios de pH en el sobrenadante de *Flavobacterium* sp. H492 sobre la motilidad de *Meloidogyne hapla***

Candidato	pH				
	3	5	8,4	10	12
H492 (3303-52)	46,7 ± 6,1 a	39,2 ± 5,8 b	50,8 ± 7,4 a	9,2 ± 3,8 c	6,7 ± 2,6 c
Medio	95 ± 3,2 a	85 ± 7,7 b	85 ± 4,5 b	75 ± 8,9 c	18 ± 2,2 d

Los datos son las medias de dos estudios. Las medias seguidas por la misma letra en la misma columna no son diferentes, de acuerdo con la mínima diferencia significativa de Fisher a  $P \leq 0,05$ .

25 **Ensayo en maceta en invernadero: Pepino con *Meloidogyne incognita***

30 Para demostrar la actividad nematocida del sobrenadante de H492, se realizó un estudio en invernadero en pepino (cv. White Wonder) usando un sobrenadante como producto de ensayo para controlar *M. incognita*. Se plantó una planta de pepino por maceta en arena porosa y se cultivaron en invernadero con luz diurna natural. Cada maceta con una planta de dos semanas de edad se trató con una alícuota de 20 µl del producto de ensayo, después de lo cual se inocularon 2000 J2 de *M. incognita* eclosionadas en cada maceta. Una semana después, se aplicó un segundo tratamiento de 20 ml del producto de ensayo. Se usó agua y avid (0,1 %) como controles negativo y positivo, respectivamente. Hubo cinco réplicas y el experimento se dispuso en un diseño en bloques aleatorizados completos. Se permitió que las plantas crecieran en un invernadero durante cuatro semanas más, después de lo cual cada planta se recogió y evaluó para los pesos de brotes y raíces frescos. Se registró el número de nematodos en cada maceta y las agallas de las raíces en cada planta. Se realizó análisis estadístico (ANOVA), y se calcularon las diferencias estadísticas entre las medias del tratamiento a  $P \leq 0,05$ .

40 Los datos presentados en la tabla 7 a continuación muestran que aunque los pesos frescos de brotes y raíces de pepino no eran estadísticamente diferentes del control de agua sin tratar, las macetas tratadas con sobrenadante de H492 contenían significativamente menos nematodos que las macetas de control con agua sin tratar. El número de agallas de la raíz en el tratamiento con sobrenadante de H492 era significativamente menor que el del control de agua o blanco de medio. Se indicó que el sobrenadante de H492 era eficaz en la formación restrictiva de agallas por *M. incognita* en pepino.

**Tabla 7. Efectos del sobrenadante de *Flavobacterium* sp. H492 en *Meloidogyne incognita* en pepino en un ensayo en maceta en invernadero.**

Tratamiento	Peso del brote (g)	Peso de raíz (g)	Número de agallas	Número de nematodos
-------------	--------------------	------------------	-------------------	---------------------

Avid	15,2 ± 4,4	5,2 ± 2,1	0 ± 0 d	316 ± 193 b
Agua	21,1 ± 2,6	6,3 ± 1,2	29,0 ± 8,2 a	510 ± 256 a
H492 (7501-50)	16,9 ± 6,2	4,9 ± 1,0	7,8 ± 2,9 c	276 ± 195 b
Las medias seguidas por la misma letra en la misma columna no son diferentes, de acuerdo con la mínima diferencia significativa de Fisher a $P < 0,05$ .				

**Ensayo en maceta en invernadero: Pepino y tomate con *Meloidogyne hapla***

5 Se realizan estudios en invernadero en pepino (cv. White Wonder) y tomate (*Solanum lycopersicum*, cv. Roma) para demostrar la actividad nematocida del sobrenadante de *Flavobacterium* sp. H492 para el control de *M. hapla*. Se planta una semilla de pepino o tomate por maceta en arena porosa y se cultiva en un invernadero con luz diurna natural. Cada maceta con una plántula de pepino de dos semanas de edad o tomate de tres semanas de edad se trata con una alícuota de 40 µl del producto de ensayo, después de lo cual se inoculan 2000 J2 de *M. hapla* en cada maceta. 10 Una semana después, se aplica un segundo tratamiento del producto de ensayo a las macetas a la misma tasa que la primera vez. Se usa agua, medio y Avid (0,1 %) como controles negativo y positivo, respectivamente. Hay cinco réplicas y el experimento se dispone en un diseño en bloques aleatorizados completos. Las plantas se cultivan en un invernadero durante cuatro a seis semanas más, respectivamente para pepino y tomate, después de lo cual cada planta se recoge y evalúa para la altura de los brotes, los pesos frescos de los brotes y las raíces. Se clasificó el vigor de la planta y el índice de agallas de las raíces en una escala de 0 a 10, respectivamente con 0 = muerte, 10 = la mejor salud; y 0 = sin agalla, 10 = 100 % de agallas en la raíz. Se registró el número de nematodos en cada maceta. Se realiza análisis estadístico (ANOVA), y se calculan las diferencias estadísticas entre las medias del tratamiento a  $P \leq 0,05$ . 15

20 Los resultados en pepino y tomate en el ensayo uno se presentan en las tablas 8 y 9, respectivamente. El sobrenadante de *Flavobacterium* sp. H492 reduce significativamente el índice de agallas de las raíces en pepino y el número de nematodos en tomate en comparación con el control de ensayo. En el ensayo dos, el índice de agallas de las raíces causado por *M. hapla* se reduce en pepino, pero no en tomate (tablas 10 y 11). Ambos ensayos sugirieron que el sobrenadante de *Flavobacterium* sp. H492 puede reducir el número de agallas en plantas con *M. hapla*.

25 **Tabla 8. Efectos del sobrenadante de *Flavobacterium* sp. H492 en *Meloidogyne hapla* en pepino en un ensayo de maceta en invernadero**

Tratamiento	Vigor de la planta <sup>y</sup>	Índice de agallas en la raíz <sup>z</sup>	Número de J2
H492	4 ± 1 a	6 ± 3 b	5033 ± 1662 a
Avid (1 %)	0 ± 0 b	0 ± 0 c	0 ± 0 b
Agua	1 ± 1 ab	8 ± 1 a	5467 ± 611 a
Las medias seguidas por la misma letra en la misma columna no son diferentes, de acuerdo con la mínima diferencia significativa de Fisher a $P \leq 0,05$ . <sup>y</sup> Vigor de la planta en una escala de 0 -10: 0: muerte, 10: la mejor salud. <sup>z</sup> Índice de agallas en la raíz en una escala de 0 -10: 0: sin agalla, 10: 100 % de agallas en la raíz.			

**Tabla 9. Efectos del sobrenadante de *Flavobacterium* sp. H492 en *Meloidogyne hapla* en tomate en un ensayo en maceta en invernadero:**

Tratamiento	Altura del brote (cm)	Peso del brote (g)	Peso de raíz (g)	Índice de agallas en la raíz	Número de nematodos
H492 (3303-52)	20 ± 6 b <sup>z</sup>	10 ± 1 b	2,5 ± 1	2 ± 1	175 b
Avid (1%)	8 ± 8c	1 ± 1 c	0,4 ± 1	0 ± 0	0 c
Agua	28 ± 6 ab	14 ± 4 b	4,2 ± 1	2 ± 1	325 a
Las medias seguidas por la misma letra en la misma columna no son diferentes, de acuerdo con la mínima diferencia significativa de Fisher a $P \leq 0,05$ .					

30 **Tabla 10. Efectos del sobrenadante de *Flavobacterium* sp. H492 en *Meloidogyne hapla* en pepino ensayo en maceta en invernadero (Ensayo I)**

Tratamiento	Peso superior	Peso de la raíz	Índice de agallas en la raíz	Número de nematodos
-------------	---------------	-----------------	------------------------------	---------------------

Avid (1 %)	16,1 ± 4,5 a	4,9 ± 2,5 a	0,2 ± 0,4 d	1180 ± 920 c
Agua	5,9 ± 1,2 b	0,5 ± 0,3 b	7,2 ± 1,3 a	2580 ± 934 ab
H492 (3303-52)	9,0 ± 2,5 b	2,0 ± 0,9 b	3,2 ± 0,8 c	1840 ± 856 bc
Las medias seguidas por la misma letra en la misma columna no son diferentes, de acuerdo con la mínima diferencia significativa de Fisher a $P \leq 0,05$ .				

**Tabla 11. Efectos del sobrenadante de *Flavobacterium* sp. H492 en *Meloidogyne hapla* en tomate en un ensayo en maceta en invernadero (Ensayo II)**

Tratamiento	Peso superior	Peso de la raíz	Índice de agallas en la raíz	Número de nematodos
Avid (1 %)	16,9 ± 4,8 ab	6,2 ± 2,1 ab	0 ± 0 b	332 ± 385
Agua	14,1 ± 1,1 b	5,7 ± 1,7 b	4,1 ± 3,2 a	334 ± 241
H492 (3303-52)	16,4 ± 1,9 ab	7,3 ± 1,4 ab	4,6 ± 1,5 a	594 ± 374
Las medias seguidas por la misma letra en la misma columna no son diferentes, de acuerdo con la mínima diferencia significativa de Fisher a $P \leq 0,05$ .				

#### 5 Respuesta a dosis *in planta* de *Flavobacterium* sp. H492 sobre *M. incognita* usando pepino como hospedador vegetal

Se rellenaron tubos Falcon de 50 ml modificados con orificios en el fondo para permitir el empapamiento con mezcla de arena y tierra (1:2) y se empapó con 2 ml de diluciones de caldo de células completas H492 (10, 20, 30, 50, 70 y 100 %), avid (70 % de marcador de tasa) como control positivo y agua como control negativo, respectivamente. Después del empapamiento, se plantaron semillas de pepino (cv. SMR58) en los tubos y los tubos se inocularon con 800 huevos de *M. incognita*. Los tubos se recubrieron con parafina y se colocaron en una caja con toallitas de papel húmedas a alta humedad. Después de 4 días, la mayoría de las semillas germinaron y se retiró la cubierta de parafilm. Después de una semana, se aplicó la segunda dosis (1 ml de la muestra) a los tubos. El ensayo se terminó después de dos semanas y se registraron los siguientes parámetros: peso del brote fresco (FSW), peso de la raíz fresca (FRW), índice de agallas (escala de 1-10) y número de agallas por g de la raíz. En general, FSW y FRW no diferían significativamente entre los tratamientos. Sin embargo, fue apreciable una reducción tanto de FSW como de FRW en el caso de caldo de células completas de *Flavobacterium* sp. H492 aplicado a un 100 %. El índice de agallas se redujo en el caso de todas las concentraciones ensayadas de caldo de células completas de *Flavobacterium* sp. H492, excepto de la dilución mínima al 10 %, en comparación con el tratamiento de control de agua. Todas las concentraciones ensayadas de caldo de células completas de *Flavobacterium* sp. H492 redujeron el número de agallas por gramo de raíz en comparación con el control de agua. La actividad nematocida del caldo de células completas fue dependiente de la dosis y fue creciente con concentraciones crecientes de material (véase la figura 2-4).

#### 25 Inmovilización de nematodos de aguijón y lanza en tierra infestada

Estos ensayos se realizan con tierras de campo con nematodos de aguijón y lanza predominantemente. Cada ensayo tuvo 4 tratamientos: *Flavobacterium* sp. H492, blanco de medio de crecimiento, control positivo (es decir, avid al 0,1 %) y control negativo (es decir, agua). Estos ensayos son en diseño en bloque aleatorizado completo con 8 réplicas. Se recogieron doce litros de tierra que contenía el nematodo deseado, se limpió de hierba/raíces y se homogeneizó. Después de mezclar la tierra, se extraen cinco (100 cm<sup>3</sup>) muestras de tierra usando el método de centrifugación y flotación de azúcar y se contaron para asegurar que los nematodos principales de interés para estos ensayos estaban distribuidos uniformemente en toda la tierra. A continuación, se midieron alícuotas de 200 cm<sup>3</sup> de tierra y se colocaron en una maceta de plástico de 5,08 x 5,08 x 5,08 cm (2 x 2 x 2 pulgadas). Los tratamientos se aplican como un tratamiento de empapamiento (40 ml/maceta). Las macetas se colocan entonces en un banco de laboratorio y se dejan durante 72 horas de modo que los nematodos se expongan a los tratamientos. A continuación, la tierra de cada maceta se lava en un aparato Baermann modificado para la extracción de nematodos. Esto permite que los nematodos vivos se muevan de la tierra, a través de un filtro, al agua de modo que puedan contarse. Los nematodos muertos o inmóviles permanecen en la tierra. Después de incubar el Baermanns durante 96 horas, los nematodos vivos se recogieron y contaron. Los recuentos de nematodos de cada tratamiento se compararon con SAS 9.2 usando la separación de la media de LSD de Fisher a  $P \leq 0,05$  para todos los nematodos observados.

Se observan cuatro géneros de nematodos parasitarios de plantas en la primera tierra de campo usada para realizar el ensayo; *Belonolaimus* sp. (nematodo de aguijón), *Hoplolaimus* sp. (nematodo lanza), *Peltamigratus* sp. y *Scutellonema* sp. (nematodos de espiral). Los recuentos de nematodos de aguijón están aumentados en un 5 % en el tratamiento de medio de cultivo en comparación con el control negativo (agua) y estaba disminuido en un 10 % y un 14 % para H492 y Avid, respectivamente, en comparación con el control negativo de agua. Los recuentos de *Peltamigratus* sp. estaban disminuidos en un 32 %, 26 % y 88 % para el medio, H492 y avid, respectivamente, en

comparación con el control negativo de (agua). Los recuentos de *Scutellonema* sp. están inalterados en el tratamiento con medio de crecimiento en comparación con el control negativo (agua) y disminuidos en un 18 % y 75 % para H492 y avid, respectivamente. Se observan diferencias de tratamiento para nematodos lanza durante el ensayo. Los recuentos de nematodos lanza están disminuidos en un 35 %, 28 % y 69 % para el medio, H492 y avid, respectivamente, en comparación con el control de agua.

**Ejemplo 3: Ensayos de espectro de nematodos, efecto de caldo de células completas WCB de *Flavobacterium* sp. H492 contra nematodos noduladores de la raíz (RKN, *Meloidogyne incognita*), nematodos reniformes (*Rotylenchulus reniformis*), nematodos de lesión de la raíz (*Pratylenchus* spp.) y nematodos de los quistes de la soja (SCN, *Heterodera glycines*) y sobre el crecimiento de la planta y el vigor por tierra empapada**

Se incluyeron los tres siguientes tratamientos de tierra empapada en el ensayo de eficacia contra nematodo ensayado con 7 réplicas: (1) Tratamiento 1: control negativo (100 ml de agua); (2) Tratamiento 2: control positivo (de marcador de tasa Vapam en 100 ml de volumen final) y (3) Tratamiento 3: caldo de células completas de *Flavobacterium* sp. H492 (WCB, 100 ml por aplicación con 2 aplicaciones con una semana de diferencia).

Se pusieron 1000 gramos de tierra de campo infestado con *Meloidogyne incognita* (RKN), *Rotylenchulus reniformis*, *Pratylenchus* spp. y 1000 gramos de tierra estéril pero inoculada con 1100-1200 huevos de *Heterodera glycines* en 1 ml de agua cada uno en macetas cilíndricas de PVC. La tierra se empapa con los tres tratamientos vertiendo el material lentamente y cubriendo uniformemente la superficie de la tierra en la maceta. La tierra se prensa ligeramente para generar una superficie de nivel liso antes de la aplicación. Después del empapamiento, las macetas se cubren con, bolsas de 2 mil que son de 0,050 mm (0,002 pulgadas) de grosor, después del tratamiento y se sellan con una banda de caucho. La tierra se empapa de nuevo con WCB de *Flavobacterium* sp. H492 una semana después del primer empapamiento. Todas las macetas con la aplicación permanecen en el banco del invernadero hasta una semana después de la aplicación final. Antes de la siembra, se retiran 100 ml de muestra de tierra extraer los nematodos, incluyendo parásitos de plantas, omnívoros (es decir, *Dorylaimus* spp.) y otros nematodos que no son parasitarios para las plantas, usando el método de embudo de Baermann.

Cada maceta se siembra con el cultivo de ensayo correspondiente. Para nematodos RKN y nematodos reniformes, se siembran semillas de pepino; para nematodos de lesión de la raíz, maíz; para SCN, soja. Se siembran cinco semillas de cada cultivo en cada maceta. Las macetas se remplazan en el invernadero en un diseño de bloque aleatorizado completo con varias réplicas para cultivar el cultivo y hasta la recolección final y muestreo. Se cuentan los números de plantas 10 días después de la siembra. El experimento completo se incuba en el invernadero durante 5 semanas (para nematodos RKN, reniformes y de lesión de la raíz) y 7 semanas (para SCN).

Durante el periodo de incubación, también se controla el crecimiento de la planta y el vigor para observar si hay alguna indicación de que *Flavobacterium* H492 mejore la salud de la planta en comparación con los controles negativo y positivo. Por tanto, se miden los siguientes parámetros: (a) recuento de plantas por maceta; (b) recuento de nematodos en 100 ml de tierra en el muestreo final, incluyendo parásitos de plantas, *Dorylaimus* spp. y nematodos no parasitarios, con el método de embudo de Baermann (Dinaburg, 1942); (c) recuento de nematodos de raíces totales en el muestreo final; (d) altura de los brotes (cm); (e) peso de los brotes frescos (g); peso de la raíz fresca (g); (h) clasificación del vigor de la planta, usando una escala subjetiva de 1 a 5, con 1 como vigor deficiente de la planta, caracterizado por un crecimiento deficiente de la planta y hojas verde claro delgadas y 5 como mejor vigor de la planta, caracterizado por crecimiento saludable y hojas verde oscuro; (i) clasificación de las raíces usando una escala subjetiva de 1 a 5 para evaluar la salud de las raíces con 1 como la peor salud de las raíces, con un sistema radicular pequeño, oscuro y de aspecto insano y pocas ramificaciones, mientras 5 es un sistema radicular blanco de aspecto agradable y fibroso saludable sin necrosis oscura o parduzca; (j) índice de agallas (Bridge y Page, 1980; escala de 0 a 10) y números totales de agallas para RKN y (k) recuento de quistes para SCN.

Los datos se analizan con el programa Agricultural Research Management (ARM) para evaluar los resultados con una separación a un nivel de  $P = 0,05$  donde hay actividad presente. Globalmente, *Flavobacterium* H492 reduce el daño de los nematodos reniformes y los nematodos noduladores de la raíz en pepino y los nematodos de lesión de la raíz en maíz en tierra de campo infestada con nematodos en el ensayo en comparación con el control de agua y aumenta la biomasa de la planta y el vigor de la planta, incluyendo la altura de las plantas, el peso superior, el peso de la raíz, la salud de la raíz y el vigor de la planta en comparación con el control de agua. Los efectos de potenciación de la planta de *Flavobacterium* sp. H492 en partes de la planta por encima del suelo son superiores al fumigante de tierra Vapam, mientras que los efectos sobre la salud de las raíces son iguales que Vapam. *Flavobacterium* sp. H492 reduce significativamente los nematodos SCN en las raíces totales en comparación con el control de agua. Los resultados con nematodos específicos se analizan a continuación.

En el ensayo de RKN (véanse las FIG. 5-9), *Flavobacterium* sp. H492 reduce significativamente los números de nematodos noduladores de la raíz en 100 ml de tierra, las raíces totales, un gramo de raíces, el índice de agallas y los números totales de agallas en comparación con el control de agua, y tuvo los mismos efectos sobre la reducción que Vapam (véase la FIG. 8). Los números de *Dorylaimus* spp. en 100 ml de tierra, y nematodos no parasitarios en 100 ml de tierra y raíces totales, se aumentan significativamente por MBI-302 (*Flavobacterium* sp. H492) en comparación con el control de agua y Vapam (véanse las FIG. 5 y 6). La altura de la planta, el peso superior, los pesos de las raíces, la

salud de las raíces se aumentan significativamente por MBI-302 (*Flavobacterium sp. H49*)<sup>2</sup> en comparación con agua y Vapam (véase la FIG. 9).

5 En el ensayo de nematodos reniformes, MBI-302 (*Flavobacterium H492*) reduce significativamente los números de nematodos reniformes en 100 ml de tierra, raíces totales y un gramo de raíces en comparación con el control de agua (véase la FIG. 10). Los números de *Dorylaimus* spp. en 100 ml de tierra no se ven afectados por *Flavobacterium sp. H492* (véase la FIG. 10) en comparación con el control de agua. Los números de nematodos no parasitarios en 100 ml de tierra y raíces totales se aumentan significativamente por *Flavobacterium sp. H492* (véase la FIG. 10), pero se reducen significativamente en un gramo de raíces en comparación con control de agua (véanse las FIG. 11 y 12). La altura de la planta, el peso superior y el vigor de la planta se aumentan significativamente por *Flavobacterium sp. H492* en comparación con agua y Vapam (FIG. 13). El peso de la raíz de la planta y la salud de la raíz se aumentaron significativamente en comparación con el control de agua, e igual que con Vapam (FIG. 13).

15 En el ensayo de nematodos de lesión, *Flavobacterium sp. H492* aumenta significativamente los números de uno de los nematodos parasitarios de planta, *Pratylenchus* spp. (nematodos de lesión), pero no reduce los números de los otros dos nematodos parasitarios *Helicotylenchulus* spp. (nematodos de espiral) y *Paratrichodorus* spp. (nematodos de raíz voluminosa) en 100 ml de tierra en comparación con el control de agua (véase la FIG. 14). Los números de nematodos de lesión, de espiral y de raíz voluminosa en raíces de maíz totales y un gramo de raíces de maíz, se reducen significativamente en comparación con el control de agua (véanse las FIG. 15 y 16). Los números de los nematodos no parasitarios en 100 ml de tierra se aumentaron significativamente por *Flavobacterium sp. H492* en comparación con el control de agua. La altura de la planta, el peso superior y el vigor de la planta se aumentan significativamente por *Flavobacterium sp. H492* en comparación con agua y Vapam (véase la FIG. 17). Los pesos de la raíz de la planta y la salud de la raíz se aumentan significativamente por *Flavobacterium sp. H492* en comparación con el control de agua (véase la FIG. 17).

25 *Flavobacterium sp. H492* reduce significativamente los números de SCN en raíces totales en comparación con el control de agua, pero con el mismo efecto que con Vapam (véase la FIG. 18). Las bacterias aumentaron significativamente los números de nematodos no parasitarios en 100 ml de tierra y en raíces totales en comparación con agua y Vapam (véase la FIG. 19).

### 30 **Ejemplo 5: Extracción de compuestos de *Flavobacterium sp. H492***

Se usa el siguiente procedimiento para la purificación de compuestos extraídos del cultivo de *Flavobacterium sp. H492* (véase la FIG. 20):

35 El caldo de cultivo derivado de la fermentación de 10 l de *Flavobacterium sp.* en caldo V-8 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 muselina y se lava con agua DI para retirar las sales. La resina, la masa celular y la muselina entonces se impregnan durante 2 h en acetona/metanol (50/50) después de los cual se filtra la acetona/metanol y se seca al vacío usando evaporador giratorio para dar el extracto en crudo. El extracto en crudo entonces se fracciona usando cromatografía de líquidos al vacío en C18 de fase inversa (H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>OH; gradiente 90:20 a 0:100 %) para dar 6 fracciones (FIG. 20). Estas fracciones entonces se concentran hasta sequedad usando evaporador giratorio y los residuos secos resultantes se criban para la actividad biológica usando *Meloidogyne incognita* y *M. hapla*. Las fracciones activas entonces se someten a HPLC de fase inversa (Spectra System P4000 (Thermo Scientific) para dar compuestos puros, que después se criban en los bioensayos mencionados anteriormente para ubicar/identificar los compuestos activos. Para confirmar la identidad del compuesto, se registran datos espectroscópicos adicionales tales como CL/EM y RMN.

El compuesto activo nematicida 1-(4-hidroxifenil)pent-1-en-3-ona (1) se obtuvo de la fracción 3 (véase la FIG. 22).

### 50 **Purificación de compuestos**

La purificación de 1-(4-hidroxifenil)pent-1-en-3-ona (1) se realizó usando columna C-18 de HPLC (Phenomenex, Luna 10u C18(2) 100 A, 250 x 10), sistema disolvente en gradiente de agua:acetonitrilo (0-10 min, 80-75 % de CH<sub>3</sub>CN acuoso; 10-45 min, 75-60 % de CH<sub>3</sub>CN acuoso; 45-55 min, 60-50 % de CH<sub>3</sub>CN acuoso; 55-65 min, 50-100 % de CH<sub>3</sub>CN acuoso; 65-70 min, 100 % de CH<sub>3</sub>CN; 55-70 min, 0-80 % de CH<sub>3</sub>CN) acuoso a un caudal de 2,5 ml/min y detección UV de 210 nm. El compuesto activo 1-(4-hidroxifenil)pent-1-en-3-ona (1) tiene un tiempo de retención de 60,81 min.

### 60 **Análisis por espectrometría de masas de compuestos**

El análisis de espectrometría de masas del pico activo se realiza en un instrumento de electronebulización (IEN) Thermo Finnigan LCQ Deca XP Plus (ESI) usando modos de ionización tanto positivos como negativos 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 José, CA). El instrumento de cromatografía de líquidos de alto rendimiento Thermo (HPLC) equipado con detector Finnigan Surveyor PDA plus, tomamuestras automático plus, bomba de EM y una columna de 4,6 mm x 100 mm Luna C18 5 μ 100A (Phenomenex). El sistema disolvente consistía en agua (disolvente A) y acetonitrilo (disolvente B). La

fase móvil empieza en un 10 % de disolvente B y aumenta linealmente hasta un 100 % de disolvente B durante 20 min y después se mantiene durante 4 min, y finalmente vuelve a un 10 % de disolvente B durante 3 min y se mantiene durante 3 min. El caudal es de 0,5 ml/min. El volumen de inyección fue de 10 µl y las muestras se mantienen a temperatura ambiente en un tomamuestras automático. El compuesto 1 tiene un tiempo de retención de 11,31 min en estas condiciones. Los compuestos se analizan por CL-EM utilizando la CL y cromatografía de fase inversa. El análisis de espectrometría de masas de los presentes compuestos se realizan en las siguientes condiciones: El caudal del gas nitrógeno se fija a 30 y 15 arb para el recubrimiento y caudal de gas aux/barrido, respectivamente. Se realizó ionización por electronebulización con una tensión de nebulización establecida a 5000 V y una tensión del capilar a 35,0 V. La temperatura del capilar se estableció a 400 °C. Los datos se analizaron en el programa informático Xcalibur. La 1-(4-hidroxifenil)pent-1-en-3-ona (1) tiene una masa molecular de 175,35 en modo de ionización negativa.

#### **Análisis de espectroscopia de RMN de los compuestos**

Se midieron los espectros de RMN-RMN en un espectrómetro de campo de gradiente de 600 MHz Bruker. La referencia se establece en el patrón interno tetrametilsilano (TMS, 0,00 ppm).

Para averiguar la estructura, se analiza además la 1-(4-hidroxifenil)pent-1-en-3-ona (1) purificada con masa molecular de 176 (véase la FIG. 21 indicada como tratamiento H29) usando un instrumento de RMN de 600 MHz, y tiene valores  $\delta$  de RMN de  $^1\text{H}$  a 7,60, 7,52, 6,83, 6,68, 2,74, 1,14 y tiene valores de RMN de  $^{13}\text{C}$  de 203,96, 161,90, 131,78, 131,78, 145,11, 127,28, 123,83, 117,24, 117,24, 34,52, 8,89. El compuesto activo se aisló como un sólido amarillo claro, con absorción de UV a 232 y 318 nm y se analizó para la fórmula molecular  $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{O}_2$  (6 grados de insaturación), por espectrometría de masas IEN. El espectro de RMN de  $^1\text{H}$  mostró señales para un par de protones olefínicos  $\alpha,\beta$ -insaturados *trans*-acoplados ( $\delta$  7,60 y 6,68, cada 1H, d,  $J = 16,7$  Hz) junto con señales aromáticas de tipo  $\text{A}_2\text{B}_2$  en  $\delta$  7,52, 2H d,  $J = 8,5$  Hz, y 6,83, 2H d,  $J = 8,5$  Hz.

Además, el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  reveló la presencia del grupo  $\text{CH}_2\text{-CH}_3$ , a  $\delta$  2,74, 2H, c,  $J = 7,3$  Hz, y 1,14, 3H, t,  $J = 7,3$  Hz. A partir de un análisis de los datos espectrales anteriores, se estableció la estructura del policétido aromático como 1-(4-hidroxifenil)pent-1-en-3-ona, que se confirmó por análisis detallado de los experimentos COSY, HMQC y HMBC. Una búsqueda en la bibliografía reveló que este compuesto se ha presentado como un policétido aromático  $\text{C}_5\text{-C}_6$  no natural formado por la reacción enzimática de policétidos sintasa de tipo III vegetales (Abe et al., 2002). La potencia del compuesto de interés en la fracción 3 (F3) se confirmó en un ensayo *in vitro* usando *M. incognita* y *M. hapla*.

#### **Ensayo *in vitro* en la búsqueda de la fracción activa de extractos de *Flavobacterium sp.***

Una vez se ha fraccionado el extracto en crudo mediante cromatografía de líquidos como se describe anteriormente, las fracciones se disuelven en dimetilsulfóxido (DMSO). Después de que las fracciones estén en forma líquida, se ensayan *in vitro* en una placa de cultivo celular de plástico de 96 pocillos para identificar la fracción o fracciones que contienen el metabolito o metabolitos activos deseados. En esta ocasión, se exponen 15-20 nematodos en una solución de agua de 50 µl a 100 µl de un concentrado de fracción de 4 mg/ml durante un periodo de 24 horas a 25 °C. Una vez completado el periodo de incubación, se registran los resultados basándose en una clasificación visual de la motilidad de J2 en cada pocillo tratado con las fracciones de H492 de 1 a 6, cada tratamiento se ensaya en cuatro réplicas. La FIG. 22 muestra los resultados de dos bioensayos en placa de 96 pocillos diferentes de H492 de las fracciones 1 a 6 y extracto en crudo (CE). Se incluyen tres controles en cada ensayo; un control positivo (1 % de auid) y dos controles negativos (DMSO y agua). El ensayo 1 (T1) se realizó usando nematodos de vida libre y las fracciones se disolvieron en DMSO al 100 % y el ensayo 2 (T2) se realizó usando nematodos *M. hapla* y las fracciones se disolvieron en DMSO al 50 % (DMSO al 50 %: agua al 50 %).

#### **Ensayo *in vitro* en la búsqueda de compuesto activo en la fracción 3 de extracto de *Flavobacterium sp.***

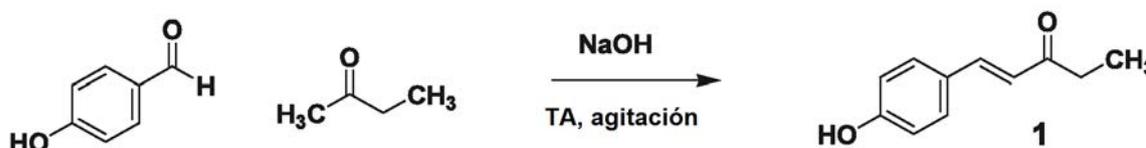
Una vez completada la purificación de la fracción 3 y haber recogido todos los picos/compuestos deseados como se describe anteriormente, cada pico se ensaya en un bioensayo de extracto de placa de cultivo celular de plástico de 96 pocillos *in vitro* para identificar el pico o los picos que contienen el metabolito o metabolitos activos deseados.

Se exponen 15-20 nematodos en una solución de agua de 50 ml a 3 ml de un concentrado del pico de 20 mg/ml (1,13 mg/ml de exposición total) durante un periodo de 24 horas a 25 °C. Una vez completado el periodo de incubación, se registran los resultados basándose en una clasificación visual de la inmotilidad de los J2 en cada pocillo tratado con los picos purificados de H1 a H39, más H29-A derivado de la fracción 3, cada tratamiento se ensaya en cuatro réplicas. Se incluyen tres controles en cada ensayo; un control positivo (1 % de auid) y dos controles negativos (DMSO y agua). El ensayo 1 (T1) se realiza usando el método descrito anteriormente con *M. hapla*, el ensayo 2 y 3 (T2 t T3) se realiza usando el último método con *M. incognita* (FIG. 22).

#### **Ejemplo 6: Confirmación de la estructura del producto natural por síntesis**

La estructura del compuesto nematocida 1 se asignó principalmente basándose en el análisis de los datos espectrales (RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  y 2D y EM). Esta estructura asignada se confirmó ahora por una síntesis de una etapa corta y simple (Kad et. al., 1998). Los espectros de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , EM y RT en HPLC coinciden exactamente con los del producto

natural aislado de *Flavobacterium* sp.



#### 5 Síntesis de 1-(4-hidroxifenil)pent-1-en-3-ona (1):

A una solución de 4-hidroxibenzaldehído (250 mg, 2,04 mmol) en NaOH al 10 % (5 ml) se le añadió 2-butanona (1,12 ml, 12 mmol) a 25 °C seguido de solución NaOH al 10 % restante (7 ml) en matraz de frasco redondo y se agitó durante aproximadamente 90 min a TA. La mezcla de reacción se acidificó con solución de HCl al 10 % y se extrajo con acetato de etilo (2 x 200 ml). Los extractores orgánicos combinados se secaron y evaporaron para obtener el producto crudo que después se purificó usando cromatografía en columna de gel de sílice para dar el compuesto 1, 150 mg. Los datos espectrales coinciden exactamente con los presentados anteriormente para el producto natural.

#### 15 Ensayo de policétido 1 (MW 176) para el control de nematodos

##### % de inmotilidad de respuesta a dosis para el policétido sintetizado MW176

El policétido sintetizado (MW 176) se ensayó a varias dosis (las concentraciones ensayadas fueron 0,14, 0,28, 0,42, 0,56, 0,84, 1,13, 1,69 mg/ml de policétido en DMSO) en el bioensayo de inmovilidad de placa de 6 pocillos para encontrar la dosis óptima de este compuesto necesaria para detectar la actividad nematocida. En este ensayo particular, se expusieron juveniles de nematodo (J2) de *M. incognita* (cepa de Monsanto) a las muestras ensayadas en placa de 96 pocillos: 50 µl de agua que contiene aproximadamente 300 J2 se mezclaron con 3 µl de muestra de policétido o controles (avid (2 %) como control positivo o DMSO y agua como controles negativos, respectivamente. Después de 24 h de incubación, se transfirieron 20 µl de la suspensión de J2 de cada pocillo a los pocillos de placas de 6 pocillos rellenas con agar acuoso (3 ml de agar al 1 % por cada pocillo). Las placas se dejaron abiertas durante 10-15 min para permitir que las soluciones se secaran. Después de ello, se pintaron círculos alrededor de la suspensión de J2 y se contaron los números iniciales de J2 dentro de los círculos en el estereomicroscopio. Las placas se incubaron durante otras 24 h y se contaron los números de J2 que permanecían inmóviles (es decir, que aún estaban presentes dentro de los círculos) usando el estereomicroscopio. El % de inmovilidad de los nematodos se expresó como: [(número de nematodos inmóviles después de 24 h de incubación/número inicial de J2)\*100 %]. Los datos de la FIG. 23 sugieren que para una buena actividad nematocida el intervalo óptimo requerido era ≥ 0,5 mg/ml.

#### Ensayo de policétido 1 (compuestos MW 176) en ensayo en maceta para el control nematocida

La actividad nematocida del policétido 1 (compuesto MW 176) contra nematodos noduladores de la raíz se evaluó adicionalmente en invernadero en ensayos de cono usando *M. incognita* y tomate (cv. UC82) como hospedador. Las semillas de tomate se germinaron en vermiculita y las plántulas de 3 semanas de edad se transfirieron a los conos que contenían mezcla de arena y tierra superficial (1:1). Dos semanas después del trasplante, las plantas de tomate se trataron con las muestras. El rendimiento de policétido (MW 176) en el medio V-8 se encontró que era de aproximadamente 1 mg/ml, de modo que el ensayo del policétido se calculó basándose en el rendimiento aislado del compuesto activo. Se dosificaron cuatro concentraciones diferentes (100, 10, 1 y 0,1 µg/ml) del policétido preparado en metanol (MeOH) al 4 % como 10 ml de tierra empapada en cada maceta. Cada tratamiento se ensayó en 5 réplicas. Después del empapamiento, cada maceta se inoculó con 1000 huevos de nematodo suspendidos en 1 ml de agua. La dosificación del producto se repitió después de dos semanas. Tres semanas después, se terminó el ensayo de inoculación y se puntuaron los siguientes parámetros: número de agallas/raíz, índice de agallas y peso superior fresco.

Los resultados sobre el efecto del policétido 1 en el número de agallas/raíz, el índice de agallas y el peso superior fresco se muestran en las Fig. 24-26.

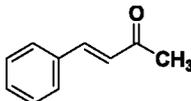
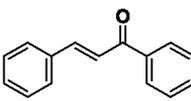
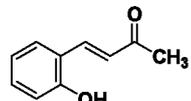
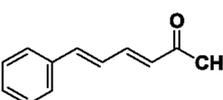
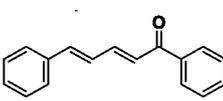
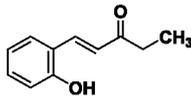
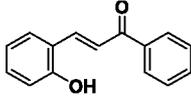
50 Los resultados de estos experimentos indican:

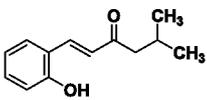
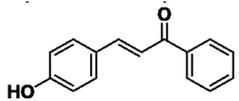
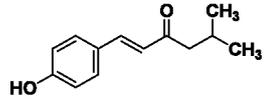
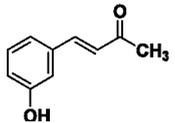
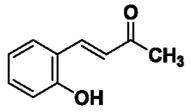
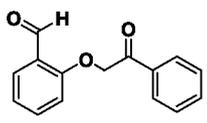
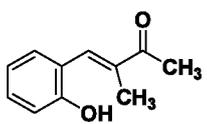
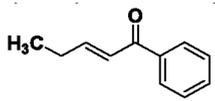
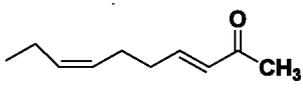
- 0,001 y 0,01 mg/ml de policétido redujeron significativamente el índice de agallas y las agallas por raíz en el 1.<sup>er</sup> ensayo en comparación con el control de agua.
- 0,1 mg/ml de policétido únicamente redujo significativamente el índice de agallas en el 1.<sup>er</sup> ensayo, y todas las diluciones ensayadas en el 2.<sup>o</sup> ensayo en comparación con el control de agua.
- metanol al 4 % como disolvente del policétido no causó fitotoxicidad al tomate (cv. UC82) ni redujo los daños de los nematodos en el 1.<sup>er</sup> ensayo; y metanol al 3 % redujo el índice de agallas en el 2.<sup>o</sup> ensayo sin efecto de fitotoxicidad en el 2.<sup>o</sup> ensayo.

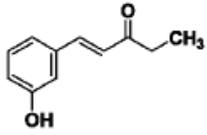
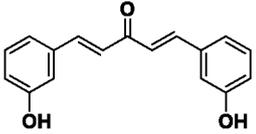
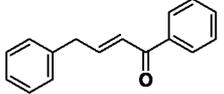
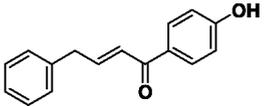
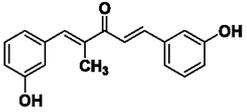
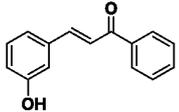
#### 60 Relación de estructura-actividad (SAR)

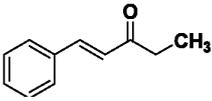
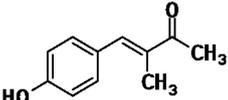
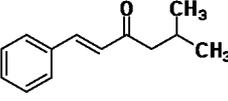
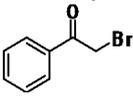
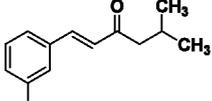
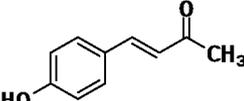
Para entender rápidamente que la parte de la molécula de 1-(4-hidroxifenil)pent-1-en-3-ona (1) (policétido) desempeña una función crucial en la actividad nematocida, se sintetizó una serie de análogos estructurales y se evaluó usando el ensayo de motilidad. Este bioensayo sirve para distinguir las diferencias en la eficacia midiendo la recuperación y la movilidad de los nematodos después de exponerse a cualquier compuesto dado con 6 repeticiones por tratamiento. Este bioensayo implica el siguiente procedimiento: se dispensan 3 µl (a 20 mg/ml) de la muestra en 50 µl de aproximadamente 300 J2 en una placa de cultivo celular de plástico de 96 pocillos. Después de 24 horas, se transfieren 100-150 de los J2 tratados a placas de 6 pocillos que contenían agar acuoso al 1,5 %. Después de secar la muestra de ensayo en el agar, se marcó la disminución inicial y se realizaron recuentos iniciales de los J2. Después de otro periodo de recuperación de 24 horas, se midió la inmovilización de los juveniles contando los números de J2 que se movieron desde el círculo inicial y se calculó un promedio de las 6 repeticiones para obtener el porcentaje de inmovilización de cada muestra. Los resultados se resumen en la tabla 12.

**Tabla 12 Actividad nematocida de diversos análogos sintéticos de policétido 1 usando el bioensayo de motilidad.**

Muestras	ID del compuesto	Promedio del % de inmovilidad
SAR-1	 (E)-4-fenilbut-3-en-2-ona	99
SAR-2	 Benzalacetofenona	4
SAR-3	 (E)-4-(2-hidroxifenil)but-3-en-2-ona	95
SAR-4	 (3E,5E)-6-fenilhexa-3,5-dien-2-ona	97
SAR-5	 (2E,4E)-1,5-difenilpenta-2,4-dien-1-ona	98
SAR-6	 (E)-1-(2-hidroxifenil)pent-1-en-3-ona	98
SAR-7	 (E)-3-(2-hidroxifenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona	99

Muestras	ID del compuesto	Promedio del % de inmovilidad
SAR-8	 <p>(E)-1-(2-hidroxifenil)-5-metilhex-1-en-3-ona</p>	100
SAR-9	 <p>(E)-3-(4-hidroxifenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona</p>	100
SAR-10	 <p>(E)-1-(4-hidroxifenil)-5-metilhex-1-en-3-ona</p>	96
SAR-11	 <p>(E)-4-(3-hidroxifenil)but-3-en-2-ona</p>	99
SAR-12	 <p>(E)-4-(2-hidroxifenil)but-3-en-2-ona</p>	99
SAR-13	 <p>2-(2'-fenil-2-oxoetoxi)benzalhído</p>	74
SAR-14	 <p>(E)-4-(2-hidroxifenil)-3-metilbut-3-en-2-ona</p>	97
SAR-15	 <p>(E)-1-fenilpent-2-en-1-ona</p>	20
SAR-16	 <p>(3E,7Z)-deca-3,7-dien-2-ona</p>	94

Muestras	ID del compuesto	Promedio del % de inmovilidad
SAR-17	 <p data-bbox="619 495 995 524">(E)-4-(3-hidroxifenil)but-3-en-2-ona</p>	98
SAR-18	 <p data-bbox="539 714 1082 743">(1E,4E)-1,5-bis(3-hidroxifenil)penta-1,4-dien-3-ona</p>	23
SAR-19	 <p data-bbox="655 898 963 927">(E)-1,4-difenilbut-2-en-1-ona</p>	64
SAR-20	 <p data-bbox="587 1095 1034 1124">(E)-1-(4-hidroxifenil)-4-fenilbut-2-en-1-ona</p>	28
SAR-21	 <p data-bbox="496 1296 1123 1326">(1E,4E)-1,5-bis(3-hidroxifenil)-2-metilpenta-1,4-dien-3-ona</p>	12
SAR-22	 <p data-bbox="576 1536 1043 1565">(E)-3-(3-hidroxifenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona</p>	70

Muestras	ID del compuesto	Promedio del % de inmovilidad
SAR-23	 (E)-1-fenilpent-1-en-3-ona	80
SAR-24	 (E)-4-(4-hidroxifenil)-3-metilbut-3-en-2-ona	80
SAR-25	 (E)-5-metil-1-fenilhex-1-en-3-ona	79
SAR-26	 2-bromo-1-feniletanona	50
SAR-27	 (E)-1-(3-hidroxifenil)-5-metilhex-1-en-3-ona	78
SAR-28	 (E)-4-(4-hidroxifenil)but-3-en-2-ona	78
SAR-29	3-hidroxibenzaldehído	70
SAR-30	4-hidroxibenzaldehído	58
SAR-31	2-hidroxibenzaldehído	58
SAR-32	Benzaldehído	65
SAR-33	γ-dodecalactona	63
SAR-35	2-octanona	33
SAR-36	2-heptanona	21
SAR-37	2-undecanona	67
SAR-38	cis-4-heptenal	21
SAR-39	4-metil-2-pentanona	54
SAR-40	iso-butiraldehído	79

Muestras	ID del compuesto	Promedio del % de inmovilidad
SAR-41	4-hidroxi-4-metilpentanona	21
SAR-42	o-anisaldehído	8
SAR-43	2-butanona	21
DMSO		9
Agua		8
Avid		99

### Actividad antimicrobiana

- 5 El "policétido MW 176" 1-(4-hidroxifenil)pent-1-en-3-ona (**1**) puro se ensayó contra diversos patógenos microbianos usando ensayo de disco de agar. El compuesto **1** mostró una potente actividad contra *Erwinia amylovora* y actividad moderada contra *Bacillus cereus*, *Xanthomonas campestris* y *Avidovorax avenae* subesp. *citulli*.

### DEPÓSITO DE MATERIAL BIOLÓGICO

- 10 El siguiente material biológico se ha depositado según los términos del tratado de Budapest en la Agricultural Research Culture Collection (NRRL), 1815 N. University Street, Peoria, Illinois 61604, EE. UU., y se le ha dado el siguiente número:

Depósito	Número de acceso	Fecha de depósito
<i>Flavobacterium</i> sp.H492	NRRL B-50584	14 de octubre de 2011

- 15 La cepa se ha depositado según las condiciones que aseguran que el acceso al cultivo estará disponible durante la tramitación de esta solicitud de patente hasta que lo determine el Comisionado de Patentes y Marcas para ser autorizado según 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 exigen las leyes de patentes extranjeras en los países donde se presentan los homólogos de la presente solicitud o sus descendientes. 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 patente concedidos por la acción gubernamental.
- 20

### REFERENCIAS

- 25 Abe, I., Takahashi, Y., Noguchi, H. (2002), "Enzymatic formation of an unnatural C6-C5 aromatic polyketide by plant type III polyketide synthases", *Org. Lett.* 4, 3623-3626.
- Asolkar, R. N., Jensen, P. R., Kauffman, C. A., Fenical, W. (2006), Daryamides A-C, "Weakly Cytotoxic Polyketides from a Marine-Derived Actinomycete of the Genus *Streptomyces* strain CNQ-085", *J. Nat. Prod.* 69:1756-1759.
- 30 Arena, J. P., Liu, K. K. et al., (1995), "The mechanism of action of avermectins in *Caenorhabditis elegans* - correlation between activation of glutamate-sensitive chloride current, membrane binding and biological activity", *Journal of Parasitology* 81: 286-294.
- Aspelin, A. L., Grube, A. H. (1999). Pesticides Industry Sales and Usage, 1996 y 1997. agencia E. P. de EE. UU. Publicación 733 - R-99-001.
- 35 Bakheta, M., Charlton, W. et al., (2005). "RNA interference of dual oxidase in the plant nematode *Meloidogyne incognita*", *Molecular Plant-Microbe Interactions* 18: 1099-1106.
- Barnsley, E. A. (1988), "Metabolism of 2,6-dimethylnaphthalene by *Flavobacteria*", *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 428-433.
- Bernardet, J.-F. y Nakagawa, Y. (2006a), "An introduction to the Family Flavohacteriaceae", *Prokaryotes* 7:455-480.
- 40 Bernardet, J.-F. y Bowman, J. (2006b), "The Genus *Flavobacterium*", *Prokaryotes* 7:481-531.
- Bodour, A.A. Guerrero-Barajas, C Beth V. Jiorle, B.V., Malcomson, M. E., Paull, A. K., Somogyi, A., Trinh, L.N, Bates, R.B. y Maier, R. M. (2004) "Structure and Characterization of Flavolipids, a Novel Class of Biosurfactants Produced by *Flavobacterium* sp. Strain MTN11", *Appl. Environ. Microbiol.* 70:114.
- 45 Bridge, J. y Page, S.L.J. 1980. Estimation of root-knot nematode infestation levels on roots using a rating chart. *Tropical Pest Management.* 26(3): 296-298.
- Cashion P, Holderfranklin MA, McCully J, Franklin M. 1977. RAPID METHOD FOR BASE RATIO DETERMINATION OF BACTERIAL DNA. *Analytical Biochemistry* 81:461-466.
- Chalvet-Monfray, K., P. Sabatier, et al., (1996), "Synergy between deltamethrin and prochloraz in bees: Modeling

- approach", *Environmental Toxicology and Chemistry*, 15(4): 525-534.
- Chitwood, D. J. (2003). Nematicides. *Encyclopedia of Agrochemicals*, vol. 3. J. R. Plimmer. Nueva York, John Wiley & Sons. 3: 1104-1115.
- Chitwood, D. J. (2002). "Phytochemical based strategies for nematode control", *Annual Review of Phytopathology* 40: 221-249.
- Colby, S. R. (1967), "Calculating Synergistic and Antagonistic Responses of Herbicide Combinations", *Weeds* 15(1): 20-22.
- Deley J, Cattoir H, Reynaert.A. 1970. Quantitative measurement of dna hybridization from renaturation rates. *European Journal of Biochemistry* 12:133.
- Dinaburg, A.G. 1942. "The efficiency of the Baermann apparatus in the recovery of *Haemonchus contortus*", *J. Parasitol.* 28:433-440.
- Dickschat J. S., Helmke, E., Schulz, S. (2005), "Volatile organic compounds from arctic bacteria of the Cytophaga-Flavobacterium-bacteroides group: A Retrobiosynthetic approach in chemotaxonomic investigations", *Chemistry & Biodiversity* 2: 318-353.
- Dong, L.Q. y Zhang, K.Q. (2006) "Microbial control of plant-parasitic nematodes: a five-party interaction". *Plant Soil* 288: 31-45.
- Farenhorst, M., B. y Knols, G. J. et al., (2010), "Synergy in Efficacy of Fungal Entomopathogens and Permethrin against West African Insecticide-Resistant *Anopheles gambiae* Mosquitoes." *PLoS ONE* 5(8): e12081.
- Ferezou, J-P., y Julia, M. (1985), "Biomimetic synthesis of bacterial C50 carotenoids decaprenoxanthin and C.P. 450", *Tetrahedron* 41: 1277- 1287.
- Francis, G. W., Hertzberg, S., Andexsen, K., Liaaen-Jensen, S. (1970), "New carotenoid glycosides from *Oscillatoria limosa*", *Phytochemistry* 9:629-635.
- Hallman, J. y Sikora, R.A. (1996). "Toxicity of fungal endophyte secondary metabolites to plant-parasitic nematodes and soil-borne pathogens", *Journal of Plant Pathology* 102: 155-162.
- Hasky-Gunther, K., Hoffman-Hergarter, S. et al., (1998). "Resistance against potato cyst nematode *Globodera pallida* systemically induced by the rhizobacteria *Agrobacterium radiobacter*(G12) and *Bacillus spaericus* (B43)" *Fundamentals of Applied Nematology* 21: 511-517.
- Hummelbrunner, L. A. y Isman, M. B. (2001). "Acute, Sublethal, Antifeedant, and Synergistic Effects of Monoterpenoid Essential Oil Compounds on the Tobacco Cutworm, *Spodoptera litura* (Lep., Noctuidae)," *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49(2): 715-720.
- Huss et al., 1983. Studies on the spectrophotometric determination of dna hybridization from renaturation rates. *Systematic and Applied Microbiology* 4:184-192.
- Jaffee, B. A. y Muldoon, A. E. (1995). "Susceptibility of root-knot and cyst nematodes to the nematode-trapping fungi *Monocrosporium ellipsosporum* and *M. cionopagum*." *Soil Biology and Biochemistry* 27: 1983-1090.
- Kad, G. L.; Singh, V.; Khurana, A.; Singh, J. (1998). The Synthesis of Phycopsisenone, a New Phenolic Secondary Metabolite from the Sponge *Phycopsis* sp. *J. Nat. Prod.* 1998, 61,297-298.
- Kamiyama, T., Umino, T., Satoh, T., Sawairi, S., Shirane, M., Ohshima, S., Yokose, K., (1995). "Sulfobacins A & B, novel von Willebrand factor receptor antagonists I. production, isolation, characterization and biological activities", *J. Antibiot.*, 48: 924-928.
- Kaplan, C. W. y Kitts, C.L. 2004. Bacterial Succession in a petroleum land treatment unit. *Appl. Environ. Microbiol.* **70:1777-1786**
- Kato, H., Haishima, Y., Iida, T., Tanaka, A., Tanamoto, K., (1998), "Chemical structure of lipid A isolated from *Flavobacterium meningosepticum* lipopolysaccharide", *J. Bact.* 180:3891-3899.
- Kerry, B. R. (2001). Exploitation of the nematophagous fungal *Verticillium chlamydosporium* Goddard for the biological control of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) Fungi as biocontrol agents: Progress, problems and potential. T. M. Butt, C. Jackson y N. Magan. Nueva York, CAB International: 155-168.
- Kim, O.S., Cho, Y.J., Lee, K., Yoon, S.H., Kim, M., Na, H., Park, S.C., Jeon, Y.S., Lee, J.H., Yi, H., Won, S., Chun, J. (2012). Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA Gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. *Int J Syst Evol Microbiol* 62, 716-721.
- Kirkegaard, J. A. y Sarwar, M. (1998). "Biofumigation potential of brassicas", *Plant and Soil* 201: 71-89. Kobayashi, J., Mikami, S., Shigemori, I., Iakaoa, I., Shimonishia, Y., Izutah, S., Yoshidab, S., (1995), "Flavocristamides A and B, new DNA polymerase  $\alpha$  inhibitors from a marine bacterium", *Flavobacterium* sp., *Tetrahedron*, 51: 10487-10490.
- Koenning, S. R., Overstreet, C. et al., (1999). "Survey of crop losses in response to phytoparasitic nematodes in the United States for 1994." *Journal of Nematology* 31: 587-618.
- Kokalis-Burelle, N. y Rodriguez-Kabana, R. (2006). Allelochemicals as biopesticides for management of plantparasitic nematodes. *Allelochemicals: Biological Control of Plant Pathogens and Diseases*. I. Mukerji y K. G. Mukerji. Países Bajos, Springer: 15-29.
- Krieg, A., A. y Huger, M. et al., (1983), "Bacillus thuringiensis var. tenebrionis: Ein neuer, gegenuber Larven von Coleopteren wirksamer Pathotyp", *Z. Angew. Entomol.* 96: 500-508.
- Liaaen-Jensen, S., Hertzberg, S., Weeks, O. B., Schwieter, U. (1968), "Bacterial carotenoids XXXVIII. C50-Caeotenoids. 3. Structure determination of dehydrogenans-P439", *Acta Chem. Stand.*, 22: 1171-1186.
- Lorch, H et al., "Basic methods for counting microoganisms in soil and water. In *Methods in applied soil microbiology and biochemistry*. K. Alef y P. Nannipieri. Eds. San Diego, CA, Academic Press: pág. 146-161. 1995.
- Marrone, P. G., Manker, D. C. et al., (1998). Nematicidal *Bacillus* strain and metabolite and methods thereof. patente de Estados Unidos 5733544. EE. UU.
- Meunier, L., Carubel, P. et al., (1999), "Insecticidal combinations including an insecticide from the family

- chloronicotinyl family and an insecticide having pyrazole, pyrrole, or phenylimidazole group. U. States"., Estados Unidos, Rhone-Poulenc Agrochimie: 6.
- Meyer, S. L. F. y Roberts, D. P. (2002). "Combinations of biocontrol agents for management of plant-parasitic nematode and soilborne plant-pathogenic fungi" *Journal of Nematology* 34: 1-8.
- 5 Oka, Y., Nacar, S. et al., (2000). "Nematicidal activity of essential oils and their components against root-knot nematode", *Phytopathology* 90:710-715.
- Oostendorp, M. y Sikora, R. A. (1990). "In-vitro interrelationships between rhizosphere bacteria and *Heterodera schachtii*" *Reviews in Nematology* 13: 269-274.
- 10 Pederson, M. y Woldum, H. S.. Synergistic Combination of Glutamate-and-Gaba-Gated Chloride Against Pesticide and at Least One Vitamin E, Niacin, or Derivatives Thereof, solicitud de patente de Estados Unidos Pub. n.º 2009/0111579, publicada el 30 de abril de 2009.
- Puritch, G. y Salloum, G. Environmentally Safe Insecticide, patente de Estados Unidos n.º 5047424, concedida el 10 de septiembre de 1991. Quarles, W. (2005). "2005 Directory of least toxic pest control products", *The IPM Practitioner* 26: 17.
- 15 Roubtsova, T., J.-A. Lopez-Perez, et al., (2007). "Effect of broccoli (*Brassica oleracea*) tissue, incorporated at different depths in a soil column, on *Meloidogyne incognita*", *Journal of Nematology* 39: 111-117.
- Sasser, J.N. y Freckman, D.W. (1987). "A world perspective on nematology: the role of the society". En J.A. Veech y D.W. Dickson (Eds.), *Vistas on Nematology* (pág. 7-14). Society of Nematologists, Hyattsville.
- 20 Saxena, A. K., Pal, K. K. et al., (2000). Bacterial biocontrol agents and their role in plant disease management. Biocontrol potential and its exploitation in sustainable agriculture: crop diseases, weeds and nematodes. R. R. Upadhaya, K. G. Mekerji y B. P. Chamola. Nueva York, Kluwer Academy Plenum.
- Shapiro-Ilan, D. I., y Cottrell, T. E. et al., (2011), "Effects of combining microbial and chemical insecticides on mortality of the Pecan Weevil (*Coleoptera: Curculionidae*)," *J Econ Entomol.* 104(1): 14-20
- 25 Shoji, J., Kato, T., Sakazaki, R., Nagata, W., Terui, Y., Nakagawa, Y., Shiro, M., Matsumoto, K., Hattori, T., Yoshida, T., Kondo, E., (1984), "Chitinovorins A, B and C, novel lactam antibiotics of bacterial origin", *J. Antibiot.*, 37; 1486-1490.
- Shoji, J., Sakazaki, R., Kato, T, Terui, Y., Matsumoto, K., Tanimoto, T., Hattori, T., Hirooka, K., Kondo, E., (1985), "Isolation of chitinovorins D", *J. Antibiot.*, 38: 538-540.
- 30 Siddiqui, M. A. y Alam, M. M. (2001). Nematicides. *The IPM practitioner* 9-11.
- Siddiqui, Z. A. y Mahmood, I. (1999). "Role of bacteria in the management of plant parasitic nematodes: a review." *Bioresource Technology* 69: 167-179.
- Siddiqui, M. A. y Mahmood, I. (1996). "Biological control of plant parasitic nematodes by fungi: a review." *Bioresource Technology* 58: 229-239.
- 35 Sikora, R. A. y Hoffman-Hergarter, S. (1993). Biological control of plant-parasitic nematodes with plant health promoting rhizobacteria. *Biologically based technology*. P. D. Lumsden y J. L. Vaugh. EE. UU., ACS Symposium Series: 166-172.
- Singh P. D., Young, M. G., Johnson, J. H., Cimarusti, C. M. Sykes, R. B., (1984), "Bacterial production of 7-formamidocephalosporins", *Isolation and structure determination*, *J. Antibiot.* 37: 773-780.
- 40 Terefe, M. y Tefera, T. et al., (2009). "Effect of a formulation of *Bacillus firmus* on root-knot nematode *Meloidogyne incognita* infestation and the growth of tomato plants in the greenhouse and nursery." *Journal of Invertebrate Pathology* 100: 94-99.
- Thompson, G. D. y Dutton, R. et al., (2000). "Spinosad - a case study: an example from a natural products discovery programme," *Pest Management Science* 56: 696-702.
- 45 Wayne LG, Brenner DJ, Colwell RR, Grimont PAD, Kandler O, Krichevsky MI, Moore LH, Moore WEC, Murray RGE, Stackebrandt E, Starr MP, Truper HG. 1987. Report of the ad-hoc-committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *International Journal of Systematic Bacteriology* 37:463-464.
- Whitehead, A. G. (1998). *Plant nematode control*. Wallingford, R. U., CAB International.
- 50 Wirth, M. C., J. A. Jiannino, et al., (2004), "Synergy between Toxins of *Bacillus thuringiensis* subsp. israelensis and *Bacillus sphaericus*." *Journal of Medical Entomology* 41: 935-941.
- Yagi, H. y Maruyama, A., (1999), "A novel monoacyldiglycosyl-monoacylglycerol from *Flavobacterium marinotypicum*", *J. Nat. Prod.* 62" 631-632.
- Yokoyama, A., Izumida, H., Shizuri, Y., (1996). New carotenoids sulfates isolated from a marine bacterium, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 60: 1877-1978.
- 55 Yokoyama A. y Miki, W., (1995), Isolation of myxol from a marine bacterium *Flavobacterium* sp. associated with a marine sponge. *Fisheries Sci.* 61:684-686.
- Zeck W.M. (1971), Ein Bonitierungsschema zur Feldauswertung von Wurzelgallenbefall. *Pflanzenschutznachrichten Bayer* 24,1: 144-147.

60 LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Marrone Bio Innovations, Inc.  
Cordova-Kreylos, Ana Lucia  
Asolkar, Ratnakar  
65 Koivunen, Marja  
Rodriguez, Margarita

ES 2 713 977 T3

Xing, Lijuan  
Marrone, Pamela

5 <120> CEPA PLAGUICIDA DE *FLAVOBACTERIUM* Y COMPOSICIONES BIOACTIVAS, METABOLITOS Y USOS  
 <130> MOI-42030-PCT  
 <150> 61609937  
 <151> 13/03/2012  
 10 <150> 61733730  
 <151> 12/05/2012  
 <160> 5  
 15 <170> PatentIn versión 3.5  
 <210> 1  
 <211> 20  
 20 <212> ADN  
 <213> Desconocido  
 <220>  
 <223> Cebador directo (FD1)  
 25 <400> 1  
 agagtttgat cctggctcag 20  
 <210> 2  
 <211> 17  
 30 <212> ADN  
 <213> Desconocido  
 <220>  
 <223> Cebador inverso RD1  
 35 <400> 2  
 aaggaggtga tccagcc 17  
 40 <210> 3  
 <211> 1215  
 <212> ADN  
 <213> Desconocido  
 45 <220>  
 <223> Secuencia de FD1  
 <400> 3  
 gcttaccatg cagtcgaggg gtagaattct tcggaatttg agaccggcgc acgggtgcgt 60  
 aacgcgatg caatctgcct ttcacagagg gatagcccag agaaatttgg attaatacct 120  
 catagtatta tggagtggca tcactttata attaaagtca caacggtgaa agatgagcat 180  
 50

ES 2 713 977 T3

gcgtcccatt agctagttgg taaggtaacg gcttaccaag gcgacgatgg gtaggggtcc 240  
 tgagagggag atccccaca ctggtactga gacacggacc agacttatac gggaggcagc 300  
 agtgaggaat attggtcaat ggacgcaagt ctgaaccagc catgccgctg gcaggatgac 360  
 ggtcctatgg attgtaaact gcttttgtac gagaagaaac acctctacgt gtagagactt 420  
 gacggtatcg taagaataag gatcggctaa ctccgtgcca gcagccgctg taatacggag 480  
 gatccaagcg ttatccggaa tcattgggtt taaaggtct gtaggcggtc tagtaagtca 540  
 gtggtgaaag cccatcgctc aacggtggaa cggccattga tactgctgga cttgaattat 600  
 taggaagtaa ctagaatatg tagtgtagcg gtgaaatgct tagagattac atggaatacc 660  
 aattgcgaag gcaggttact actaatggat tgacgctgat ggacgaaagc gtgggtagcg 720  
 aacaggatta gataccctgg tagtccacgc cgtaaacgat ggatactagc tgttgggctc 780  
 aagttcagtg gctaagcga agtgataagt atcccacctg gggagtacgg gcgcaagcct 840  
 gaaactcaa ggaattgacg ggggcccgc caagcgggtg agcatgtggt ttaattcgat 900  
 gatacgcgag gaaccttacc aaggcttaaa tgtagtgtga ccgatttgga aacagatctt 960  
 tcgcaagaca aattacaagt gctgcatggt tgtcgtcagc tcgtgocgtg aggtgtcagt 1020  
 taagtccat acgagcgcga cccctgtgta gtgcagcgat tcggtcggac tctagcagac 1080  
 tgcaagtcaa ctgtgagaag gtgggatgac gtcgatcatc acgccttacg ctggctacca 1140  
 cgtgctacat gacgtacgag gacgctacct cgctagggcg aggatcttta agccggtcca 1200  
 cgttcgaatc gggaa 1215

5 <210> 4  
 <211> 1233  
 <212> ADN  
 <213> Desconocido

10 <220>  
 <223> Secuencia de RD1

15 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(6)  
 <223> n es a, c, g o t

20 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (8)..(11)  
 <223> n es a, c, g o t

25 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (941)..(941)  
 <223> n es a, c, g o t

30 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (986)..(986)  
 <223> n es a, c, g o t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1001)..(1002)  
 <223> n es a, c, g o t  
 5  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1034)..(1034)  
 <223> n es a, c, g o t  
 10  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1038)..(1039)  
 <223> n es a, c, g o t  
 15  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1078)..(1078)  
 <223> n es a, c, g o t  
 20  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1081)..(1082)  
 <223> n es a, c, g o t  
 25  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1085)..(1086)  
 <223> n es a, c, g o t  
 30  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1094)..(1099)  
 <223> n es a, c, g o t  
 35  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1101)..(1101)  
 <223> n es a, c, g o t  
 40  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1105)..(1106)  
 <223> n es a, c, g o t  
 45  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1113)..(1115)  
 <223> n es a, c, g o t  
 50  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1119)..(1119)  
 <223> n es a, c, g o t  
 55  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1123)..(1124)  
 <223> n es a, c, g o t  
 60  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1130)..(1131)  
 <223> n es a, c, g o t  
 65  
 <220>

<221> misc\_feature  
 <222> (1134)..(1134)  
 <223> n es a, c, g o t

5

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1136)..(1136)  
 <223> n es a, c, g o t

10

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1139)..(1140)  
 <223> n es a, c, g o t

15

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1143)..(1143)  
 <223> n es a, c, g o t

20

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1145)..(1146)  
 <223> n es a, c, g o t

25

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1148)..(1148)  
 <223> n es a, c, g o t

30

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1152)..(1154)  
 <223> n es a, c, g o t

35

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1159)..(1160)  
 <223> n es a, c, g o t

40

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1162)..(1162)  
 <223> n es a, c, g o t

45

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1164)..(1166)  
 <223> n es a, c, g o t

50

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1172)..(1175)  
 <223> n es a, c, g o t

55

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1178)..(1178)  
 <223> n es a, c, g o t

60

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1181)..(1183)  
 <223> n es a, c, g o t

65

<220>  
 <221> misc\_feature

<222> (1185)..(1187)  
 <223> n es a, c, g o t

5 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1190)..(1190)  
 <223> n es a, c, g o t

10 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1192)..(1198)  
 <223> n es a, c, g o t

15 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1200)..(1205)  
 <223> n es a, c, g o t

20 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1210)..(1210)  
 <223> n es a, c, g o t

25 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1213)..(1213)  
 <223> n es a, c, g o t

30 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1217)..(1217)  
 <223> n es a, c, g o t

35 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1219)..(1221)  
 <223> n es a, c, g o t

40 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1224)..(1224)  
 <223> n es a, c, g o t

45 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1228)..(1228)  
 <223> n es a, c, g o t

50 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1231)..(1231)  
 <223> n es a, c, g o t

55 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1233)..(1233)  
 <223> n es a, c, g o t

60 <400> 4

ES 2 713 977 T3

nnnnnnngnnn ntgttacgac ttagccctag ttaccagttt taccctaggc agctccttgc 60  
 ggtcaccgac ttcaggcacc cccagcttcc atggcttgac gggcgggtgtg tacaaggccc 120  
 gggAACgtat tcaccggatc atggctgata tccgattact agcgattcca gcttcacgga 180  
 gtcgagttgc agactccgat ccgaactgtg accggcttta tagattcgct ccccctcgcg 240  
 aggtggctgc tctctgtacc ggccattgta gcacgtgtgt agcccaaggc gtaagggccg 300  
 tgatgatttg acgtcatccc caccttctc acagtttgca ctggcagtct tgtagagtt 360  
 cccgaccgaa tcgctggcaa ctaacaacag gggttgcgct cgttatagga cttaacctga 420  
 cacctcacgg cacgagctga cgacaacat gcagcacctt gtaatttgtc ttgcgaaaga 480  
 tctgtttcca aatcgggtcaa actacattta agccttgga aggttcctcg cgtatcatcg 540  
 aattaaacca catgctccac cgcttgtgcg gggccccgct aattccttg agtttcaggc 600  
 ttgcgcccgt actccccagg tgggatactt atcactttcg cttagccact gaacttgcgc 660  
 ccaacagcta gtatccatcg tttacggcgt ggactaccag ggtatctaat cctgttcgct 720  
 acccagctt tcgtccatca gcgtaatcc attagtagta acctgccttc gcaattggta 780  
 ttccatgtaa tctctaagca tttaccgct aactacata ttctagttac ttcctaataa 840  
 ttcaagtcca gcagatcaa tggccgttcc accggtgagc gatgggcttt caccactgac 900  
 ttactagacc gcctacagac cctttaaacc caatgattcc ngataacgct tggatcctcc 960  
 gtattaccgc ggctgctggc acgganttag ccgatcctta nncttacgat accgtcagtc 1020  
 tctacacgta gagngttnnt ctctgataaaa agcagcttac atccatagga cgtcatcngc 1080  
 nngcnnatg gctnnnnna ntgcnnatg acnnnttct canngctgcn ncnangann 1140  
 tgncnngct cnnncagttn gngnnctcc cnnnnagnac nnncnngtn gnnnnnnan 1200  
 nnnnnccctn acnaacnann nttnaagngg nan 1233

5 <210> 5  
 <211> 1416  
 <212> ADN  
 <213> Desconocido

10 <220>  
 <223> Secuencia consenso

<400> 5

gcttaccatg cagtcgaggg gtagaattct tcggaatttg agaccggcgc acgggtgctg 60  
 aacgcgtatg caatctgcct ttcacagagg gatagcccag agaaatttgg attaatacct 120  
 catagtatta tggagtggca tcactttata attaaagtca caacggtgaa agatgagcat 180

ES 2 713 977 T3

gcgtcccatt agctagttgg taaggtaacg gcttaccaag gcgacgatgg gtaggggtcc	240
tgagagggag atccccaca ctggtactga gacacggacc agacttatac gggaggcagc	300
agtgaggaat attggtcaat ggacgcaagt ctgaaccagc catgccgctg gcaggatgac	360
ggtcctatgg attgtaaact gcttttgtac gagaagaaac acctctacgt gtagagactt	420
gacggtatcg taagaataag gatcggctaa ctccgtgcc a gcagccgagg taatacggag	480
gatccaagcg ttatccgaa tcattgggtt taaagggtct gtaggcggtc tagtaagtca	540
gtggtgaaaag cccatcgctc aacgggtgaa cggccattga tactgctgga cttgaattat	600
taggaagtaa ctagaatatg tagtgtagcg gtgaaatgct tagagattac atggaatacc	660
aattgcgaag gcaggttact actaatggat tgacgctgat ggacgaaagc gtgggtagcg	720
aacaggatta gataccctgg tagtccacgc cgtaaacgat ggatactagc tgttgggagc	780
aagttcagtg gctaagcgaa agtgataagt atcccacctg gggagtagcg gcgcaagcct	840
gaaactcaaa ggaattgacg ggggcccgca caagcgggtg agcatgtggt ttaattcgat	900
gatacgcgag gaaccttacc aaggcttaa tgtagttga ccgatttga aacagatctt	960
tcgcaagaca aattacaagg tgctgcatgg ttgtcgtcag ctcgtgccgt gaggtgtcag	1020
gttaagtccct ataacgagcg caaccctgt tgtagttgc cagcgattcg gtcgggaact	1080
ctaacaagac tgccagtga aactgtgagg aagggtggga tgacgtcaa tcatcacggc	1140
ccttacgcct tgggctacac acgtgctaca atggccggt a cagagagcag ccacctcgcg	1200
agggggagcg aatctataaa gccggtcaca gttcggatcg gagtctgcaa ctcgactccg	1260
tgaagctgga atcgctagta atcggatata agccatgata cgggtgaatac gttccccggc	1320
cttgtaacaca ccgcccgtca agccatgaa gctgggggtg cctgaagtcg gtgaccgcaa	1380
ggagctgcct agggtaaaac tggtactag ggctaa	1416

**REIVINDICACIONES**

1. Una composición que comprende

- 5 (a) una primera sustancia seleccionada del grupo que consiste en un cultivo sustancialmente puro, caldo de células completas, fracción celular y sobrenadante derivado de la fermentación de *Flavobacterium* sp. H492 (n.º de acceso a NRRL B-50584), y  
(b) un vehículo, diluyente, tensioactivo o adyuvante.

10 2. Un método para controlar la infestación por plaga en una planta y/o promover el crecimiento de una planta, que comprende aplicar a la planta y/o las semillas de la misma y/o sustrato usado para cultivar dicha planta una cantidad de la composición de la reivindicación 1, 1-(4-hidroxifenil)pent-1-en-3-ona, eficaz para controlar dicha infestación por plaga y/o promover el crecimiento de la planta.

15 3. El método de acuerdo con la reivindicación 2, en el que dicha plaga es un nematodo.

4. El método de acuerdo con la reivindicación 2, en el que dicha planta se selecciona entre el grupo que consiste en fresa, calabaza, pepino, tomate, rosa, pimiento, pepino, berenjena, vid, algodón, cebolla, ajo, trigo, soja, maíz y arroz.

20 5. Un método para obtener un compuesto policétido a partir de una cepa de *Flavobacterium* sp. H492 (n.º de acceso a NRRL B-50584), que comprende

- (i) cultivar la cepa durante un tiempo suficiente para obtener dicho compuesto policétido y  
(ii) aislar el compuesto policétido producido en la etapa (a) del sobrenadante de dicho cultivo.

25 6. Un material de recubrimiento de semillas que comprende la composición de la reivindicación 1.

30 7. El método de acuerdo con la reivindicación 3, en el que dicho nematodo comprende nematodos noduladores de la raíz, reniformes, de quistes o de lesión.

8. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además otro plaguicida químico o biológico, o una sustancia promotora del crecimiento de la planta.

35

FIG. 1

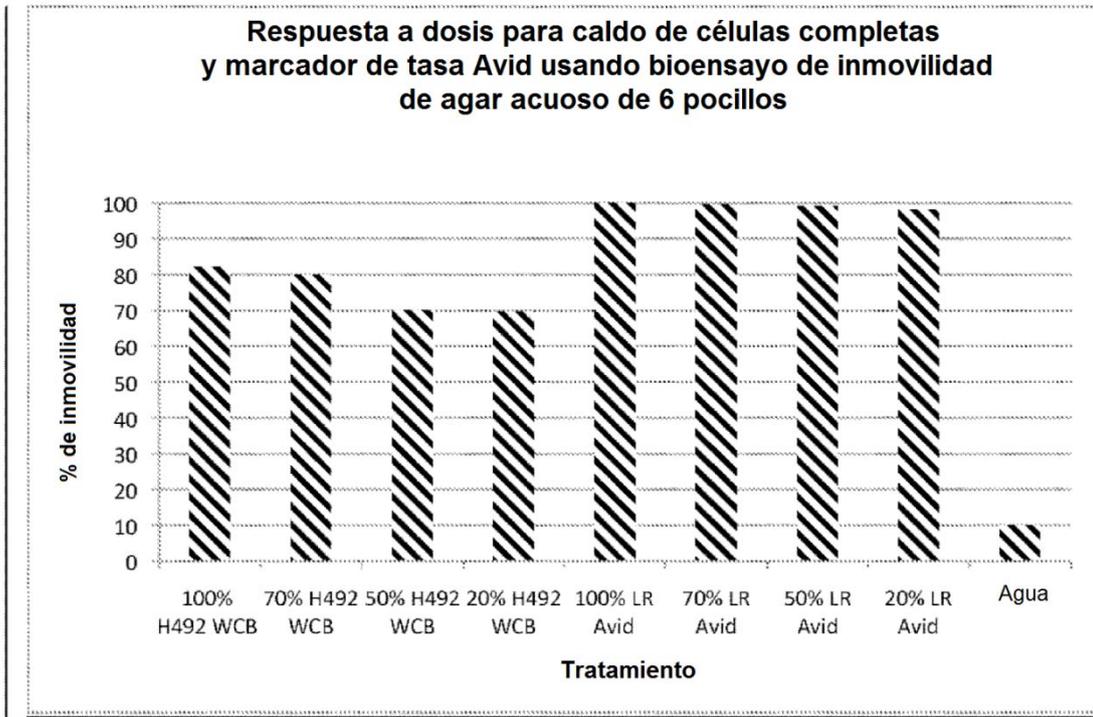


FIG. 2

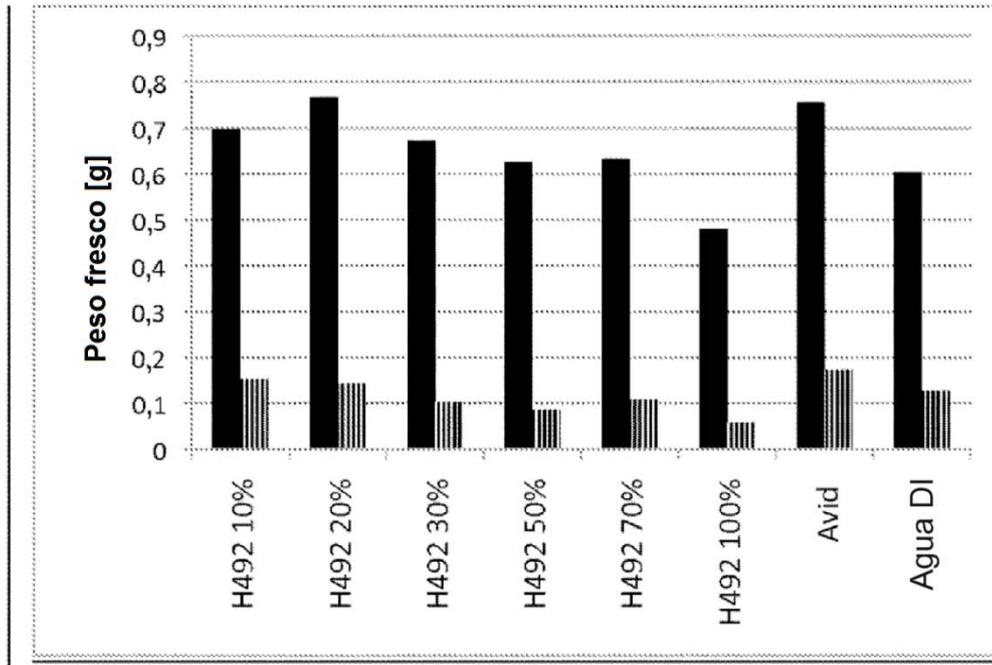


FIG. 3

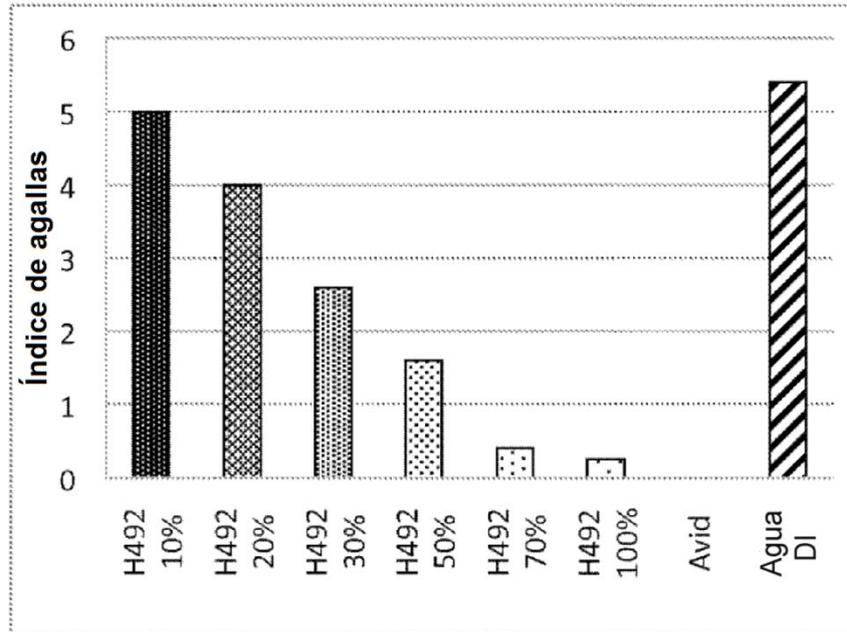


FIG. 4

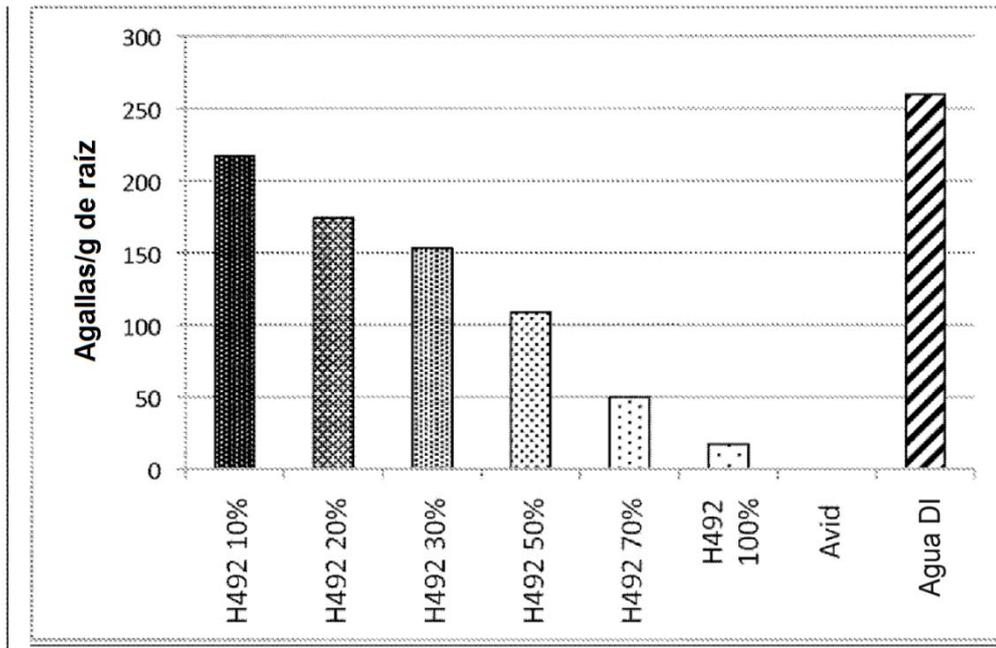


FIG. 5

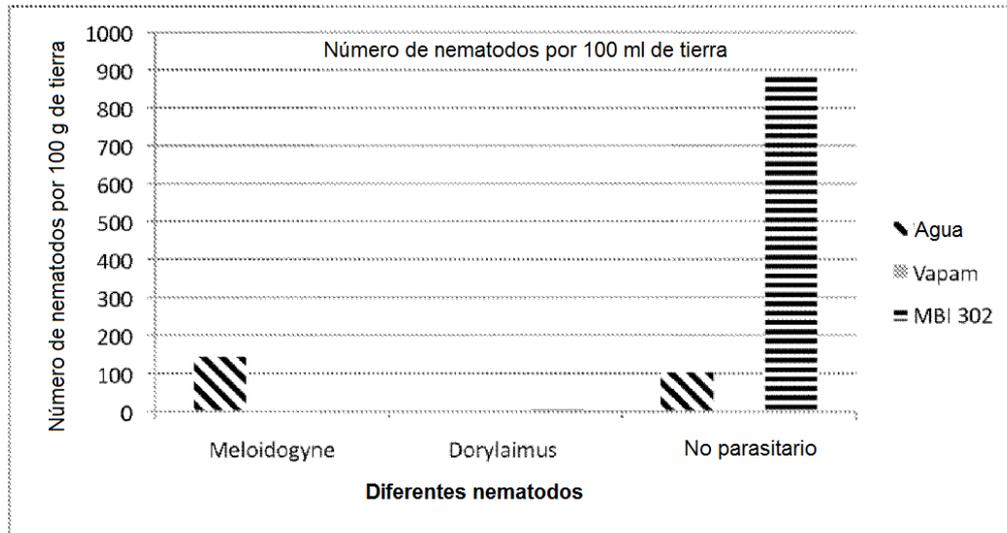


FIG. 6

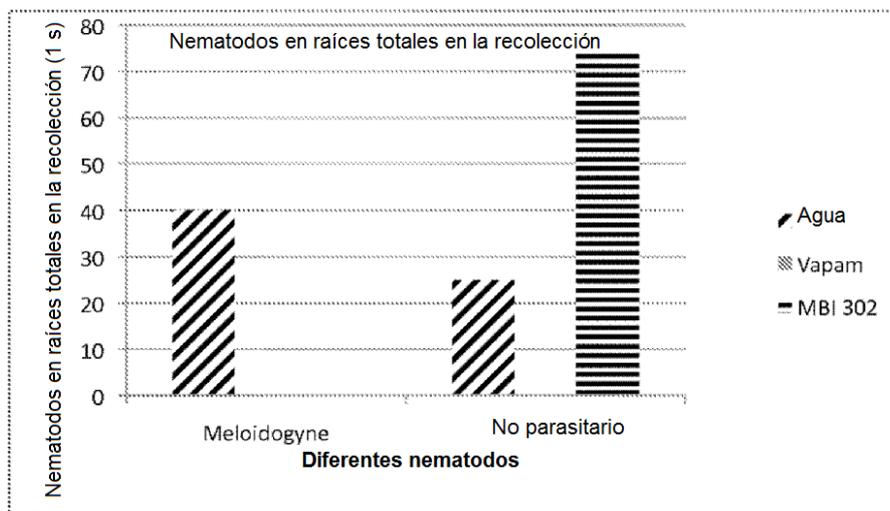


FIG. 7

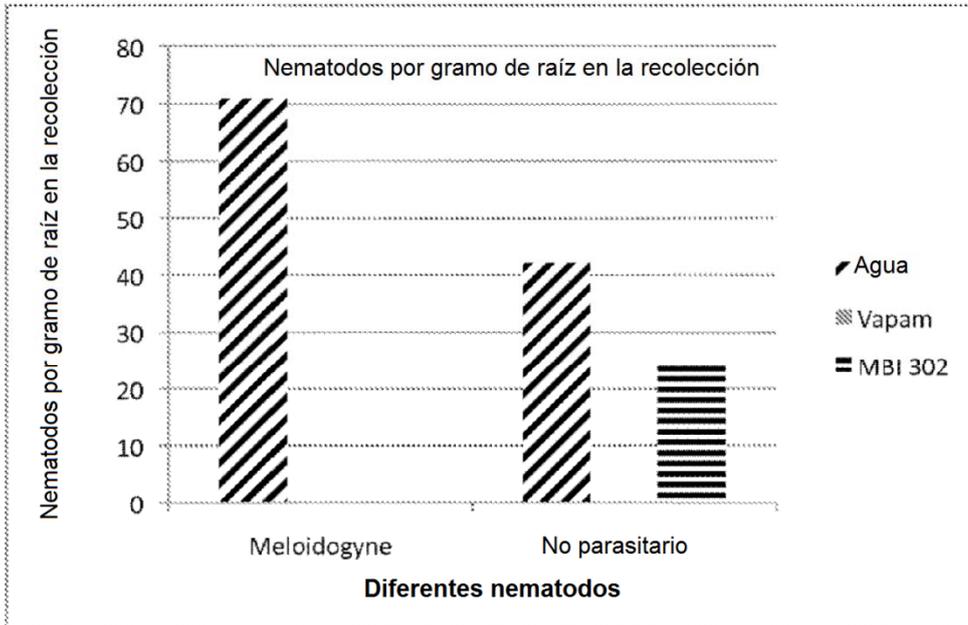


FIG. 8

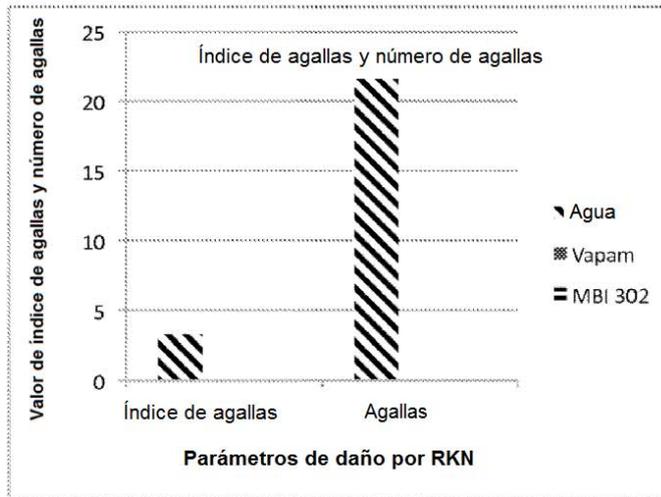


FIG. 9

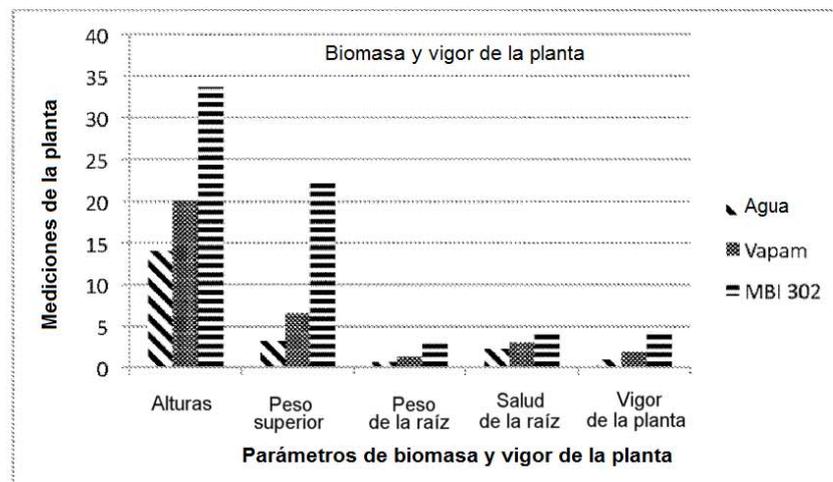


FIG. 10

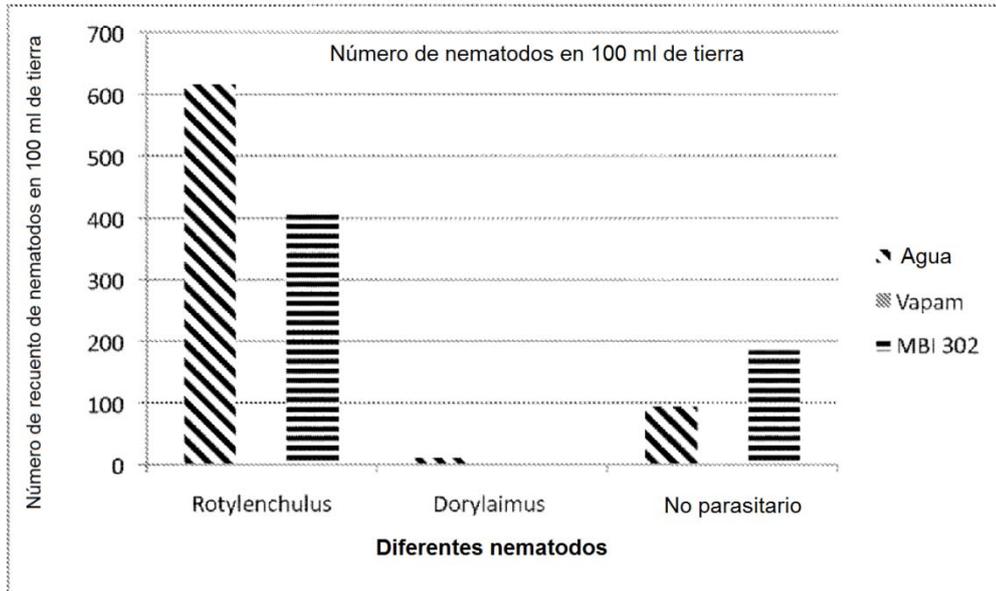


FIG. 11

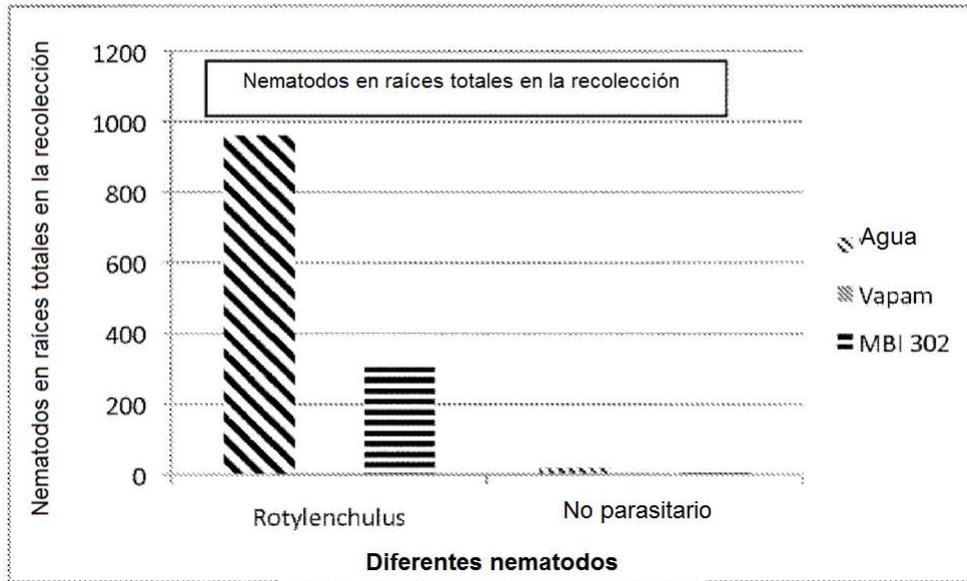


FIG. 12

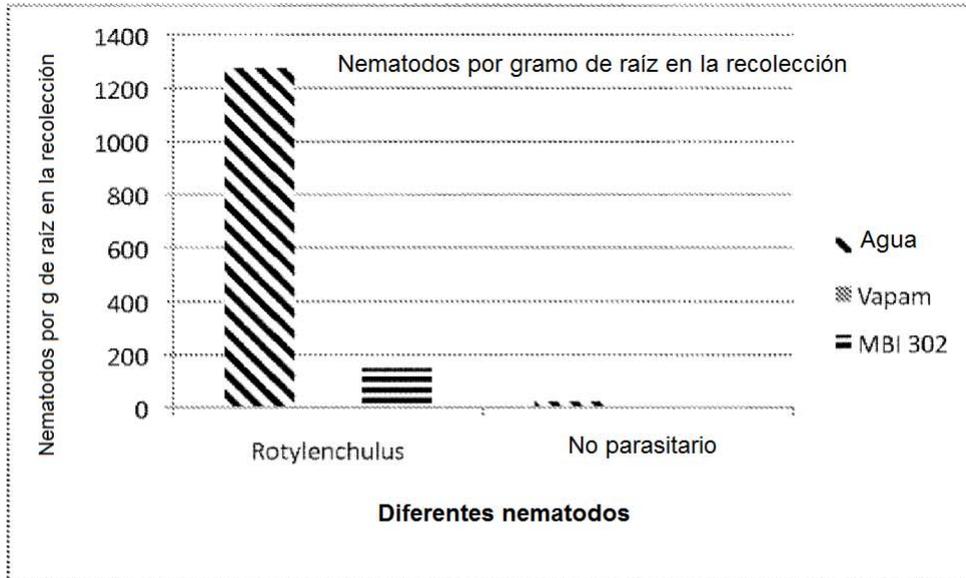


FIG. 13

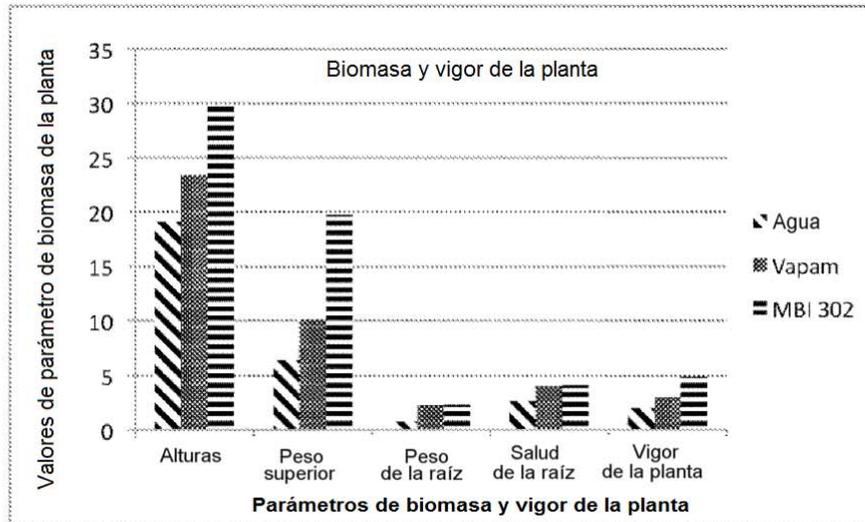


FIG. 14

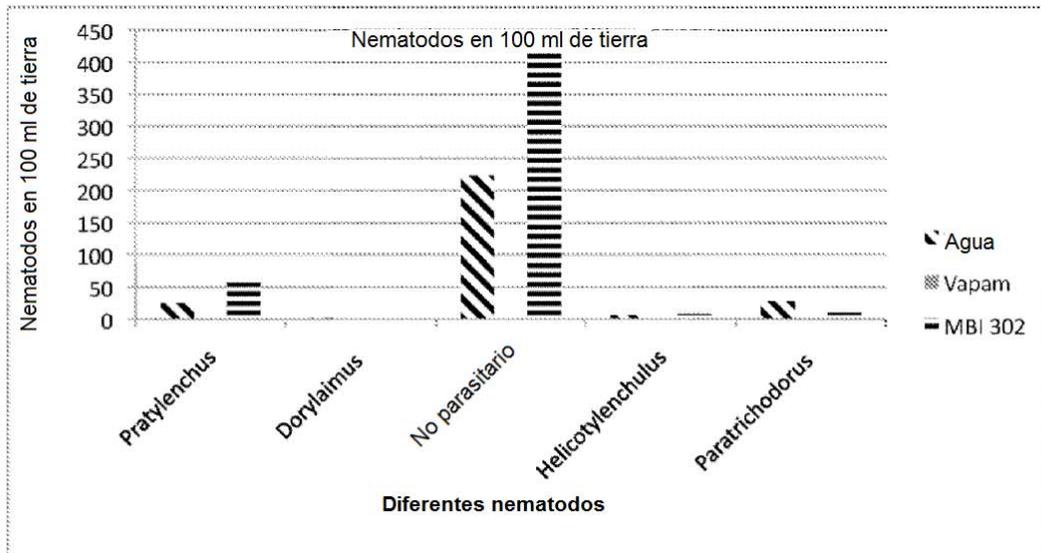


FIG. 15

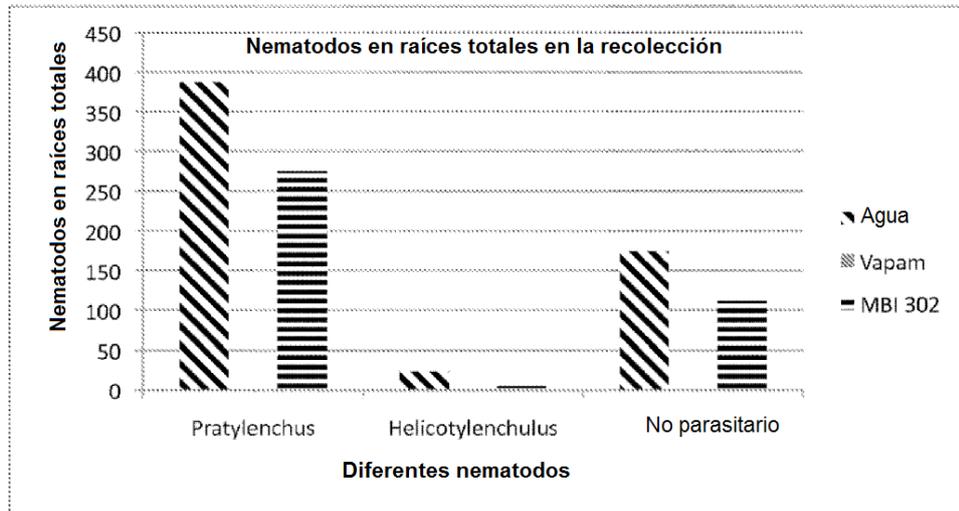


FIG. 16

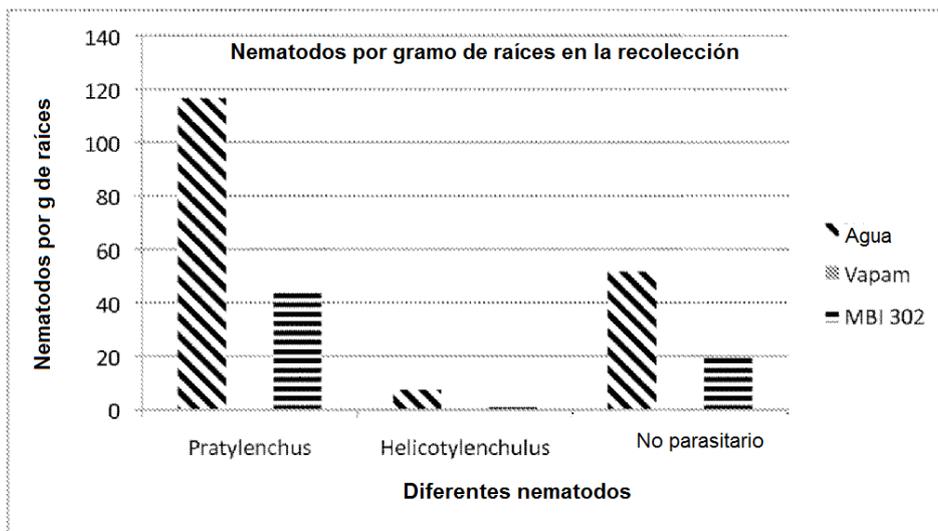


FIG. 17

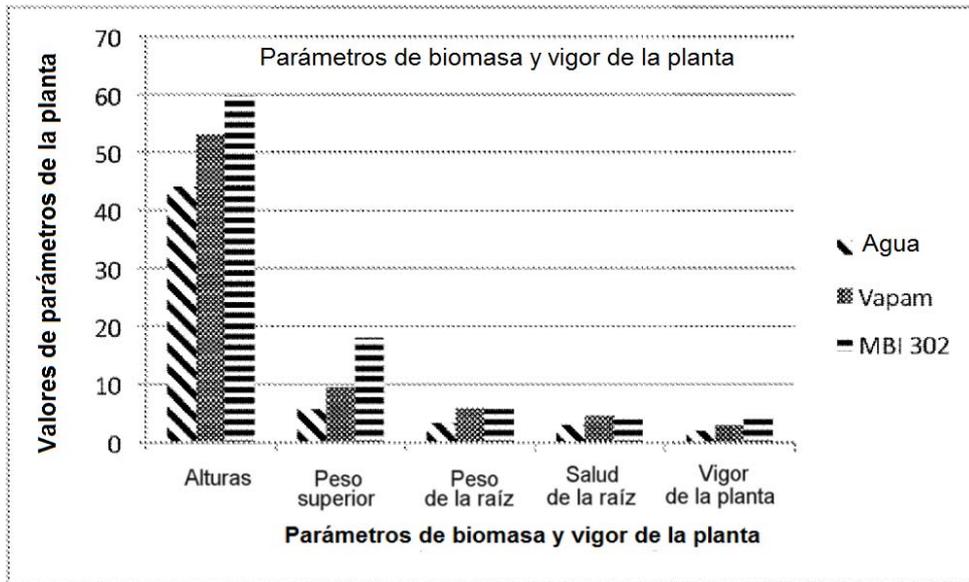


FIG. 18

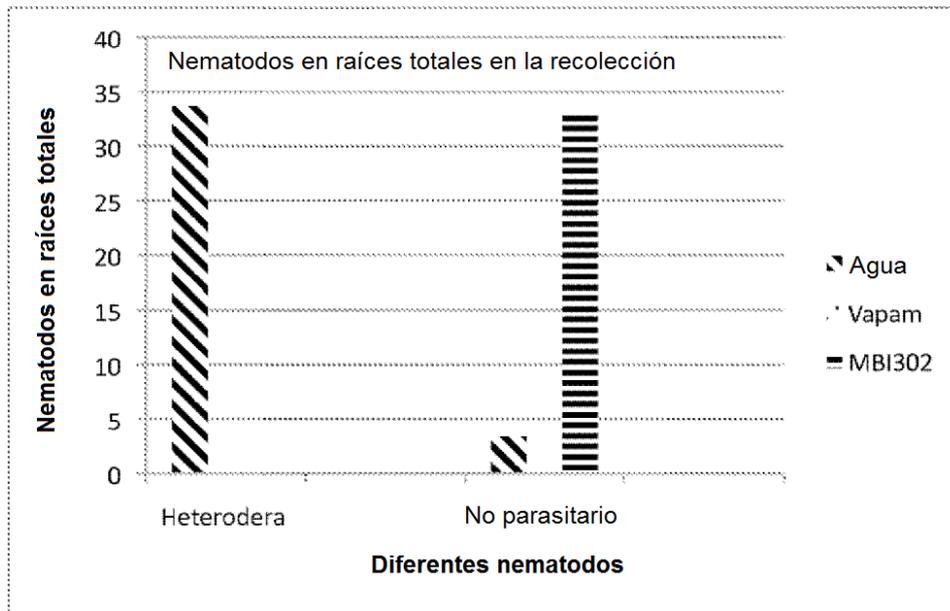


Fig. 19

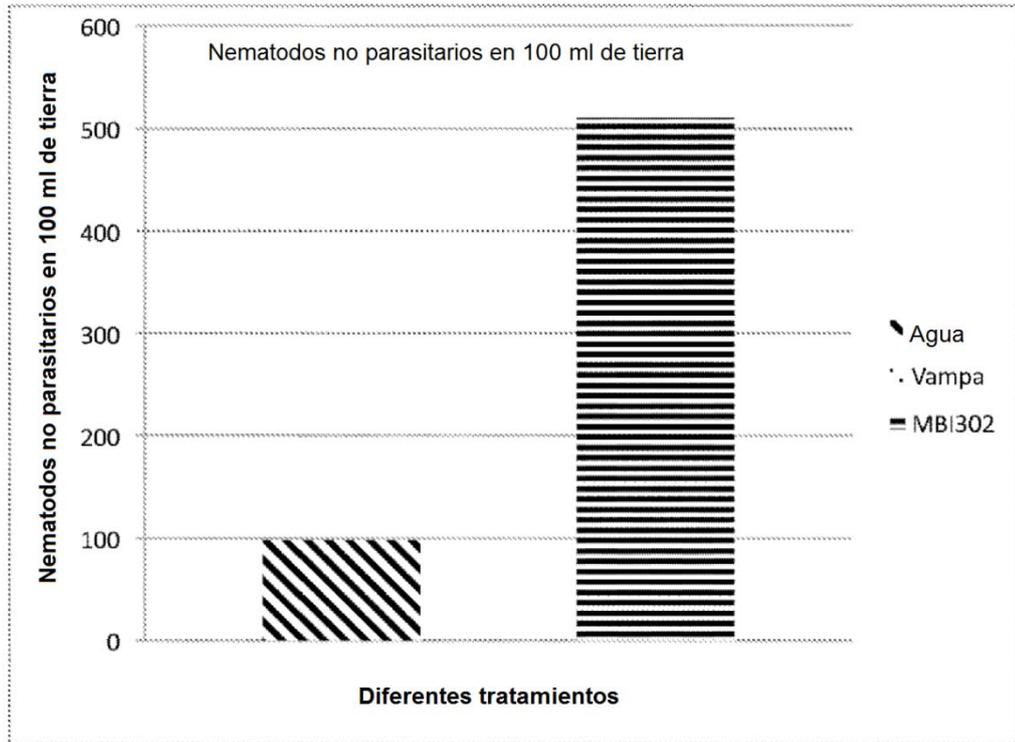


Fig. 20

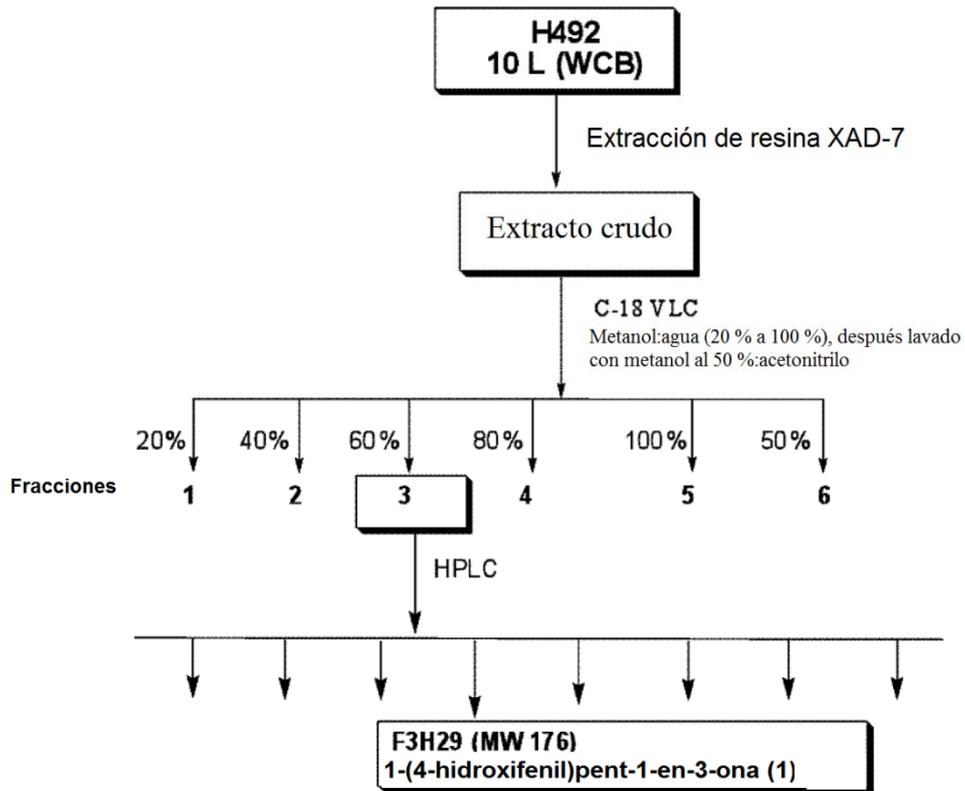


Fig. 21

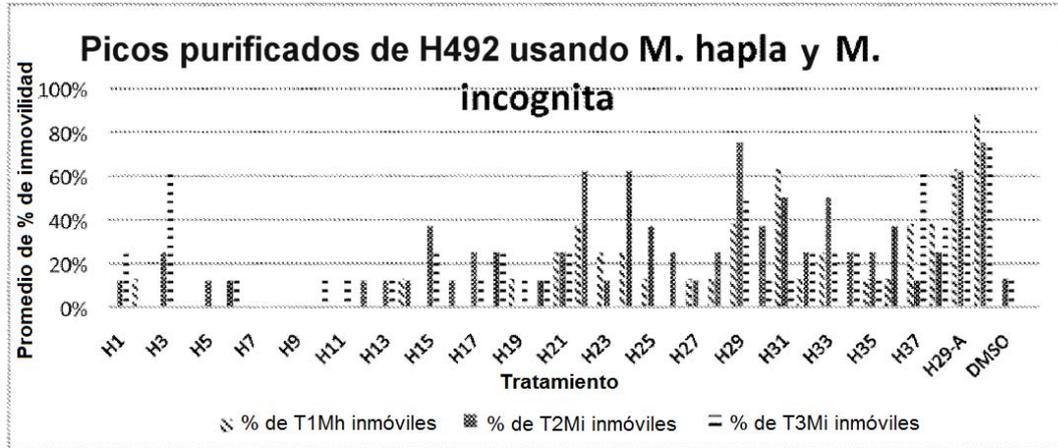


FIG. 22

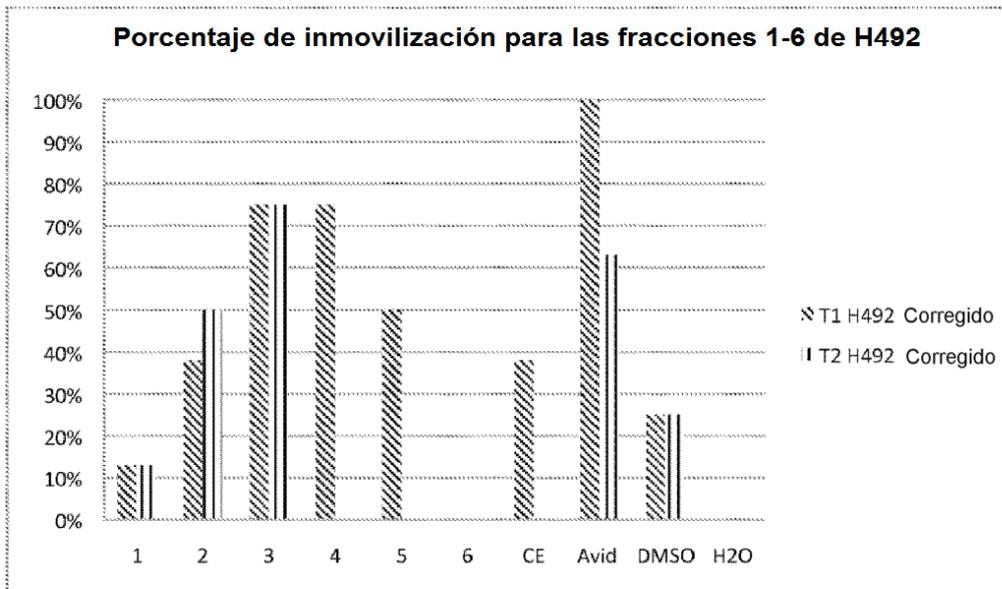


FIG. 23

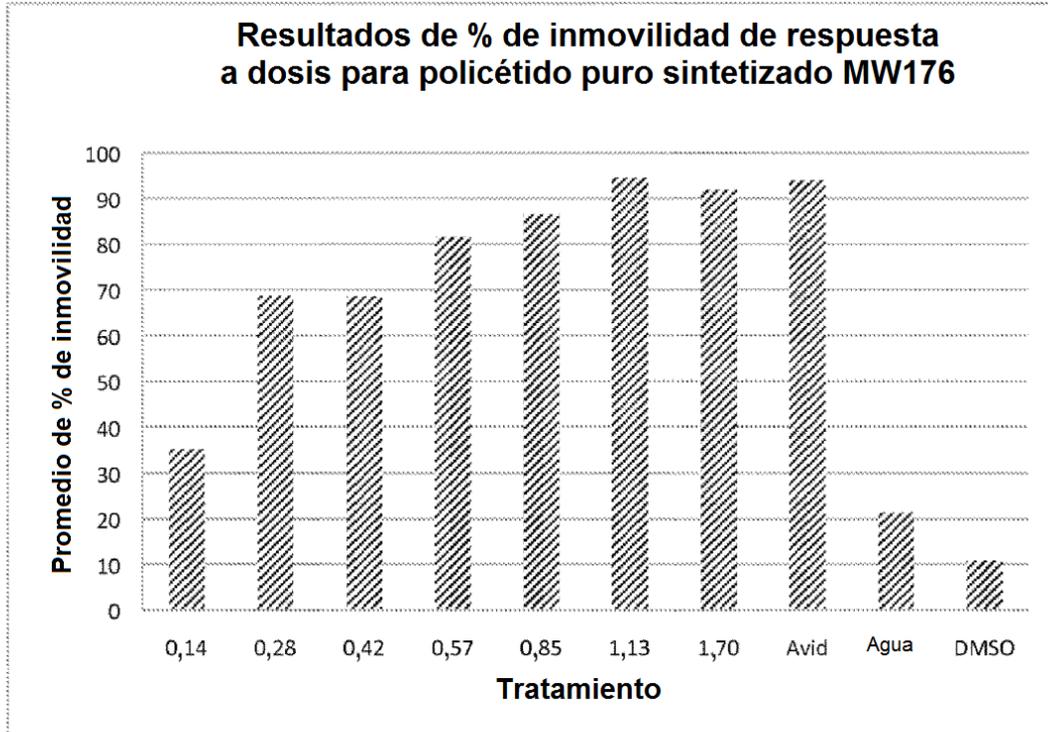


Fig. 24

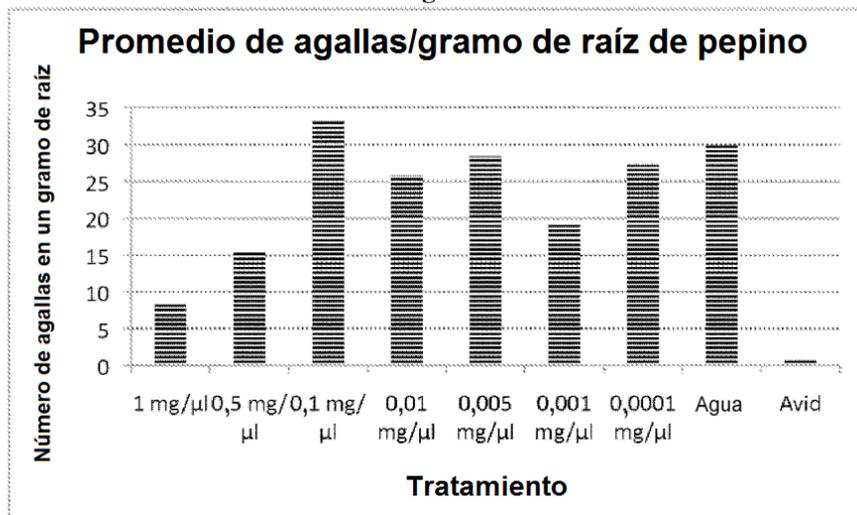


Fig. 25

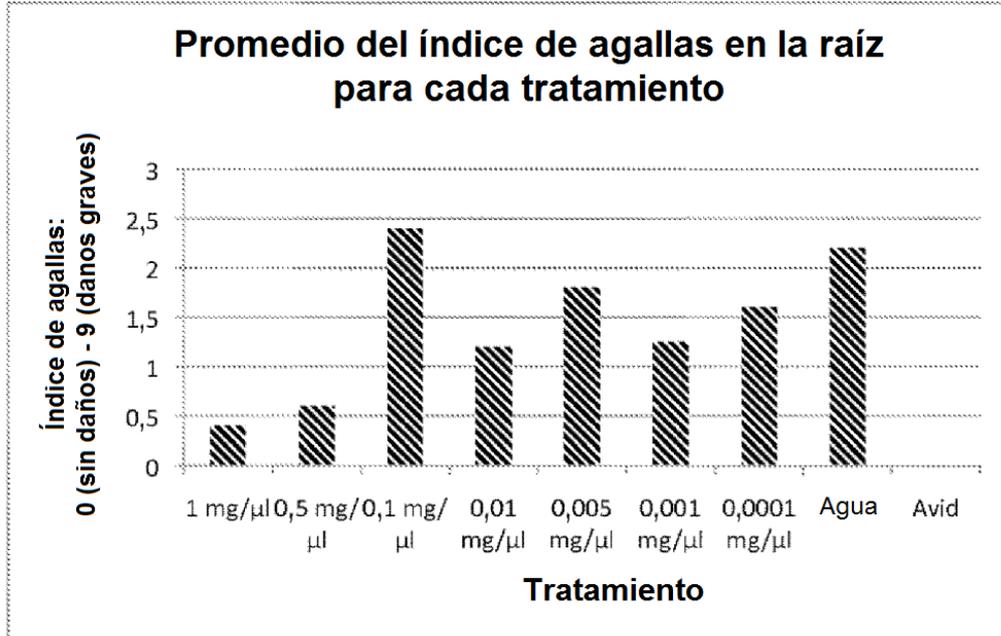


Fig. 26

