

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 740 023**

51 Int. Cl.:

**A01N 63/04** (2006.01)

**A01P 1/00** (2006.01)

**A01P 3/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.05.2011 PCT/IL2011/000420**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.12.2011 WO11151819**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.05.2011 E 11730759 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.05.2019 EP 2575478**

54 Título: **Uso de Pseudozyma aphidis como agente de control biológico contra diferentes patógenos y hongos de plantas en seres humanos y ganado y para la promoción del crecimiento de plantas**

30 Prioridad:

**01.06.2010 US 350217 P**

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

**05.02.2020**

73 Titular/es:

**YISSUM RESEARCH DEVELOPMENT COMPANY  
OF THE HEBREW UNIVERSITY OF JERUSALEM  
LTD. (100.0%)  
Hi-Tech Park, Edmond J. Safra Campus, Givat  
Ram, P.O.B 39135  
91390 Jerusalem, IL**

72 Inventor/es:

**LEVY, MARGANIT y  
GAFNI, AVIVA**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**Observaciones:**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o  
Bemerkungen) en el folleto original publicado por  
la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 740 023 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

Uso de *Pseudozyma aphidis* como agente de control biológico contra diferentes patógenos y hongos de plantas en seres humanos y ganado y para la promoción del crecimiento de plantas

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere a agentes de control biológico derivados de *Pseudozyma aphidis* efectivos contra diversos patógenos de plantas. Más particularmente, la invención proporciona una composición para su uso que comprende un agente de control biológico bactericida, fungicida y pesticida fúngico derivado de *P. aphidis*, que también es útil para mejorar el crecimiento de las plantas, la vitalidad y la resistencia a patógenos, y prolongar la vida útil de los productos y otros productos orgánicos. La invención también se refiere a procedimientos para lograr lo mismo.

**Antecedentes de la invención**

Los patógenos de las plantas desafían los esfuerzos para maximizar la producción de cultivos a través de su capacidad para desarrollar rápidamente resistencia a pesticidas, lo que puede dar como resultado en enormes pérdidas de rendimiento sobre una base anual. Uno de los objetivos principales de la investigación actual es el desarrollo de nuevas herramientas para controlar patógenos.

15 Los agentes de control biológico fúngicos se han convertido en una alternativa importante al uso de productos químicos debido a inquietudes ambientales. El control biológico se puede lograr mediante uno o una combinación de mecanismos: antibiosis, micoparasitismo, competencia y resistencia inducida en la planta huésped. Estos mecanismos pueden dificultar el crecimiento y desarrollo del patógeno, reduciendo así la enfermedad. El complejo modo de acción de los agentes de control biológico reduce la capacidad de los patógenos para desarrollar resistencia. El desarrollo de un agente de control biológico comienza con el descubrimiento de antagonistas, seguido de aislamiento y caracterización de su actividad potencial de control biológico.

Algunos productos biofungicidas están disponibles comercialmente en algunos países, por ejemplo AQ10, que contiene conidios de *Ampelomyces quisqualis* y Sporodex, que se basa en los conidios de la levadura *Pseudozyma flocculosa*, ambos utilizados para el control del oídio. También hay algunos productos basados en *Trichoderma* spp., tal como Throcodex y Thrichopel, que se utilizan contra el moho gris, la podredumbre de la raíz y el marchitamiento de la raíz. Sin embargo, el uso del control biológico es todavía moderado en comparación con el de los fungicidas químicos [Paulitz, T.C. y Belanger, R.R. (2001) Annu. Rev. Phytopathol. 39:103-133].

Se cree que las levaduras epífitas que colonizan diferentes superficies de las plantas tienen actividad de control biológico y proporcionan una barrera natural contra algunos patógenos de las plantas [Avis, T.J. y Belanger, R.R. (2001) Appl. Environ. Microbiol. 67 (2): 956-960; Urquhart, E.J. y Punja, Z.K. (2002) Can. J. Microbiol. 48(3):219-229]. La actividad de control biológico de levaduras y hongos de tipo levadura se ha demostrado para enfermedades posteriores a la recolección [Spadaro, D. y Gullino, M.L. (2004) International Journal of Food Microbiology 91:185-194] y enfermedades en el invernadero [Paulitz, T.C. y Belanger, R.R. (2001) Annu. Rev. Phytopathol. 39( 103-133)]. *Pseudozyma* spp. son un pequeño grupo de levaduras relacionadas con los Ustilaginales [Boekhout, T. (1995) General and Applied Microbiology 41(359-366)]. Son en su mayoría epífitas (obtienen la humedad y los nutrientes del aire y la lluvia) o saprófitos (crecen y obtienen su alimento de la materia orgánica muerta o en descomposición) y no son patógenas para las plantas y los animales [Avis, T.J. y Belanger, R.R. (2002) FEMS Yeast Res 2(1):5-8]. Se ha descubierto recientemente que *Pseudozyma rugulosa* y *P. flocculosa* exhiben actividad biológica contra los diferentes oídios con los que están asociados [Dik, A.J., y col., (1998) Eur. J. Plant Pathol. 104(413-423)]. Se ha descubierto que *P. flocculosa* secreta un ácido graso inusual que muestra actividad antibiótica contra varios patógenos [Avis, T.J. y Belanger, R.R. (2001) Appl Environ Microbiol 67(2):956-960; Avis, T.J., y col., (2001) Phytopathology 91(3):249-254.]. Por otro lado, Avis y col., [Avis, T.J., y col., (2001) Phytopathology 91(3):249-254] no encontraron colapso de colonias de oídio (*Sphaerotheca fuliginea* (Schlechtend.:Fr.) Pollacci) y ninguna producción de ácidos grasos antifúngicos por *Pseudozyma aphidis* aislada de las secreciones de pulgón (aislado CBS 517.83). *P. aphidis* es un pariente cercano de *P. rugulosa* [Begerow, D. y Bauer, R. (2000) Mycol. Res. 104(53-60)], que se aisló por primera vez de las secreciones de pulgón [Henninger, W. y Windisch, S. (1975) Arch. Microbiol. 105(1):47-48] pero también se ha descubierto en superficies de plantas [Allen, T.W., y col., (2004) Can. J. Microbiol. 50(10):853-860].

Los inventores aislaron recientemente la levadura epífita *Pseudozyma aphidis* (aislado L12) de hojas de fresa. El aislamiento L12 se asoció con el colapso de las colonias de oídio. Los datos presentados en el presente documento demuestran que L12 secreta metabolitos extracelulares que inhiben varios patógenos fúngicos y bacterianos *in vitro*. Además, la aplicación de esporas L12 en hojas de tomate desprendidas o plantas de tomate enteras en el invernadero redujo significativamente la infección por *Botrytis cinerea*. Por lo tanto, los inventores caracterizan aún más el aislado L12 de *P. aphidis*, desarrollándolo como un eficiente agente de control biológico contra patógenos de plantas. Las condiciones necesarias para la producción en masa del cultivo activo se caracterizan por probar varias temperaturas y medios y monitorizar la concentración y actividad de las esporas mediante bioensayos de *B. cinerea*. Se analiza el establecimiento y la propagación de *P. aphidis* en la planta huésped mediante microscopía. Los inventores también analizan la fracción secretada de L12 contra varios patógenos *in vitro*. Además, las esporas L12 de *P. aphidis* se aplican en plantas de tomate en el invernadero y se verifica su capacidad para controlar patógenos fúngicos y

bacterianos *in vivo*. Los nuevos y eficientes agentes de control biológico proporcionados por la invención pueden contribuir así a reducir la cantidad de productos químicos necesarios para el control de patógenos y, como tales, pueden beneficiar verdaderamente a los agricultores, consumidores y medio ambiente.

5 Los inventores del presente documento desarrollan la aplicación práctica de L12 de *P. aphidis* como un agente de control biológico basado en hongos naturales que aumentan la resistencia de las plantas a infestaciones fúngicas, virales, bacterianas y de insectos, además de potenciar el crecimiento. Los resultados presentados demuestran el alto potencial de L12 de *P. aphidis* para el control de patógenos fúngicos y bacterianos que causan daños importantes a las plantas de cultivo. Adicionalmente, la novedad del aislamiento es que es fácil de producir, muy estable y eficaz a baja concentración. Los productos químicos que se han usado tradicionalmente para controlar los patógenos de las plantas de alimentos están siendo prohibidos o ya no son efectivos y los agricultores orgánicos no pueden usarlos. OTRAS estrategias de control no están disponibles o son impracticables. Debido a las preocupaciones ambientales y la creciente demanda de productos orgánicos, existe una necesidad apremiante de desarrollar nuevas estrategias de defensa biológica.

15 Dai Kitamoto y col., [Journal of Biotechnology, 29 (1993) 91-96] describen las propiedades interfaciales y antimicrobianas de los lípidos A y B de manosileritrol (MEL-A y B) producidos por una cepa de levadura de *Candida antarctica* T-34 a partir de aceite de soja.

El documento WO 2004/020647, describe un procedimiento de fermentación en varias etapas para producir lípidos de manosileritrol (MEL) a partir de aceite graso, utilizando *Pseudozyma aphidis*.

20 Masaaki Konishi y col., [Appl Microbiol. Biotechnol (2007) 75:521-531] describen la producción de diferentes tipos de MEL a partir de aceite de soja, para su uso como biotensioactivos por cepas de *Pseudozyma* recién aisladas.

Udo Rau., y col., [Appl. Microbiol. Biotechnol (2005) 66: 551-559] proporciona la caracterización de *Pseudozyma aphidis* como productor de MEL. Esta publicación desvela además el análisis de diferentes parámetros que influyen en el rendimiento de la producción de MEL, incluyen el uso de diferentes aceites vegetales como primera fuente de carbono.

25 Tomotake Morita y col., [Appl. Microbiol. Biotechnol. (2007) 74:307-315] describe el examen de fuentes de carbono solubles en agua para la producción de MEL por dos manchas de *Pseudozyma*, *P. antarctica* y *P. aphidis*.

Udo Rau., y col., [Eur. J. Lipid. Sci. Technol. 107 (2005) 373-380] describe un procedimiento eficiente para el aislamiento y purificación de MEL producido como un producto de fermentación de aceite de soja.

30 Sin embargo, el uso de esporas de *P. aphidis* o sus metabolitos secretados como una composición pesticida, no se desvela ni se sugiere por ninguna de estas referencias.

Por tanto, un objeto de la presente invención es la provisión de un procedimiento para tratar, prevenir, inhibir, eliminar o retrasar la aparición de infecciones o infestaciones bacterianas, fúngicas o de plagas en una planta o en un material vegetal.

35 Un objeto adicional de la invención es la provisión de una composición pesticida que comprende células, componentes o productos de *Pseudozyma aphidis*, proporcionando una mejor resistencia de la planta a la infección patógena. Además, la composición es adecuada para el tratamiento, mejora, inhibición o eliminación de una infección o infestación establecida.

Estos y otros objetos de la invención serán evidentes a medida que progresa la descripción.

### **Sumario de la invención**

40 Los inventores demuestran en el presente documento las propiedades plaguicidas y promotoras del crecimiento de *Pseudozyma aphidis* y sus productos. En consecuencia, se consideran diversos aspectos de la invención.

45 En el primer aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para tratar, prevenir, inhibir, eliminar o retrasar la aparición de bacterias, infecciones o infestaciones por hongos o plagas en una planta o en un material vegetal que comprende la etapa de aplicar sobre una planta, a un material vegetal o en las proximidades de dicha planta o material vegetal, un agente de control biológico o una composición que lo comprenda, en el que el agente de control biológico comprende al menos uno de:

- a. células de *Pseudozyma aphidis* o cualquier aislado de las mismas;
- b. esporas de *Pseudozyma aphidis*;
- c. medio de cultivo condicionado de *Pseudozyma aphidis*;
- 50 d. compuestos secretados de *Pseudozyma aphidis*;
- e. cualquier extracto o preparación de cualquiera de (a) a (d); y
- f. una combinación de al menos dos de los agentes de control biológico definidos en de (a) a (e). La composición puede opcionalmente comprender además vehículos, diluyentes y excipientes.

Un segundo aspecto de la invención se refiere a un procedimiento para conferir resistencia en plantas contra infecciones o infestaciones de plagas. El procedimiento comprende la etapa de aplicar en una planta, a un material vegetal o en las proximidades de dicha planta o material vegetal, un agente de control biológico o una composición que lo comprenda, en el que el agente de control biológico comprende al menos uno de:

- 5 a. células de *Pseudozyma aphidis* o cualquier aislado de las mismas;
- b. esporas de *Pseudozyma aphidis*;
- c. medio de cultivo condicionado de *Pseudozyma aphidis*;
- d. compuestos secretados de *Pseudozyma aphidis*;
- 10 e. cualquier extracto o preparación de cualquiera de (a) a (d); y
- f. una combinación de al menos dos de los agentes de control biológico definidos en de (a) a (e). La composición comprende, opcionalmente, además vehículos, diluyentes y excipientes.

La invención también proporciona en el tercer aspecto un procedimiento para promover el crecimiento en plantas. El procedimiento comprende la etapa de aplicar en una planta, a un material vegetal o en las proximidades de dicha planta o material vegetal, un agente de control biológico o una composición que lo comprenda, en el que el agente de control biológico comprende al menos uno de:

- 15 a. células de *Pseudozyma aphidis* o cualquier aislado de las mismas;
- b. esporas de *Pseudozyma aphidis*;
- c. medio de cultivo condicionado de *Pseudozyma aphidis*;
- d. compuestos secretados de *Pseudozyma aphidis*;
- 20 e. cualquier extracto o preparación de cualquiera de (a) a (d); y
- f. una combinación de al menos dos de los agentes de control biológico definidos en de (a) a (e). La composición puede comprender, opcionalmente además, vehículos diluyentes y excipientes.

Además de proporcionar composiciones para proteger plantas o materiales vegetales de plagas y para promover el crecimiento en plantas, la invención también proporciona una composición para su uso.

- 25 Por tanto, en un aspecto adicional, la invención se refiere a una composición que comprende como principio activo un agente de control biológico para su uso para tratar, prevenir, inhibir, eliminar o retrasar la aparición de infecciones o infestaciones por hongos en seres humanos o ganado. La composición comprende al menos uno de:
- a. células de *Pseudozyma aphidis* o cualquier aislado de las mismas;
- b. esporas de *Pseudozyma aphidis*;
- 30 c. medio de cultivo condicionado de *Pseudozyma aphidis*;
- d. compuestos secretados de *Pseudozyma aphidis*;
- e. cualquier extracto o preparación de cualquiera de (a) a (d); y
- f. una combinación de al menos dos de los agentes de control biológico definidos en de (a) a (e).

La composición comprende, opcionalmente, además vehículos diluyentes y excipientes.

- 35 También se desvela un procedimiento para promover el crecimiento en una planta que comprende la etapa de aplicar sobre una planta, a un material vegetal o en las proximidades de la planta o material vegetal, un agente de control biológico o una composición que lo comprenda. El agente de control biológico comprende al menos uno de:
- a. Células de *Pseudozyma aphidis* o cualquier aislado o mutante de las mismas;
- b. esporas de *Pseudozyma aphidis*;
- 40 c. medio de cultivo condicionado de *Pseudozyma aphidis*;
- d. compuestos secretados de *Pseudozyma aphidis*;
- e. cualquier extracto o preparación de cualquiera de (a) a (d); y
- f. una combinación de al menos dos de los agentes de control biológico definidos en de (a) a (e).

Otros aspectos y realizaciones se desvelan en las reivindicaciones adjuntas.

- 45 Los inventores también contemplaron el uso del agente de control biológico de acuerdo con la invención en la preparación de las composiciones pesticidas y promotoras del crecimiento.

Por lo tanto, también se desvela el uso de un agente de control biológico en la fabricación de una composición pesticida para prevenir, mejorar, inhibir, eliminar o retrasar la aparición de infecciones o infestaciones por plagas. El agente de control biológico comprende al menos uno de:

- 50 a. Células de *Pseudozyma aphidis* o cualquier aislado o mutante de las mismas;
- b. esporas de *Pseudozyma aphidis*;
- c. medio de cultivo condicionado de *Pseudozyma aphidis*;
- d. compuestos secretados de *Pseudozyma aphidis*;
- e. cualquier extracto o preparación de cualquiera de (a) a (d); y
- 55 f. una combinación de al menos dos de los agentes de control biológico definidos en de (a) a (e).

También se desvela el uso de un agente de control biológico en la fabricación de una composición para promover el crecimiento en plantas. El agente de control biológico comprende al menos uno de:

- a. Células de *Pseudozyma aphidis* o cualquier aislado o mutante de las mismas;
- b. esporas de *Pseudozyma aphidis*;
- 5 c. medio de cultivo condicionado de *Pseudozyma aphidis*;
- d. compuestos secretados de *Pseudozyma aphidis*;
- e. cualquier extracto o preparación de cualquiera de (a) a (d); y
- f. una combinación de al menos dos de los agentes de control biológico definidos en de (a) a (e).

Estos y otros aspectos de la invención se harán evidentes de la mano de las siguientes figuras.

10 **Breve descripción de las figuras**

**FIGURA 1A-1B**

**Aislamiento de L12 de *Pseudozyma aphidis***

**Fig. 1A:** Cotiledones de pepino tratados con agua destilada (DW) o esporas L12 antes de la inoculación con oídio.

15 **Fig. 1B:** El crecimiento de L12 en PDA secreta metabolitos rosados en los medios.

**FIGURA 2**

**Alineación de la secuencia de *P. aphidis* con las bases de datos disponibles**

Una alineación de secuencia del aislamiento de L12 aislar(indicadas por SEQ ID NO. 5), *P. aphidis* (indicado por SEQ ID NO. 6), *P. regulosa* (indicado por SEQ ID NO. 7) y *P. Antarctica* (indicado por SEQ ID NO. 8) se muestra para ITS1.

20

**FIGURA 3A-3J**

**Crecimiento de *P. aphidis* en placa de PDA y en plantas**

**Fig. 3A:** Imagen de microscopio óptico de *P. aphidis* después de 10 días de crecimiento en medio PDA. Las flechas marcan las secreciones.

25 **Fig. 3B:** Aparecen formas de crecimiento de levadura en una imagen de microscopio óptico tomada desde arriba de *P. aphidis* en PDA.

**Fig. 3C:** Aspecto similar a Synemata de *P. aphidis* en PDA como se ve en un microscopio óptico.

**Fig. 3D:** Forma de micelio/similar a levadura de *P. aphidis* en PDA como se ve en SEM en el perfil.

**Fig. 3E:** Forma similar a levadura de *P. aphidis* en PDA como se ve en SEM desde arriba.

30 **Fig. 3F:** *P. aphidis* después de 2 días de crecimiento en la hoja de tomate como se ve en un microscopio óptico.

**Fig. 3G:** Forma de espora en PDB usando un hemicítometro en un microscopio óptico.

**Fig. 3H:** Forma de espora en YMPD usando un hemicítometro en un microscopio óptico.

**Fig. 3I y 3J;** *P. aphidis* después de 3 días de crecimiento en la hoja de *A. thaliana* (SEM): las flechas indican *P. aphidis*.

35

**FIGURA 4**

***P. aphidis* sobrevive a la exposición a rayos UV**

10<sup>8</sup> células de *P. aphidis* inoculadas en placas de PDA se expusieron a UV durante diferentes cantidades de tiempo (0, 10, 20 y 30 min) y luego se transfirieron a la incubadora a 25 °C. Las fotos de las placas expuestas se registraron después de 3 semanas. Abreviaturas: T. exp. UV (min), (Tiempo de exposición a UV (min)).

40

**FIGURA 5A-5C**

**Optimización del cultivo de *P. aphidis***

**Fig. 5A:** Se muestra el diámetro de la colonia de *P. aphidis* cultivada en PDB en función de la temperatura de cultivo y el tiempo de incubación.

45 **Fig. 5B:** Se muestra el diámetro de las secreciones de colonias de *P. aphidis* cultivadas en PDB en función de la temperatura de cultivo y el tiempo de incubación.

**Fig. 5C:** Se muestran fotos de *P. aphidis* cultivadas en PDB durante 21 días a diferentes temperaturas.

Abreviaturas: Diam. de la col. (mm), (diámetro de la colonia (mm)); Diam. secre. (mm) (diámetro de las secreciones (mm)); T. (d), (tiempo (días)).

**FIGURA 6**

**Secreción de celulasa por *P. aphidis***

*P. aphidis* se cultivó en placas de agar de agua corriente cubiertas con y sin membrana de celulosa. El número de células se registró 7 días después de la inoculación. Los promedios de 10 muestras se presentan con barras de errores estándar. \* (p<0,05; prueba t).

50

Abreviaturas: (M+), (placas cubiertas con membrana de celulosa); (M-), (placas sin membrana de celulosa)

**FIGURA 7A-7C****Inhibición in vitro de fitopatógenos por las secreciones de *P. aphidis***

**Fig. 7A:** Se cultivaron L12 en tubos de diálisis que cubrían placas de PDA. Después de 10 días, el tubo se retiró junto con el *P. aphidis* y las placas que contenían la fracción secretada se usaron para los ensayos de germinación de esporas de hongos. Se muestra la inhibición de varios hongos (en mm de radio) utilizando extractos de acetato de etilo de las secreciones de *P. aphidis*.

**Fig. 7B:** Inhibición de varias bacterias (en mm de radio) utilizando extractos de acetato de etilo de las secreciones de *P. aphidis*.

**Fig. 7C:** Inhibición de diversas bacterias y hongos (en mm de radio) utilizando extractos de hexano de las secreciones de *P. aphidis*.

Abreviaturas: PG, (*Puccinia graminis*); AB, (*Alternaria brassicicola*); PC, (*Puccinia coronata*); UA, (*Uromyces appendiculatus*); BC, (*Botrytis cinerea*); LT, (*Leveillula taurica*); EP, (*Penicillium digitatum*); AT (*Agrobacterium tumefaciens*); CM (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*); EA (*Erwinia amylovora*); PST (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*); PSL (*Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*); SS (*Streptomyces scabies*); XCC (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*); XCV (*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*); Inhib. germ. esp. (%), (inhibición de la germinación de esporas (%)); Hal. de inhib. (mm), (halo de inhibición (mm)).

**FIGURA 8****Actividad biológica de compuestos volátiles emitidos por *P. aphidis***

*P. aphidis* se cultivó en una placa de PDA compartimentada durante 10 días antes de la adición del tapón micelial de *B. cinerea* a la otra mitad de la placa de Petri dividida. Los diámetros de colonias de *B. cinerea* se registraron hasta 4 días después de la inoculación en la mitad de una placa de Petri compartimentada que contenía *P. aphidis* en la otra mitad en comparación con el crecimiento en las placas de control en ausencia de *P. aphidis*.

Abreviaturas: PA+ (placa de Petri que contiene *P. aphidis* compartimentalizada); PA- (placa de Petri sin *P. aphidis*); Diám. de la les. (cm<sup>2</sup>), (Diámetro de la lesión (cm<sup>2</sup>)); T. P. inocul. (días), (tiempo postinoculación (días)).

**FIGURA 9A-9F****Inhibición de hongos por *P. aphidis* en hojas desprendidas y en plantas**

**Fig. 9A:** Las plantas de tomate enteras o las hojas desprendidas se rociaron con esporas de *P. aphidis* o con agua antes de la inoculación con *Botrytis cinerea* (7.500 esporas por foliolo) y la infección se calificó 5 días después de la inoculación. Se muestran fotos de plantas y hojas desprendidas tratadas con 10<sup>8</sup> esporas/ml.

**Fig. 9B:** Foliolos desprendidos de tomate pulverizados con esporas de *P. aphidis* (10<sup>8</sup> esporas/ml) antes de la inoculación con *B. cinerea* (5 ml para cada foliolo; 1.500 esporas/ml).

**Fig. 9C:** Las plantas de tomate enteras se rociaron con esporas de *P. aphidis* (10<sup>4</sup> o 10<sup>8</sup> esporas/ml) antes de la inoculación con *B. cinerea* (5 ml para cada foliolo; 1.500 esporas/ml).

**Fig. 9D:** Plantas de tomate enteras rociadas con 10<sup>8</sup> esporas/ml de esporas de *P. aphidis* autoclavadas o no autoclavadas antes de la inoculación con *B. cinerea* (5 ml para cada foliolo; 1.500 esporas/ml).

**Fig. 9E:** Hojas de tomate desprendidas rociadas con 10<sup>8</sup> esporas de *P. aphidis*/ml 3 días después de la infección con *B. cinerea*. Se muestran fotos de hojas desprendidas 10 días después de la pulverización con *P. aphidis*.

**Fig. 9F:** Plántulas de pepino rociadas con esporas de *P. aphidis* (10<sup>8</sup> esporas/ml) (PA) o con agua (control) tres días antes de la inoculación con *Sphaerotheca fuliginea*. La infección se puntuó a los 11, 12 y 16 días después de la inoculación.

Abreviaturas: % de hojas infectadas (% de hojas infectadas); % Infect. (% infecciones); Cont. (control); L12-10<sup>4</sup> (L12 de *P. aphidis* 10<sup>4</sup> esporas/ml); L12-10<sup>8</sup> (L12 de *P. aphidis* 10<sup>8</sup> esporas/ml); autoclav. (esterilizado en autoclave); dH<sub>2</sub>O (agua destilada); Plant. ent. (planta entera); Hojas despr. (hojas desprendidas); T. P. Infect. (d), (tiempo posterior a la infección (días)); PA (tratado con *P. aphidis*); B.C. (*B. cinerea*).

**FIGURA 10A-10B****Inhibición de bacterias por *P. aphidis* en plantas**

**Fig. 10A:** Las plantas de tomate enteras se rociaron con esporas de *P. aphidis* (10<sup>8</sup> esporas/ml) (PA) o con agua (control) antes de la inoculación con *Clavibacter michiganensis* (DO<sub>600</sub> ~ 0,9) y se registraron durante 38 días después de la inoculación. Síntomas puntuados durante los 38 días posteriores a la inoculación.

**Fig. 10B:** La recuperación se puntuó 38 días después de la inoculación.

Abreviaturas: PA+ (tratado con *P. aphidis*); PA- (sin tratar); T.P. Infect. (d), (tiempo posterior a la infección (días)); Plan. infect. (%), (plantas infectadas (%)); D (muertas); I (infectadas); R (recuperadas).

**FIGURA 11A-11C****Efectos promotores del crecimiento de la aplicación de *Pseudozyma aphidis***

**Fig. 11A:** Las plántulas de tomate se rociaron cuatro veces con 10<sup>8</sup> esporas de *P. aphidis*/ml en intervalos de 1 a 2 semanas y su número de hojas se controló durante 7 semanas de crecimiento después de la primera

aplicación;

**Fig. 11B:** Altura de la hoja monitorizada durante 7 semanas de crecimiento después de la primera aplicación;

**Fig. 11C:** El peso fue monitorizó 7 semanas después de la primera aplicación.

5 Plantas tratadas representadas por líneas con triángulos o barras blancas, plantas sin tratar representadas por línea con cuadrados o barras rayadas; los asteriscos significan estadísticamente diferente por la prueba t p <0,05. Abreviaturas: N.º Hoj. (número de hojas); Alt. (cm) (altura (cm)); Pes. (g) (peso (g)); D. desp. apl. (días después de la aplicación); con 10<sup>8</sup>/ml esp. *P. aphidis* (con tratamiento con 10<sup>8</sup> esporas de *P. aphidis*/ml); sin 10<sup>8</sup>/ml esp. *P. aphidis* (sin tratamiento con 10<sup>8</sup> esporas de *P. aphidis*/ml).

**FIGURA 12A-12B**

10 **Resistencia inducida por L12**

**Fig. 12A:** Las plantas de tomate se rociaron con 10<sup>8</sup> de *P. aphidis* y *PR1*, la expresión de los genes *PDF1.2* y *PIN2* se monitorizó 10 días después de la aplicación utilizando una PCR semicuantitativa en comparación con las plantas no tratadas.

15 **Fig. 12B:** Las plantas de *Arabidopsis* se rociaron con 10<sup>8</sup> de *P. aphidis* y la expresión de los genes *PR1* y *PDF1.2* se monitorizó 10 días después de la aplicación utilizando una PCR semicuantitativa en comparación con las plantas no tratadas.

Abreviaturas: Cont. (control); Trat. (tratadas).

**FIGURA 13A-13C**

20 **L12 controla *Botrytis cinerea* en mutante de *Arabidopsis* deteriorado en acumulación de SA y señalización de JA**

El tamaño de la lesión de *B. cinerea* se midió de 24 a 72 h después de la inoculación de los mutantes de hormona NahG (deficiente en SA), *jar1-1* (insensible a JA), *npr1-1* (insensible a JA) y el SV (PA-) y se compararon con las lesiones en sus homólogos rociadas con *P. aphidis* (PA+).

25 **Fig. 13A:** Fotos registradas de *Arabidopsis* SV, NahG y *jar1-1* rociados con *P. aphidis*, frente a las homólogas no rociadas.

**Fig. 13B:** tamaño de la lesión registrada de *Arabidopsis* SV, NahG y *jar1-1* rociados con *P. aphidis*, frente a las homólogas no rociadas.

**Fig. 13C:** tamaño de lesión registrada de *Arabidopsis* SV y *npr1-1* rociado con *P. aphidis*, frente a las homólogas no rociadas.

30 Abreviaturas: PA+ (placa de Petri que contiene *P. aphidis* compartimentalizada); PA- (placa de Petri sin *P. aphidis*); Les. Si. (cm<sup>2</sup>), (tamaño de la lesión (cm<sup>2</sup>)); T. P. Inocula. (d), (tiempo postinoculación (días)); SV (de tipo salvaje).

**Descripción detallada de la invención**

35 La invención se refiere a un agente de control biológico que comprende células de *Pseudozyma aphidis* y cualquier preparación de las mismas, y su aplicación para promover el crecimiento y la salud de las plantas. Más específicamente, la invención desvela composiciones bactericidas, fungicidas, antivíricas, plaguicidas y promotoras del crecimiento de plantas que comprenden ingredientes de células de *Pseudozyma aphidis* o una preparación de las mismas, procedimientos para mejorar la resistencia de las plantas a los fitopatógenos, procedimientos para inducir genes relacionados con el sistema inmunitario en plantas y procedimientos para promover el crecimiento de plantas usando el agente de control biológico de la invención.

40 Por tanto, la invención proporciona un agente de control biológico o una composición que comprende el mismo, en el que el agente de control biológico comprende al menos uno de:

- a. células de *Pseudozyma aphidis* o cualquier aislado de las mismas;
- b. esporas de *Pseudozyma aphidis*;
- c. medio de cultivo condicionado de *Pseudozyma aphidis*;
- 45 d. compuestos secretados de *Pseudozyma aphidis*;
- e. cualquier extracto o preparación de cualquiera de (a) a (d); y
- f. una combinación de al menos dos de los agentes de control biológico definidos en de (a) a (e). Debe observarse que la composición comprende opcionalmente además vehículos, diluyentes y excipientes.

50 Las composiciones pesticidas que comprenden el agente de control biológico anterior son, por lo tanto, efectivas para la protección y conservación, así como para el tratamiento de plantas, seres humanos, ganado, cultivos comerciales, productos agrícolas y materiales industriales infectados o infestados.

55 El término "pesticida" se refiere a una sustancia o mezcla de sustancias destinadas a prevenir, destruir o controlar cualquier plaga. Específicamente, el término se refiere a sustancias o mezclas que son eficaces para tratar, prevenir, mejorar, inhibir, eliminar o retrasar la aparición de infección o infestación relacionada con bacterias, hongos, virus insectos u otras plagas, germinación de esporas y crecimiento de hifas. También se utilizan como sustancias aplicadas

a los cultivos antes o después de la cosecha para proteger el producto contra el deterioro durante el almacenamiento y el transporte.

5 El término "plaga" se define en el presente documento como vectores de plantas, enfermedad humana o del ganado, especies no deseadas de bacterias, hongos, virus, insectos, nematodos o cualquier organismo que cause daño durante o que interfiera de otro modo con la producción, procesamiento, almacenamiento, transporte o comercialización de alimentos, productos agrícolas, madera y productos de madera o piensos animales.

10 Por tanto, la invención proporciona además una composición pesticida que comprende el agente de control biológico para su uso para tratar, prevenir, inhibir, eliminar o retrasar la aparición de infecciones o infestaciones por hongos en seres humanos o ganado. El control biológico se define como la reducción de las poblaciones de plagas por parte de enemigos naturales y, por lo general, implica un papel humano activo. Los agentes de control biológico de las enfermedades de las plantas a menudo se denominan antagonistas. El control biológico exitoso reduce la densidad de población de las especies objetivo. La expresión "agente de control biológico" se refiere a un compuesto o composición que se origina en una materia biológica y es eficaz en el tratamiento, prevención, mejora, inhibición, eliminación o retraso en la aparición de al menos uno de infecciones o infestaciones bacterianas, fúngicas, víricas, por insectos o cualquier otra plaga de plantas e inhibición de la germinación de esporas y el crecimiento de hifas. Se aprecia que cualquier agente de control biológico es ambientalmente seguro, e decir, es perjudicial para la especie objetivo, pero no daña sustancialmente a otras especies de una manera no específica. Adicionalmente, se entiende que la expresión "agente de control biológico" también abarca la expresión "agente de control bioquímico". Los agentes de control bioquímico son semiquímicos, por ejemplo, reguladores del crecimiento de las plantas, hormonas, enzimas, feromonas, alomonas y kairomonas, que son naturales o idénticas a un producto natural, que atraen, retardan, destruyen o de otro modo ejercen una actividad plaguicida.

25 El agente de control biológico comprendido dentro de la composición de acuerdo con la invención, comprende células de *Pseudozyma aphidis*. "Células de *Pseudozyma aphidis*" se refiere a *P. aphidis* que es dimórfico, lo que significa que puede tomar una forma filamentosa y/o de levadura, la que incluye gemación y formaciones de blastoconidios. Más específicamente, la cepa *Pseudozyma aphidis* es sinónimo de *Sterigmatos aphidis*, que fue descrita con detalle por Henninger y Windisch [Arch. Microbiol., 1975, 105, página 49-50]. La cepa se aisló de las secreciones de *Aphididae* en hojas de *Solanum pseudocapsicum* y es capaz de asimilar tanto el inositol como el nitrato de potasio. Estos hongos pueden usar una gran variedad de fuentes de carbono, tales como pentosas, hexosas, alcoholes de azúcar, almidón soluble, etanol y ácidos orgánicos. La reacción de ureasa es positiva. La tinción con sal azul Dazionio B también es positiva. El crecimiento inicial en agar de extracto de malta a 28 °C muestra células alargadas (1,4-3,6) x (4,3-11. 5 μm) a menudo dirigidas a uno o ambos extremos. También se observan células muy largas hasta 40 μm. Una vez completado el crecimiento, el agar se cubre con un micelio aéreo delgado formado por ramificación, cadenas acropetales de blastoconidios fusiformes originadas a partir de denticulos cortos, estructuras de tipo estigma o hifas atenuantes. Al microscopio se muestran hifas septadas con el citoplasma retraído en algunas células y con septos de retracción. El cultivo en estrías es variable, a veces pulverulento, principalmente áspero y plano con margen rugoso. El color es de crema a amarillo. Los hongos son anamorfos para *Ustilaginales* porque la comparación del ADN ribosomal 26S lo colocó en el mismo grupo con *Ustilago maydis* [Boekhout, J. Gen. appl. Microbiol., 1995, 41, página 359-366].

40 Se entiende que la composición de la invención puede comprender células de *Pseudozyma aphidis* o cualquier aislado de las mismas. La expresión "aislado" se interpreta como cualquier individuo o grupo homogéneo de individuos que tienen sustancialmente el mismo complemento alélico. Se entiende que en una población heterogénea de individuos, existe heterogeneidad alélica, en la que algunos individuos portan mutaciones en algunos de sus genes, tales como deleciones, sustituciones, duplicaciones y similares. Un individuo portador de tales mutaciones es, por tanto, un mutante. Se dice que un individuo retirado de dicha población heterogénea está aislado, como son genéticamente su progenie sustancialmente idéntica. También se aprecia que en el presente contexto, "mutante" y "aislado" se refieren a individuos con *Pseudozyma aphidis* mutados en genes para conferir un fenotipo detectable y en casos específicos dicho fenotipo está relacionado con la característica pesticida o comercialmente relevante de *P. aphidis*.

50 Aún más, la composición de la invención puede comprender como agente de control biológico esporas de *P. aphidis*. Una "espora" como se contempla en la presente invención se refiere a al menos una unidad reproductiva inactiva (en aplicación) pero viable de una especie bacteriana o fúngica, específicamente, fúngica. La expresión "esporas de *Pseudozyma aphidis*" se refiere a blastoconidios cilíndricos o fusiformes. El material activo puede ser esporas, formas similares a levadura, formas filamentosas o una combinación de algunas o todas. En las hojas, se encuentra el cuerpo del hongo dimórfico, que incluye blastoconidios en estrigmata, mientras que en medios líquidos, se encuentran principalmente la forma similar a levadura y las esporas, y en medios sólidos son comunes las formas filamentosas y de esporas.

60 Alternativa o adicionalmente, la composición de la invención puede comprender como agente de control biológico un medio de cultivo acondicionado de *Pseudozyma aphidis*. Las expresiones "medio de cultivo de *Pseudozyma aphidis*" o "medio condicionado" se refieren a un medio o un vehículo líquido en el que *Pseudozyma aphidis* se cultivó previamente y al que secretaron compuestos. Los metabolitos del filtrado de cultivo son los compuestos secretados en los medios de crecimiento. El medio de cultivo puede usarse tal cual, o puede procesarse adicionalmente por al menos uno de filtración, centrifugación y extracción.

La composición desvelada en el presente documento puede comprender como principio activo cualquier preparación o fracción secretada de *Pseudozyma aphidis*. La "fracción secretada por *Pseudozyma aphidis*" se refiere a los compuestos generados y secretados por las células.

5 Debe observarse además que cualquier extracto o preparación de dichas células de *Pseudozyma aphidis* puede usarse como un agente de control biológico por la composición de la invención. El término "extractos" se refiere a cualquier sustancia obtenida mediante la extracción de células de *Pseudozyma aphidis*, esporas, filtrado de cultivo o medio acondicionado utilizando disolventes orgánicos tales como, por ejemplo, acetato de etilo o hexano.

Cabe destacar que la composición de la invención puede comprender cualquier combinación de células de *Pseudozyma aphidis*, aislamientos, extractos o medio acondicionado como se describe en el presente documento.

10 Se entiende que la composición de la invención puede comprender, opcionalmente, además un vehículo, diluyente, emulsionante o dispersante agrícolamente aceptable.

Se aprecia que la composición también es efectiva para tratar, prevenir, mejorar, inhibir, reducir o eliminar una infección o infestación establecida de bacterias, hongos, virus, insectos o cualquier otra plaga, y para tratar y prevenir enfermedades causadas por ellas.

15 Como se usa en el presente documento en la especificación y en la sección de reivindicaciones a continuación, el término "tratar" o "que trata" y sus derivados incluye una inhibición, ralentización o inversión sustanciales de la progresión de una afección, mejorar sustancialmente los síntomas de una afección o prevenir sustancialmente la aparición de síntomas de una afección, dicha condición se produce en las plantas por acción de patógenos vegetales, incluyendo plagas, esporas o hifas bacterianas, fúngicas, virales, de insectos u otras plagas de plantas.

20 El término "prevenir" y todas las variaciones de este término pretenden significar contrarrestar antes de que aparezcan el crecimiento, proliferación, infestación, infección, germinación de esporas y crecimiento de hifas fúngicas, de virus, insectos o de otras plagas. En este caso, se entiende que la composición se aplica antes de la exposición a dichos patógenos.

25 Los términos "mejorar" y "mejora" se refieren a la mejora en el estado de la planta tratada provocada por las composiciones y procedimientos de acuerdo con la invención, en el que dicha mejora puede manifestarse en las formas de inhibición de la formación de hifas fúngicas y/o su destrucción, la inhibición, parcial o completa, de la germinación de esporas fúngicas y bacterianas, la inhibición del crecimiento y proliferación de hongos, bacterias u otras plagas, la inducción de respuestas inmunes de la planta y mejora en la altura de dicha planta enferma, el peso, el número de hojas y el sistema radicular. En general, el término se refiere a la mejora en el estado fisiológico de una  
30 planta enferma.

Debe indicarse además que en ciertas realizaciones en las que el sujeto tratado es un ser humano o ganado, el término "tratar" o "que trata" y sus derivados incluye una inhibición, ralentización o inversión sustanciales de la progresión de una afección, mejorar sustancialmente los síntomas de una afección o prevenir sustancialmente la aparición de  
35 síntomas de una afección, dicha condición es provocada en seres humanos o ganado por patógenos humanos o de ganado, incluyendo plagas, esporas o hifas bacterianas, fúngicas, virales, de insectos u otras plagas de plantas.

El término "inhibir" y todas las variaciones de este término pretenden abarcar la restricción o prohibición del crecimiento de bacterias, hongos, virus, insectos o cualquier otra plaga, así como la germinación de esporas.

40 El término "eliminar" se refiere a la erradicación sustancial o eliminación de bacterias, hongos, virus, insectos o cualquier otra plaga contactándolos con la composición de la invención, opcionalmente, de acuerdo con los procedimientos de la invención descritos a continuación.

Los términos "retraso", "retardo" y todas sus variaciones pretenden abarcar la desaceleración del progreso del crecimiento de bacterias, hongos, virus, insectos o cualquier otra plaga, y la germinación de esporas. La expresión "retrasar el inicio" se interpreta como prevenir o ralentizar la progresión de la infestación, infección y crecimiento de bacterias, hongos, virus, insectos o cualquier otra plaga, la germinación de esporas y crecimiento de hifas por un  
45 período de tiempo, de forma que dicha infestación, infección y crecimiento de bacterias, hongos, virus, insectos o cualquier otra plaga, la germinación de las esporas y el crecimiento de las hifas no progresan a lo largo del desarrollo, ni aparecen más tarde que en ausencia del tratamiento de acuerdo con la invención.

La composición pesticida de acuerdo con la invención comprende material derivado de *Pseudozyma aphidis*. Protege las plantas, o cualquier otro material, de los efectos dañinos de microorganismos tales como hongos y bacterias (como se muestra en los Ejemplos 7-10), así como virus, insectos, nematodos y otras plagas. Además, no solo las composiciones de acuerdo con la invención dañan a los organismos patógenos, sino que también mejoran el crecimiento de las plantas e inducen genes de resistencia a patógenos de plantas, como se muestra en los Ejemplos 11 y 12, respectivamente.

55 La composición pesticida desvelada en el presente documento también puede ser una composición bactericida para su uso para tratar, prevenir, mejorar, inhibir, eliminar o retrasar la aparición de infecciones o infestaciones bacterianas.

"Bactericida", como se usa en el presente documento, se refiere a un pesticida que es específicamente efectivo para tratar, prevenir, mejorar, inhibir, eliminar o retrasar la aparición de infecciones o infestaciones bacterianas y/o la germinación de esporas. Las composiciones desveladas en el presente documento pueden, por lo tanto, servir como bactericidas, como muestran los ejemplos 7 y 9. Las composiciones pueden ser especialmente eficaces como bactericidas para controlar *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Erwinia amylovora*, *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, *Streptomyces scabies*, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* y *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*.

Más específicamente, se entiende que la composición es efectiva para tratar, prevenir, mejorar, inhibir, reducir o eliminar una infección bacteriana establecida, y en el tratamiento y prevención de enfermedades causadas por ella.

Según otros ejemplos, las composiciones, así como los procedimientos descritos en el presente documento después, son particularmente eficaces en la prevención, inhibición o eliminación, ya sea parcial o totalmente, de la infección de plantas por bacterias, ejemplos no limitativos de los cuales incluyen: especies de *Xanthomonas*, tal como, por ejemplo, *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae*; especies de *Pseudomonas*, tal como, por ejemplo, *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*; especies de *Erwinia*, tal como, por ejemplo, *Erwinia amylovora*; *Clavibacter michiganensis*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Streptomyces sarna*.

En ejemplos más específicos, como también lo demuestran los Ejemplos 7, 8 y 9, la composición bactericida desvelada en el presente documento puede ser particularmente aplicable cuando las infecciones bacterianas son causadas por al menos uno de: *Clavibacter michiganensis*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Erwinia amylovora*, *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, *Streptomyces scabies*, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* y *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*.

La composición desvelada en el presente documento es específicamente efectiva para tratar y prevenir infecciones por *Clavibacter michiganensis* y afecciones patógenas causadas por ella. *Clavibacter michiganensis* es una bacteria patógena grampositiva aerobia no esporuladora que actualmente constituye la única especie dentro del género *Clavibacter*. *Clavibacter michiganensis* tiene actualmente cinco subespecies: *Clavibacter michiganensis* subsp. *insidiosus*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *nebraskensis*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* y *Clavibacter michiganensis* subsp. *tesselarius*. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* es el agente causante del cancro bacteriano del tomate.

La composición bactericida desvelada en el presente documento también es efectiva en casos de infecciones por *Agrobacterium tumefaciens*. *Agrobacterium tumefaciens* (nombre científico actualizado: *Rhizobium radiobacter*) es el agente causal de la enfermedad de la corona de agallas (la formación de tumores) en más de 140 especies de dicotiledóneas. Es una bacteria del suelo gramnegativa con forma de varilla. Los síntomas son causados por la inserción de un pequeño segmento de ADN (conocido como el ADN-T, para "transferir ADN") a la célula vegetal, que se incorpora en una ubicación semialeatoria en el genoma de la planta. *Agrobacterium tumefaciens* (o *A. tumefaciens*) es una alfaproteobacteria de la familia *Rhizobiaceae*, que incluye los simbioses leguminosos fijadores de nitrógeno. A diferencia de los simbioses fijadores de nitrógeno, los *Agrobacterium* productores de tumores son patogénicos y no benefician a la planta. La gran variedad de plantas afectadas por *Agrobacterium* hace que sea una gran preocupación para la industria agrícola. Económicamente, *A. tumefaciens* es un patógeno grave de las nueces, las vides, las frutas con hueso, los nogales, las remolachas azucareras, el rábano y el ruibarbo.

Aún más, la composición bactericida desvelada en el presente documento es efectiva en casos de infecciones por *Erwinia amylovora*. *Erwinia amylovora* es una bacteria gramnegativa de la familia *Enterobacteriaceae* y es responsable del tizón de fuego. El tizón de fuego es una enfermedad contagiosa que afecta a las manzanas, las peras y algunos otros miembros de la familia *Rosaceae*. Es una seria preocupación para los productores de manzanas y peras. en condiciones óptimas, puede destruir todo un huerto en una sola estación de crecimiento. Las peras son las más susceptibles, pero las manzanas, el níspero, las manzanas silvestres, el membrillo, el espino, cotoneaster, los espinos de fuego, la frambuesa y algunas otras plantas rosáceas también son vulnerables.

*Pseudomonas syringae* que se puede usar como alternativa es una bacteria gramnegativa con forma de varilla y con flagelos polares. Es un patógeno para plantas que puede infectar una amplia gama de especies de plantas, y existe en más de 50 variedades patogénicas diferentes. Muchas de estas variedades patogénicas se consideraron especies individuales dentro del género *Pseudomonas*, pero las técnicas de biología molecular, como la hibridación de ADN, han demostrado que, de hecho, todas forman parte de la especie *P. syringae*. *P. syringae* también produce proteínas lna que hacen que el agua se congele a temperaturas bastante altas, causando lesiones a las plantas.

La composición desvelada en el presente documento puede ser eficaz en el tratamiento de infecciones por *Streptomyces scabies* y afecciones patógenas causadas por la misma. *Streptomyces scabies* es una de las tres especies de estreptomices que causa síntomas comunes de sarna en las patatas y otros cultivos de tubérculos. *S. scabies* está presente en los suelos de todas las regiones productoras de patatas del mundo y también afecta a otros cultivos de tubérculos carnosos. Las patatas (*Solanum tuberosum*) son el principal huésped económico, pero otros cultivos de raíces carnosas, incluyendo remolachas, rábano, colinabo, nabo, zanahoria y chirivías, se ven afectadas.

La composición desvelada en el presente documento puede usarse para tratar infecciones por *Xanthomonas*

*campestris*. *Xanthomonas campestris* es una especie bacteriana que causa diversas enfermedades de las plantas. Es un bacilo aeróbico gramnegativo y el agente causal de la podredumbre negra, que afecta a crucíferas tales como *Brassica* y *Arabidopsis*. Los síntomas incluyen clorosis marginal de la hoja y oscurecimiento del tejido vascular, acompañado de extenso marchitamiento y necrosis. El amarilleamiento de toda la hoja, el marchitamiento y la necrosis se producen a medida que avanza la enfermedad.

Como se demuestra en los ejemplos 7, 15 y 16, el agente de control biológico de *P. aphidis* de la invención es eficaz para tratar y prevenir los síntomas de la enfermedad causados por patógenos fúngicos. Por tanto, la composición pesticida puede ser una composición fungicida para tratar, prevenir, mejorar, inhibir, eliminar o retrasar la aparición de infecciones o infestaciones por hongos.

El término "fungicida" se refiere a un pesticida que es específicamente efectivo para tratar, prevenir, mejorar, inhibir, eliminar o retrasar la aparición del crecimiento de hongos y/o la germinación de esporas y la formación y crecimiento de hifas. Las composiciones desveladas en el presente documento pueden, por lo tanto, servir como fungicidas, como lo demuestran los ejemplos 7 y 8. Las composiciones pueden ser especialmente efectivas como fungicidas para controlar *Botrytis cinerea*, *Penicillium digitatum*, *Alternaria brassicicola*, *Uromyces appendiculatus*, *Leveillula taurica*, *Sclerotinia sclerotiorum* y *Puccinia coronata*.

Se entiende que la composición también es efectiva para tratar, prevenir, mejorar, inhibir o eliminar una infección fúngica establecida, y en el tratamiento y prevención de enfermedades causadas por ella.

La composición desvelada en el presente documento y el procedimiento de acuerdo con la invención pueden ser particularmente adecuados para prevenir, inhibir o eliminar, ya sea parcial o totalmente, hongos y patógenos de plantas similares a los hongos, ejemplos no limitativos de los cuales incluyen: especies de *Armillaria*, tal como, por ejemplo, *Armillaria borealis*; especies de *Brachybasidiaceae*; especies de *Brasiliomyces*; tal como, por ejemplo, *Brasiliomyces malachrae*; especies de *Calonectria*, tal como, por ejemplo, *Calonectria ilicicola*; roya blanca del crisantemo; *Conidiosporomyces*; *Cryptobasidiaceae*; *Exobasidiaceae* especies de *Fusarium*, tal como, por ejemplo, *Fusarium oxysporum f.sp. carthami* especies de *Gibberella*, tal como, por ejemplo, *Gibberella tricineta*; especies de *Gliocladiopsis*, tal como, por ejemplo, *Gliocladiopsis tenuis*; *Graphiolaceae*; especies de *Gymnosporangium*, tal como, por ejemplo, *Gymnosporangium libocedri*; especies de *Nectria*, tal como, por ejemplo, *Nectria pseudotrichia*; *Pleuroceras*; especies de *Puccinia*, tal como, por ejemplo, *Puccinia malvacearum*; Especies de *Thecaphora*, tal como, por ejemplo, *Thecaphora solani*; *Venturia* (género) y *Westea*; especies similares hongos (Oomycota), tales como *Phytium*, *Phytophthora*, albugo y oídios (*Peronospora*, *Bremia*, *Peronosclerospora*, *Plasmopara* y *Pseudoperonospora*).

En algunos casos, las infecciones fúngicas están causadas por al menos uno de: *Botrytis cinerea*, *Penicillium digitatum*, *Alternaria brassicicola*, *Uromyces appendiculatus*, *Leveillula taurica*, *Sclerotinia sclerotiorum* y *Puccinia coronata*.

La composición desvelada en el presente documento es particularmente adecuada para tratar las infecciones por *Botrytis cinerea* y las afecciones patológicas causadas por ellas. *Botrytis cinerea* es un hongo necrotrófico que afecta a muchas especies de plantas, aunque sus huéspedes más notables pueden ser uvas. En viticultura, habitualmente se conoce como podredumbre noble; en horticultura, suele llamarse moho gris o podredumbre gris. El hongo da lugar a dos tipos diferentes de infecciones en las uvas. El primero, la podredumbre gris es el resultado de condiciones consistentemente húmedas o mojadas, y generalmente resulta en la pérdida de los racimos afectados. El segundo, la podredumbre noble, se produce cuando hay condiciones más secas después de más húmedas, y pueden dar como resultado vinos de postre claramente dulces, tal como los Sauternes o el Aszú de Tokaji. *Botrytis cinerea* afecta a muchas otras plantas. Es económicamente importante en frutas blandas, tales como fresas y bulbos. A diferencia de las uvas de vino, las fresas afectadas no son comestibles y se desechan. *Botrytis cinerea* es una causa bien conocida de daño considerable en el tomate y también afecta al ruibarbo.

La composición desvelada en el presente documento también es particularmente adecuada para tratar infecciones por *Penicillium* y estados patológicos causados por ellas. *Penicillium* son comparables a *Aspergillus*. El género *Penicillium* entra dentro del orden *Eurotiales*. En este orden, los organismos producen ascis dentro de los cleistotecios. *Penicillium* a menudo se conoce como *Deuteromycetes*, o *Fungi imperfecti*. El nombre *Penicillium* proviene de la palabra "pincel"; esto se refiere a la aparición de esporas en *Penicillium digitatum*. Los hongos *Penicillium* son versátiles y oportunistas. Son patógenos posterior a la recolección. Las especies de *Penicillium* son una de las causas más comunes de deterioro por hongos en frutas y verduras. *Penicillium italicum* y *Penicillium digitatum* son los agresores más comunes de los cítricos, mientras que se sabe que *Penicillium expansum* ataca a las manzanas. *P. digitatum* funciona produciendo etileno para acelerar la maduración. Cubre la fruta con conidios verdes, haciendo que la fruta se arrugue y se seque. *P. italicum* causa podredumbre viscosa y produce conidios azul verdosos. A estas especies les gustan las temperaturas más frías, lo que explica por qué generalmente se encuentran en alimentos que se dejan demasiado tiempo en el refrigerador. Muchas especies producen micotoxinas; por ejemplo, *P. expansum* produce una llamada patulina. La mayoría de estas especies se parecen entre sí en sus características de color, estilo de decaimiento y síntomas de infección; entran dentro de una categoría general llamada moho azul. *P. Expansum* es una de las especies más agresivas. Estos hongos viven mucho tiempo y son bastante duraderos, incluso en condiciones adversas. A veces, *P. italicum* y *P. expansum* se pegan unos a otros para crear sinematas. También se producen sinematas en *Penicillium claviforme*. El crecimiento de *Penicillium* típicamente ocurre como resultado de infecciones en heridas. El tratamiento más común es usar fungicida en los productos cosechados. Las especies de *Penicillium* atacan a algo

más que a las frutas. Por ejemplo, *Penicillium verrucosum* crece en productos de cereales.

La composición desvelada en el presente documento también es particularmente adecuada para tratar infecciones por *Alternaria* y estados patológicos provocados por ellas. El género *Alternaria* está compuesto por muchas especies saprofitas comunes (obtienen los nutrientes de materia orgánica muerta y/o en descomposición) y especies patógenas de plantas. Las esporas de *Alternaria* se pueden encontrar típicamente en el aire, suelo, el material vegetal en descomposición, la madera y los alimentos. *Alternaria brassicicola* es un hongo patógeno vegetal ubicuo, pero también existe como un saprófito. *Alternaria brassicicola* causa la enfermedad de la mancha negra (también llamada mancha foliar oscura) en prácticamente todas las especies importantes de Brassica cultivadas, incluyendo brécol, col, cánola y Mostaza. Es de importancia económica en todo el mundo y en ocasiones produce reducciones de rendimiento del 20-50 % en cultivos como la cánola, la mostaza o la colza.

La composición desvelada en el presente documento también es particularmente adecuada para tratar infecciones por *Uromyces appendiculatus* y afecciones patológicas causadas por ella. La enfermedad de la roya de la judía común está causada por el hongo basidiomiceto *Uromyces appendiculatus* (Pers.: Pers.) Unger. Es un hongo parásito obligado que no puede vivir independientemente de su huésped de judía común. Este hongo no puede ser cultivado en medios artificiales en el laboratorio. El patógeno de la roya completa su ciclo de vida completo en el huésped de judía común; por tanto, esta roya es autoecio. La enfermedad de la roya de la judía común tiene una distribución mundial y se presenta en la mayoría de las áreas de producción de judía seca y de judía rápida, y especialmente en lugares en los que hay condiciones húmedas a moderadamente húmedas, largos periodos de rocío y las condiciones frías prevalecen durante la temporada de cultivo de las judías.

La composición desvelada en el presente documento es además particularmente adecuada para tratar infecciones por *Leveillula taurica* y afecciones patológicas causadas por ella. El oídio del tomate está causado por el hongo *Leveillula taurica*. La enfermedad puede ser muy devastadora en los tomates cultivados comercialmente, donde las pérdidas de rendimiento pueden superar el 50 % en los campos muy infectados. El grado de pérdida depende de las condiciones ambientales, la fecha de inicio de la enfermedad y la efectividad del control de los fungicidas. Los días secos y calurosos con alguna tormenta ocasional son propicios para el desarrollo de la enfermedad.

La composición desvelada en el presente documento también es particularmente adecuada para tratar infecciones por *Sclerotinia sclerotiorum*. *Sclerotinia sclerotiorum* es un hongo patógeno para plantas y puede causar una enfermedad llamada moho blanco si las condiciones son adecuadas. *S. sclerotiorum* también se conoce como podredumbre algodonosa, podredumbre blanda acuosa, podredumbre del tallo, gotas, podredumbre de la copa y tizón de las flores. Una característica clave de este patógeno es su capacidad para producir estructuras negras en reposo conocidas como esclerocios y crecimientos difusos blancos de micelio en la planta que infecta. Estos esclerocios dan lugar a un cuerpo fructífero en la primavera que produce esporas en un saco, de ahí el término saco de hongos (ascomicetos). Este patógeno puede ocurrir en muchos continentes y tiene una amplia gama de plantas hospedadoras. Cuando *S. sclerotiorum* se inicia en el campo por condiciones ambientales favorables, las pérdidas pueden ser grandes. El moho blanco afecta a una amplia gama de hospedadores. Se sabe que infecta 408 especies de plantas. Su diverso rango de huéspedes y su capacidad para infectar plantas en cualquier etapa de crecimiento hace que el moho blanco sea una enfermedad muy grave. El hongo puede sobrevivir en tejidos infectados, en el suelo y en las plantas vivas. Afecta a las plántulas jóvenes, las plantas maduras y los frutos en el campo o en almacenaje. El moho blanco se puede propagar rápidamente en el campo de una planta a otra. También se puede propagar en una instalación de almacenamiento en todo el cultivo cosechado. Algunos cultivos que afecta habitualmente son soja, judías verdes, girasoles, cánola y cacahuetes.

Aún más, la composición desvelada en el presente documento está destinada para su uso en el tratamiento de infecciones por *Puccinia coronata*. *Puccinia coronata* es un patógeno y agente causal de la roya de la corona de avena y la roya de la corona de cebada. El patógeno se produce en todo el mundo infectando tanto a la avena silvestre como a la cultivada. Desde 1993, se han producido brotes de roya de corona en la cebada y en las gramíneas forrajeras en varias localidades de esta región. No se ha determinado el grado de pérdida de rendimiento en la cebada causada por esta enfermedad. La roya de la corona representaba una amenaza para la producción de cebada, porque las primeras infecciones en la cebada ocurren temprano en la temporada a partir del inóculo local.

Se observa que la composición fungicida de la invención puede inhibir al menos uno de germinación de esporas de hongos y formación de hifas.

"Germinación", en un sentido general, puede implicar que cualquier cosa se expanda hacia un ser mayor a partir de una pequeña existencia o germen. Como se cita en el presente documento, la "germinación" se refiere al procedimiento en el cual un hongo emerge de una espора y comienza a crecer. Un ejemplo de germinación es el crecimiento de un esporulado a partir de una espора. La germinación también puede referirse a la aparición de células desde esporas en reposo y al crecimiento de hifas de esporas o talos de esporas en hongos, algas y algunas plantas. Los conidios son esporas reproductoras asexuales de hongos que germinan en condiciones específicas.

Una hifa (hifas en plural) es una estructura filamentosa larga y ramificada de un hongo, y también de actinobacterias no relacionadas. En la mayoría de los hongos, las hifas son el modo principal de crecimiento vegetativo y se denominan colectivamente micelio; las levaduras son hongos unicelulares que no crecen como hifas. Una hifa consiste en una o

más células rodeadas por una pared celular tubular. En la mayoría de los hongos, las hifas se dividen en células mediante paredes transversales internas llamadas "septos" (septo en singular). Algunos hongos tienen hifas aseptadas, es decir, sus hifas no están divididas por septos. Las hifas crecen por sus puntas. Durante el crecimiento de la punta, las paredes celulares se extienden por el ensamblaje externo y la polimerización de los componentes de la pared celular y la producción interna de la nueva membrana celular. El spitzenkörper es un orgánulo intracelular asociado con el crecimiento de la punta. Está compuesto por una agregación de vesículas unidas a la membrana que contienen componentes de la pared celular. El spitzenkörper es parte del sistema endomembranoso de los hongos, que sostiene y libera las vesículas que recibe del aparato de Golgi. Estas vesículas viajan a la membrana celular a través del citoesqueleto y liberan su contenido fuera de la célula mediante el procedimiento de exocitosis, donde luego pueden ser transportadas a donde se necesitan. Las membranas vesiculares contribuyen al crecimiento de la membrana celular mientras que sus contenidos forman pared celular nueva. El spitzenkörper se mueve a lo largo del vértice de la hebra hifal y genera crecimiento apical y ramificación; la tasa de crecimiento apical de la hebra hifal es paralela y está regulada por el movimiento del spitzenkörper. A medida que la hifa se extiende, se pueden formar septos detrás de la punta de crecimiento para dividir cada hifa en celdas individuales. Las hifas pueden ramificarse a través de la bifurcación de una punta en crecimiento o por la aparición de una nueva punta de una hifa establecida.

Las expresiones "formación de hifas" y "crecimiento de hifas", como se usan en el presente documento, se refieren a los procedimientos de crecimiento de hifas a partir de esporas, también intercambiables con el término "germinación de esporas" y los procedimientos de extensión y/o bifurcación de las puntas de las hifas en crecimiento. Se entiende que el tratamiento de hongos o bacterias con la composición de la invención puede inhibir la formación y el crecimiento de hifas en al menos aproximadamente un 5 %-95 %, aproximadamente 10 %-90 %, aproximadamente 15 %-85 %, aproximadamente 20 %-80 %, aproximadamente 25 %-75 %, aproximadamente 30 %-70 %, aproximadamente 35 %-65 %, aproximadamente 40 %-60 % o aproximadamente 45 %-55 %. Dicha inhibición de la formación y crecimiento de las hifas también puede ser de al menos aproximadamente un 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 %, 20 %, 21 %, 22 %, 23 %, 24 %, 25 %, 26 %, 27 %, 28 %, 29 %, 30 %, 31 %, 32 %, 33 %, 34 %, 35 %, 36 %, 37 %, 38 %, 39 %, 40 %, 41 %, 42 %, 43 %, 44 %, 45 %, 46 %, 47 %, 48 %, 49 %, 50 %, 51 %, 52 %, 53 %, 54 %, 55 %, 56 %, 57 %, 58 %, 59 %, 60 %, 61 %, 62 %, 63 %, 64 %, 65 %, 66 %, 67 %, 68 %, 69 %, 70 %, 71 %, 72 %, 73 %, 74 %, 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o aproximadamente 100 %.

Más específicamente, el término "inhibir" o "inhibición", como se usa en el presente documento, significa la restricción, retraso, reducción, descenso o disminución de un procedimiento, un fenómeno o un fenotipo en al menos aproximadamente un 1 %-100 %, aproximadamente 5 %-95 %, aproximadamente 10 %-90 %, aproximadamente 15 %-85 %, aproximadamente 20 %-80 %, aproximadamente 25 %-75 %, aproximadamente 30 %-70 %, aproximadamente 35 %-65 %, aproximadamente 40 %-60 % o aproximadamente 45 %-55 %. Dicha restricción, retraso, reducción, descenso o disminución de un procedimiento, un fenómeno o un fenotipo también puede ser de al menos aproximadamente un 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 %, 20 %, 21 %, 22 %, 23 %, 24 %, 25 %, 26 %, 27 %, 28 %, 29 %, 30 %, 31 %, 32 %, 33 %, 34 %, 35 %, 36 %, 37 %, 38 %, 39 %, 40 %, 41 %, 42 %, 43 %, 44 %, 45 %, 46 %, 47 %, 48 %, 49 %, 50 %, 51 %, 52 %, 53 %, 54 %, 55 %, 56 %, 57 %, 58 %, 59 %, 60 %, 61 %, 62 %, 63 %, 64 %, 65 %, 66 %, 67 %, 68 %, 69 %, 70 %, 71 %, 72 %, 73 %, 74 %, 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o aproximadamente 100 %.

También se señala que la composición pesticida desvelada en el presente documento puede servir adicionalmente como una composición antiviral para tratar, prevenir, mejorar, inhibir, eliminar o retrasar la aparición de infecciones víricas. Ejemplos no limitativos de virus patógenos de plantas incluyen: *Rhabdovirus*, virus del enanismo de la alfalfa (AEV); *Alfavirus*, virus del mosaico de la alfalfa (AMV); *Luteovirus*, virus del enrollamiento de la hoja de judía (BLRV); *Potyvirus*, virus del mosaico amarillo de la judía (BYMV); *Cucumovirus*, virus del mosaico del pepino (CMV); *Nepovirus*, virus latente australiano de alfalfa (LALV); *Comoviridae*, virus no sintomático australiano de alfalfa (LASV); *Sobemovirus*, virus de la raya transitoria de la alfalfa (LTSV); *Carlavirus*, virus de la raya del guisante (PSV); *Carlavirus*, virus del mosaico de las venas del trébol rojo (RCVMV); *Ilarvirus*, virus de la raya del tabaco (TSV); virus del grabado del tabaco; *Potexvirus*, virus del mosaico del trébol blanco (WCMV); virus del mosaico Arabis; virus latente italiano de la alcachofa; fitoplasma; virus del mosaico de Bratislava; virus del marchitamiento del haba; virus B de la vid; virus del raquitismo de la vid; virus del mosaico de la roseta de durazno; virus del mosaico asteroide de la petunia; virus de la mancha anular de la frambuesa; virus del mosaico de Sowbane; virus de la mancha anular latente de la fresa; virus del mosaico del tabaco; virus de la necrosis del tabaco; virus de la mancha anular del tabaco; virus del anillo negro del tomate; y el virus de la mancha anular del tomate.

De acuerdo con ciertas realizaciones, la composición pesticida de la invención es para su uso para tratar, prevenir, inhibir, eliminar o retrasar la aparición de infecciones o infestaciones por hongos en seres humanos o ganado.

La composición pesticida de la invención puede ser útil para tratar, prevenir, mejorar, inhibir, eliminar o retrasar la aparición de una infección bacteriana en seres humanos o ganado causada por al menos uno de *Mycobacterium tuberculosis*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Pseudomonas*, *Shigella*, *Campylobacter*, *Burkholderia cenocepacia*, *Mycobacterium avium* y *Salmonella*.

La composición pesticida desvelada en el presente documento puede ser útil para tratar, prevenir, mejorar, inhibir, eliminar o retrasar la aparición de una infección por hongos en seres humanos o ganado causada por al menos uno de *Candida*, *Aspergillus*, *Phycomyces*, *Zygomycetes*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Absidia*, *Piedraia hortae*, *Trichosporon beigelii*, *Exophiala werneckii*, *Microsporum*, *Cladosporium*, *Fonsecaea*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Epidermophyton*, *Microsporum*, *Trichophyton*, *Malassezia furfur*, *Pityriasis versicolor*, *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis*, *Cryptococcus neoformans*, *Sporothrix schenckii*.

La composición pesticida desvelada en el presente documento puede ser útil para tratar, prevenir, mejorar, inhibir, eliminar o retrasar la aparición de una infección viral en seres humanos o ganado causada por al menos una de las familias de virus de: *Adenoviridae*, *Picornaviridae*, *Herpesviridae*, *Hepadnaviridae*, *Flaviviridae*, *Retroviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Paramyxoviridae*, *Papovaviridae*, *Polyomavirus*, *Rhabdoviridae*, *Togaviridae*.

En otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento para conferir resistencia en plantas contra infecciones o infestaciones de plagas. El procedimiento comprende la etapa de aplicar en una planta, a un material vegetal o en las proximidades de dicha planta o material vegetal, un agente de control biológico o una composición que lo comprenda, en la que el agente de control biológico comprende al menos uno de:

- a. células de *Pseudozyma aphidis* o cualquier aislado de las mismas;
- b. esporas de *Pseudozyma aphidis*;
- c. medio de cultivo condicionado de *Pseudozyma aphidis*;
- d. compuestos secretados de *Pseudozyma aphidis*;
- e. cualquier extracto o preparación de cualquiera de (a) a (d); y
- f. una combinación de al menos dos de los agentes de control biológico definidos en de (a) a (e). La composición comprende, opcionalmente, además vehículos, diluyentes y excipientes.

Las composiciones desveladas en el presente documento pueden conferir resistencia en plantas tratadas.

El término "resistencia" se refiere a la capacidad de las plantas para soportar infecciones o infestaciones bacterianas, fúngicas, víricas, por insectos u otras plagas, es decir, dichas plantas pueden demostrar mejores tasas de supervivencia durante y después de tales infecciones o infestaciones en comparación con plantas no tratadas, pueden mostrar síntomas menores en comparación con las plantas no tratadas o pueden no estar infectadas o infestadas en tasas tan altas como las plantas no tratadas.

Por ejemplo, una planta tratada con la composición desvelada en el presente documento puede ser resistente a infecciones o infestaciones de plagas y la tasa de infección o infestación sería de aproximadamente 1 %-100 %, aproximadamente 5 %-95 %, aproximadamente 10 %-90 %, aproximadamente 15 %-85 %, aproximadamente 20 %-80 %, aproximadamente 25 %-75 %, aproximadamente 30 %-70 %, aproximadamente 35 %-65 %, aproximadamente 40 %-60 % o aproximadamente 45 %-55 % más bajo que las plantas no tratadas, o al menos aproximadamente 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 %, 20 %, 21 %, 22 %, 23 %, 24 %, 25 %, 26 %, 27 %, 28 %, 29 %, 30 %, 31 %, 32 %, 33 %, 34 %, 35 %, 36 %, 37 %, 38 %, 39 %, 40 %, 41 %, 42 %, 43 %, 44 %, 45 %, 46 %, 47 %, 48 %, 49 %, 50 %, 51 %, 52 %, 53 %, 54 %, 55 %, 56 %, 57 %, 58 %, 59 %, 60 %, 61 %, 62 %, 63 %, 64 %, 65 %, 66 %, 67 %, 68 %, 69 %, 70 %, 71 %, 72 %, 73 %, 74 %, 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o aproximadamente 100 % más bajo que las plantas no tratadas.

La tasa de supervivencia de las plantas tratadas puede ser de aproximadamente 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 %, 20 %, 21 %, 22 %, 23 %, 24 %, 25 %, 26 %, 27 %, 28 %, 29 %, 30 %, 31 %, 32 %, 33 %, 34 %, 35 %, 36 %, 37 %, 38 %, 39 %, 40 %, 41 %, 42 %, 43 %, 44 %, 45 %, 46 %, 47 %, 48 %, 49 %, 50 %, 51 %, 52 %, 53 %, 54 %, 55 %, 56 %, 57 %, 58 %, 59 %, 60 %, 61 %, 62 %, 63 %, 64 %, 65 %, 66 %, 67 %, 68 %, 69 %, 70 %, 71 %, 72 %, 73 %, 74 %, 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o aproximadamente 100 % más alta que las plantas no tratadas.

Los síntomas patológicos causados por dichas infecciones o infestaciones pueden inhibirse o reducirse en aproximadamente un 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 %, 20 %, 21 %, 22 %, 23 %, 24 %, 25 %, 26 %, 27 %, 28 %, 29 %, 30 %, 31 %, 32 %, 33 %, 34 %, 35 %, 36 %, 37 %, 38 %, 39 %, 40 %, 41 %, 42 %, 43 %, 44 %, 45 %, 46 %, 47 %, 48 %, 49 %, 50 %, 51 %, 52 %, 53 %, 54 %, 55 %, 56 %, 57 %, 58 %, 59 %, 60 %, 61 %, 62 %, 63 %, 64 %, 65 %, 66 %, 67 %, 68 %, 69 %, 70 %, 71 %, 72 %, 73 %, 74 %, 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o aproximadamente 100 % en comparación con las plantas no tratadas.

Adicionalmente, conferir resistencia a las plantas tratadas también puede deberse a la inducción de genes relacionados con el sistema inmunitario que promueven la respuesta inmune de la planta y, por lo tanto, la resistencia a patógenos. Tales genes pueden incluir, por ejemplo, y genes relacionados con la defensina y/o la patogénia, o cualquier otro gen relacionado con la inmunidad. Más específicamente, al menos una de la expresión de PR1 y PDF1.2 se puede inducir en aproximadamente 1 %-100 %, aproximadamente 5 %-95 %, aproximadamente 10 %-90 %,

aproximadamente 15 %-85 %, aproximadamente 20 %-80 %, aproximadamente 25 %-75 %, aproximadamente 30 %-70 %, aproximadamente 35 %-65 %, aproximadamente 40 %-60 % o aproximadamente 45 %-55 % en comparación con las plantas no tratadas, o al menos de aproximadamente 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 %, 20 %, 21 %, 22 %, 23 %, 24 %, 25 %, 26 %, 27 %, 28 %, 29 %, 30 %, 31 %, 32 %, 33 %, 34 %, 35 %, 36 %, 37 %, 38 %, 39 %, 40 %, 41 %, 42 %, 43 %, 44 %, 45 %, 46 %, 47 %, 48 %, 49 %, 50 %, 51 %, 52 %, 53 %, 54 %, 55 %, 56 %, 57 %, 58 %, 59 %, 60 %, 61 %, 62 %, 63 %, 64 %, 65 %, 66 %, 67 %, 68 %, 69 %, 70 %, 71 %, 72 %, 73 %, 74 %, 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 100 %, 200 %, 300 %, 400 %, 500 %, 600 %, 700 %, 800 %, 900 % o aproximadamente el 1000 % en comparación con las plantas no tratadas.

Con respecto a una planta susceptible a enfermedades o plagas, la resistencia de las plantas a enfermedades o plagas se define a menudo como la reducción del crecimiento de patógenos en o en la planta. Por tanto, una planta resistente se verá afectada de manera menos adversa por dicho patógeno o incluso será inmune a sus efectos perjudiciales, en comparación con una planta susceptible. Esto se puede lograr, por ejemplo, mediante inducción de los genes inmunes de la planta.

De hecho, en una realización, el procedimiento de la invención regula por aumento o induce la expresión de genes relacionados con el sistema inmunológico de la planta. En realizaciones más específicas, dichos genes relacionados con el sistema inmunitario de la planta codifican al menos una de la familia de proteínas relacionadas con la patogenicidad y la familia de las defensinas.

En general, cuando se utiliza, la expresión "induce la expresión" o "inducción de la expresión" de genes se refiere a la inducción de un aumento de al menos uno de: la tasa de transcripción, la tasa de traducción, la estabilidad de proteínas y/o ARNm, la cantidad de producto genético y la maduración de proteínas y/o ARNm. Más específicamente, al inducir la expresión de dicho gen o genes, el aumento de al menos uno de: la tasa de transcripción, la tasa de traducción, la estabilidad de proteínas y/o ARNm, la cantidad de producto genético y la maduración de proteínas y/o ARNm aumenta en al menos aproximadamente un 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 %, 20 %, 21 %, 22 %, 23 %, 24 %, 25 %, 26 %, 27 %, 28 %, 29 %, 30 %, 31 %, 32 %, 33 %, 34 %, 35 %, 36 %, 37 %, 38 %, 39 %, 40 %, 41 %, 42 %, 43 %, 44 %, 45 %, 46 %, 47 %, 48 %, 49 %, 50 %, 51 %, 52 %, 53 %, 54 %, 55 %, 56 %, 57 %, 58 %, 59 %, 60 %, 61 %, 62 %, 63 %, 64 %, 65 %, 66 %, 67 %, 68 %, 69 %, 70 %, 71 %, 72 %, 73 %, 74 %, 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 100 %, 200 %, 300 %, 400 %, 500 %, 600 %, 700 %, 800 %, 900 % o aproximadamente 1000 % en comparación con las tasas correspondientes en los organismos no tratados (no inducidos) de control.

El miembro de la familia de proteínas relacionadas con la patogenicidad puede ser PR1 y el miembro de la familia de las defensinas puede ser PDF1.2.

PDF1.2 también se conoce como LCR77; de bajo peso molecular rico en cisteína 77; MFC16.8; MFC16\_8; PDF1.2; PDF1.2A; defensina vegetal 1.2 y defensina vegetal 1.2A. PDF1.2 codifica una defensina vegetal que responde a etileno y jasmonato, y pertenece a la familia de defensinas vegetales (PDF) con los siguientes miembros: At1 g75830/PDF1.1, At5 g44420/PDF1.2a, At2 g26020/PDF1.2b, At5 g44430/PDF1.2c, At2 g26010/PDF1.3, At1 g19610/PDF1.4, At1 g55010/PDF1.5, At2 g02120/PDF2.1, At2 g02100/PDF2.2, At2 g02130/PDF2.3, At1 g61070/PDF2.4, At5 g63660/PDF2.5, At2 g02140/PDF2.6, At5 g38330/PDF3.1 y At4 g30070/PDF3.2.

La composición desvelada en el presente documento puede inducir la expresión de PR1 en dicha planta.

PR1 (gen 1 relacionado con la patogenicidad), también se conoce como AtPR1; gen 1 relacionado con la patogenicidad; proteína 1 relacionada con la patogenicidad; PR 1; PR1; T6B13.15 y T6B13\_15. La expresión del gen PR1 se induce en respuesta a patógenos adversos. Es un marcador molecular útil de la respuesta SAR. La expresión de este gen es respondedor a ácido salicílico (SAR).

Las "proteínas relacionadas con la patogenicidad" (PR) se han definido como "proteínas codificadas por la planta huésped pero inducidas solo en situaciones patológicas o relacionadas". Para incluir entre las PR, una proteína debe expresarse nuevamente en el momento de la infección, pero no necesariamente en todas las condiciones patológicas. Las situaciones patológicas se refieren a todos los tipos de estados infectados, no solo a respuestas hipersensibles resistentes en las que las PR son más comunes; también incluyen ataque parasitario por nematodos, insectos y herbívoros. La inducción solo por condiciones de estrés abiótico no es un criterio suficiente para la inclusión como PR. Los miembros del grupo de R incluyen, por ejemplo: PR 1a, PR 1b, PR 1c, PR 2a, PR 2b, PR 3, PR 4, PR 5a, PR 5b, 16kD, Gluc.b, Ch.32, Ch.34 y Osmotina.

La composición desvelada en el presente documento puede inducir la expresión de PDF1.2 en dicha planta.

La composición desvelada en el presente documento puede inducir la expresión de PR1 y PDF1.2 en dicha planta, opcionalmente, dicha composición induce la expresión de al menos un gen adicional relacionado con el sistema inmunitario.

Dichos genes incluyen, por ejemplo, los genes de *Arabidopsis* AtBGL2, AtVSP1, AtThi2.1, AtLox, y sus equivalentes en otras especies de plantas. Aún más, estos genes pueden ser los genes de tomate del inhibidor 1 de proteínas (Pin1) y Pin2.

- 5 La composición desvelada en el presente documento puede mejorar, aumentar o inducir la expresión de genes relacionados con el sistema inmunológico, incrementando así la resistencia de las plantas a las plagas, incluyendo al menos uno de infecciones o infestaciones por hongos, virus, bacterias, nematodos e insectos.

10 Las composiciones pesticidas para su uso y procedimientos de la invención pueden ser aplicables para conferir resistencia contra y/o tratar estados patológicos causados por nematodos. Los ejemplos no limitantes de nematodos patógenos de plantas incluyen: *Ditylenchus dipsaci*, *Aphelenchoides ritzemabosi*, *Heterodera* spp., *Heterodera trifolii*, *Heterodera schachtii*, *Xiphinema americanum*, *Pratylenchus* spp., *Pratylenchus vulnus*, *Pratylenchus neglectus*, *Pratylenchus penetrans*, *Longidorus* spp., *Paratylenchus* spp., *Paratylenchus hamatus*, *Rotylenchulus* spp., *Meloidogyne* spp., *Meloidogyne arenaria*, *Meloidogyne chitwoodi*, *Meloidogyne hapla*, *Meloidogyne incognita*, *Meloidogyne javanica*, *Helicotylenchus* spp., *Paratrichodorus* spp., *Tylenchorhynchus* spp., *Belonolaimus longicaudatus*, *Tylenchulus semipenetrans*, *Criconemella xenoplax*, *Helicotylenchus* spp. y *Tylenchorhynchus* spp.

15 Las composiciones pesticidas para su uso y procedimientos de la invención pueden ser aplicables para conferir resistencia contra y/o tratar estados patológicos causados por insectos. Los ejemplos no limitativos de insectos de plagas de plantas que son depredadores de dicha planta incluyen: *Acalymma*, *Acleris variegana*, *cogollero del maíz africano*, *abeja africanizada*, *Agromyzidae*, *Agrotis munda*, *Agrotis porphyricollis*, *Aleurocanthus woglumi*, *Aleyrodes proletella*, *Anasa tristis*, *Anisoplia austriaca*, *Anthonomus pomorum*, *Anthonomus signatus*, *Aonidiella aurantii*, *Aphid*, *Aphis fabae*, *Aphis gossypii*, *gusano de la manzana*, *hormiga argentina*, *gusano cortador*, *Arotrophora arcuatalis*, *Asterolecanium coffeae*, *langosta de la plaga australiana*, *Bactericera cockerelli*, *Bactrocera*, *Bactrocera correcta*, *Bagrada hilaris*, *barrenador en bandas del nogal*, *polilla aburrida de Banksia*, *gusano soldado de la remolacha*, *polilla de Bogong*, *gorgojo del algodón*, *Brevicoryne brassicae*, *langosta marrón*, *chinche apestoso marrón marmolado*, *partera marrón*, *polilla de la col*, *gusano de la col*, *Callosobruchus maculatus*, *escarabajo de la caña*, *mosca de la zanahoria*, *Cecidomyiidae*, *Ceratitidis capitata*, *escarabajo de la hoja del cereal*, *Chlorops pumilionis*, *escarabajo de antenas largas de los cítricos*, *Coccus viridis*, *polilla del manzano*, *escarabajo barrenador del café*, *escarabajo de la patata de Colorado*, *escarabajo confuso de la harina*, *Crambus*, *escarabajo del pepino*, *Curculio nucum*, *oruga cortadora*, *gusano cortador negro*, *escarabajo de piedra*, *Delia* (género), *Delia antiqua*, *Delia floralis*, *Delia radicum*, *langosta del desierto*, *Diabrotica*, *polilla dorso de diamante*, *Diaphania indica*, *Diaphania nitidalis*, *Diaphorina citri*, *Diaprepes abbreviatus*, *saltamontes diferencial*, *Doclostaurus maroccanus*, *Drosophila suzukii*, *Erionota Thrax*, *Eriosomatinae*, *Eumetopina flavipes*, *barrenador de maíz europeo*, *Eurydema oleracea*, *Eurygaster Integriceps*, *insecto del bosque*, *Frankliniella occidentalis*, *Frankliniella Tritici*, *Galleria mellonella*, *Euxoa nigricans*, *mosca blanca de invernadero*, *Gryllotalpa orientalis*, *Gryllus pennsylvanicus*, *polillas gitanas americana*, *Helicoverpa armigera*, *Helicoverpa zea*, *Henosepilachna vigintioctopunctata*, *mosca del trigo*, *escarabajo japonés*, *escarabajo Khapra*, *Lampides boeticus*, *mariposa de la col*, *minador foliar*, *Lepidiota consobrina*, *Lepidosaphes ulmi*, *Leptoglossus zonatus*, *Leptopterna dolabrata*, *polilla cera menor*, *Leucoptera* (polilla), *Leucoptera coffeina*, *palomilla marrón claro e la manzana*, *controveria de la palomilla marrón claro de la manzana*, *Lissorhoptrus oryzophilus*, *saltador de cola larga*, *Lygus*, *Maconellicoccus hirsutus*, *Macroductylus subspinosus*, *Macrosiphum euphorbiae*, *gorgojo del maíz*, *Manduca sexta*, *Mayetiola hordei*, *Cochinillas*, *polilla*, *palomilla del puerro*, *Myzus persicae*, *Nezara viridula*, *mosca de la fruta del olivo*, *Opomyzidae*, *Papilio Demodocus*, *Paracoccus marginatus*, *Paratachardina pseudolobata*, *pulgón del guisante*, *Pentatomoidea*, *Phthorimaea operculella*, *Phyllophaga* (género), *filoxera*, *Phylloxeroidea*, *gusano rosa del algodón*, *Platynota idaeusalis*, *Plum curculio*, *Pseudococcus viburni*, *Pyralis farinalis*, *hormiga roja de fuego importada*, *langosta roja*, *Rhagoletis cerasi*, *Rhagoletis indifferens*, *Rhagoletis mendax*, *Rhynchophorus ferrugineus*, *Rhyzopertha dominica*, *polilla del arroz*, *pulgón del trigo ruso*, *piojo de San José*, *insecto escama*, *Sciaridae*, *Scirtothrips dorsalis*, *Scutelleridae*, *minero de hoja serpentina*, *mosca blanca de hoja plateada*, *escarabajo pequeño de la colmena*, *pulgón de la soja*, *Spodoptera cillium*, *Spodoptera litura*, *Escarabajo del pepino manchado*, *barrenador de la vid de calabaza*, *Stenotus binotatus*, *Sternorrhyncha*, *Strauzia longipennis*, *escarabajo pulga rayado*, *plaga de Sunn*, *insecto de la batata*, *chinche de la planta deslustrada*, *arañuelas*, *Thrips palmi*, *Toxoptera citricida*, *Trioza erytraeae*, *Tuta absoluta*, *escarabajo de alfombra variada*, *Virachola isocrates*, *gusano de cera*, *gusano de la raíz del maíz del oeste*, *gorgojo del trigo*, *polilla de invierno* y *Xyleborus glabratus*.

La composición desvelada en el presente documento puede ser eficaz para prevenir, mejorar, inhibir, eliminar o retrasar la aparición de infecciones o infestaciones por plagas, germinación de esporas y crecimiento de hifas en productos agrícolas e industriales. Por lo tanto, la composición es eficiente para prolongar la vida útil o el tiempo de almacenamiento de dicho producto.

- 55 Cabe señalar que los productos agrícolas e industriales incluyen cualquiera de una planta, material vegetal, incluyendo raíces, bulbos, tubérculos, cormos, hojas, flores, semillas, tallos, tejido del callo, nueces, cereales, fruta (por ejemplo, uvas), esquejes, portainjerto, vástagos, cultivos cosechados, incluyendo raíces, bulbos, tubérculos, cormos, hojas, flores, semillas, tallos, tejido del callo, nueces, cereales, frutas, esquejes, portainjertos o vástagos.

- 60 Adicionalmente, se aprecia así que la composición pesticida puede ser efectiva para prevenir, mejorar, inhibir, eliminar o retrasar la aparición de infecciones o infestaciones por plagas, germinación de esporas y crecimiento de hifas en productos agrícolas e industriales que no son material vegetal, tales como carne y productos lácteos y cualquier

material industrial susceptible a dichas plagas.

El término "vida útil" se define como la cantidad de tiempo que un producto permanece aceptable para los fines organolépticos, nutricionales y/o de seguridad, para el consumidor o el minorista. La composición de la invención es particularmente útil para extender la vida útil del producto, como se demuestra en el Ejemplo 10, que muestra una disminución del 50 % en la descomposición de las uvas tratadas con dicha composición en comparación con las uvas de control después de 2,5 meses a 0 °C y tres días a 20 °C. La vida útil de los productos industriales y agrícolas tratados con la composición de la invención puede prolongarse al menos 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, 8 días, 9 días, 10 días, 15 días, 20 días, 25 días, 30 días, dos meses, tres meses, cuatro meses, cinco meses, seis meses, un año, dos años, cinco años, diez años o incluso más.

10 En la protección de materiales, la composición desvelada en el presente documento puede emplearse para proteger materiales industriales contra la infección y la destrucción por, microorganismos indeseados.

15 Se entiende que los materiales industriales son materiales no vivos que han sido preparados para su uso en la industria. Por ejemplo, los materiales industriales que están destinados a ser protegidos por la composición según la invención frente a cambios o destrucción producidos por microbios, hongos, virus o insectos pueden ser adhesivos, colas, papel y cartón, materiales textiles, cuero, madera, pinturas y artículos de plástico, lubricantes refrigerantes, y otros materiales que se pueden infectar o destruir por acción de tales plagas. Las partes de plantas de producción, por ejemplo, circuitos de agua-refrigeración, que pueden verse perjudicadas por la proliferación de microorganismos, también pueden mencionarse dentro del alcance de los materiales a proteger.

20 Hay que apreciar que, en ciertos casos, la composición desvelada en el presente documento puede comprender además un vehículo agrícola aceptable. La expresión "vehículo agrícola aceptable" pretende incluir cualquier material que facilite la aplicación de una composición de la invención al sujeto deseado, que puede ser, por ejemplo, una planta, material o equipo vegetal, o que facilite el almacenamiento, transporte o manipulación. Los vehículos usados en las composiciones para su aplicación a plantas y material vegetal son, preferentemente, no fitotóxicos o solo levemente fitotóxicos. Un vehículo adecuado puede ser un sólido, líquido o gas según la formulación deseada. En una realización, los vehículos preferentes incluyen vehículos líquidos polares, tales como agua, aceites minerales y aceites vegetales.

25 Como se usa en el presente documento, el término "sujeto" pretende incluir cualquier superficie objetivo a la que se pueda aplicar un compuesto o composición de la invención, por ejemplo a una planta, material vegetal, incluyendo raíces, bulbos, tubérculos, cormos, hojas, flores, semillas, tallos, tejido del callo, nueces, cereales, frutas, esquejes, portainjerto, vástagos, cultivos cosechados, incluyendo raíces, bulbos, tubérculos, cormos, hojas, flores, semillas, tallos, tejido del callo, nueces, cereales, frutas, esquejes, portainjerto, vástagos o cualquier superficie que pueda entrar en contacto con los cultivos cosechados, incluidos los equipos de cosecha, equipos de embalaje y material de embalaje.

35 Las composiciones utilizadas como tales para fines agrícolas e industriales, así como las composiciones para promover el crecimiento en plantas como se describe a continuación se formulan comúnmente en consecuencia. Las composiciones antimicrobianas, antifúngicas, pesticidas y promotoras del crecimiento de plantas de acuerdo con la invención pueden formarse usando los principios activos como se describe en el presente documento en un vehículo inerte. Si está formulado como un sólido, los ingredientes pueden mezclarse con vehículos típicos como tierra de Fuller, arcillas de caolín, sílices u otros diluyentes inorgánicos humectables. Las formulaciones de polvos que fluyen libremente también pueden utilizarse combinando los principios activos secos con sólidos finamente divididos, tales como talco, tierra de diatomeas, pirofilita, arcillas, tierra de diatomeas y similares.

40 Los polvos también se pueden aplicar como una suspensión o solución, dependiendo de la solubilidad en el vehículo líquido. Se pueden usar pulverizadores presurizados, típicamente aerosoles, con el principio activo dispersado en un vehículo disolvente dispersante de bajo punto de ebullición. Los porcentajes de peso pueden variar según la manera en que se aplique la composición y la formulación utilizada. En general, el principio activo comprenderá del 0,005 % al 95 % del principio activo en peso en la composición antimicrobiana. La composición de control biológico se puede aplicar con otros ingredientes, incluidos reguladores del crecimiento, insecticidas, herbicidas, abonos y similares. La formulación de los principios activos para ayudar a la aplicabilidad, facilitar la manipulación, mantener la estabilidad química y aumentar la eficacia puede requerir la adición de varios materiales. Los disolventes se pueden elegir sobre la base de afectar a la solubilidad del principio activo, riesgo de incendio y punto de inflamación, emulsificabilidad, densidad específica y consideraciones económicas.

45 Adicionalmente, se puede añadir cualquier adyuvante para mejorar los principios activos y puede incluir tensioactivos que son aniónicos, catiónico o no iónico. Los estabilizantes y los compuestos anticongelantes prolongarán el almacenamiento. Adicionalmente, se pueden añadir compuestos sinérgicos, adhesivos, esparcidores y desodorantes para mejorar las características de manipulación de la formulación comercial.

55 La composición pesticida desvelada en el presente documento puede emplearse también como agentes antimicrobianos útiles para inhibir el crecimiento de microorganismos presentes o erradicar microorganismos en una superficie o en un medio fuera de un huésped vivo. Las composiciones de la invención se pueden emplear, por

ejemplo, como desinfectantes para diversos medios sólidos y líquidos susceptibles de crecimiento microbiano. Las cantidades adecuadas de la composición de la invención se pueden determinar por procedimientos conocidos por los expertos en la técnica.

5 Las composiciones pueden prepararse de cualquier manera conocida, por ejemplo, suplementando el principio activo con vehículos, auxiliares o diluyentes agrícolamente aceptables, tales como disolventes, emulsionantes y dispersantes o tensioactivos.

10 Los disolventes adecuados para su uso en la invención y sus diversos productos incluyen, pero sin limitación, aromáticos, por ejemplo, xileno; aromáticos clorados, por ejemplo, clorobenzenos; parafinas, por ejemplo, fracciones de aceite mineral; alcoholes, por ejemplo, metanol y butanol; cetonas, por ejemplo, ciclohexanona; aminas, por ejemplo, etanolamina y dimetilformamida; y agua, preferentemente desionizada. Cuando se usa agua, también se pueden usar otros disolventes orgánicos como codisolventes.

Los vehículos adecuados para su uso en las composiciones de la invención y sus productos incluyen, pero sin limitación, minerales naturales o sintéticos molidos, por ejemplo, caolines, arcillas, talco, tiza, sílice, silicatos y similares.

15 Los emulsionantes adecuados para su uso en las composiciones de la invención incluyen, pero sin limitación, emulsionantes no iónicos y aniónicos, por ejemplo, éteres de alcohol graso de polioxietileno, alquilsulfonatos, arilsulfonatos y similares.

Los dispersantes adecuados para su uso en las composiciones de la invención incluyen, pero sin limitación, licores de lignosulfito y metilcelulosa; y similares.

20 Los tensioactivos adecuados incluyen, pero sin limitación, lignofenol- ácido naftaleno y ácido dibutilnaftalenosulfónico, ácidos grasos, alquil y alquilarilsulfonatos, alquil lauril éter y sulfatos de alcoholes grasos, sales de hexa-, hepta y octadecanoles sulfatados y de glicoléteres de alcohol graso, condensados de naftaleno sulfonatado y sus derivados con formaldehído, condensados de naftaleno o de los ácidos naftalenosulfónicos, con fenol y formaldehído, polioxietileno octilfenol éter, isooctilo etoxilado, octil- o nonilfenol, éter esde alquil fenol y poliglicol, poliglicoléter de tributilfenilo, alcoholes de alquilaril poliéter, alcohol isotridecílico, condensados de alcohol graso/óxido de etileno, aceite de ricino etoxilado, éteres de alquil polioxietileno o éteres de polioxipropileno, acetato de poliglicoléter de alcohol laurílico, ésteres de sorbitol, licores de residuos de lignosulfito o metilcelulosa.

30 A los efectos de la aplicación, las composiciones desveladas en el presente documento en forma de suspensión pueden usarse directamente o formularse como composiciones adecuadas para pulverización, atomizando, empolvado, extendiendo o vertiendo. Por ejemplo, las composiciones se pueden formular como soluciones listas para rociar, polvos, suspensiones, altamente concentradas acuosas, grasas u otras suspensiones o dispersiones, emulsiones, dispersiones oleosas, pastas, polvos o gránulos.

Las composiciones acuosas no tóxicas también pueden contener diversos aditivos tales como antioxidantes, conservantes, neutralizadores de pH y/o clarificadores.

35 En uso, las composiciones acuosas no tóxicas se diluyen y se pulverizan o rocían sobre el huésped infestado. En algunos casos, se pueden requerir aplicaciones repetidas.

40 Para mejorar la eficiencia de la aplicación, las composiciones pesticidas, específicamente fungicidas/bactericidas/antiviricas y promotoras del crecimiento de plantas de la invención también pueden comprender otros principios activos, tales como herbicidas, insecticidas, estimuladores del crecimiento, abonos y similares.

Adicionalmente, la forma líquida de las composiciones puede colocarse o incluirse en una toallita, estando dicha toallita hecha preferentemente de papel o paño, o se proporciona como un reactivo de limpieza para su uso en el saneamiento.

Las composiciones desveladas en el presente documento también son adecuadas para aumentar el rendimiento de los cultivos. Además, tiene una toxicidad reducida y es bien tolerado por las plantas.

45 El hecho de que la composición sea bien tolerada por las plantas a las concentraciones requeridas para controlar las enfermedades de las plantas, como se muestra en el Ejemplo 6, permite el tratamiento de partes de plantas por encima del suelo, de reservas de propagación y de las semillas, y del suelo.

La evaluación de una composición o una composición que incluye o se libera con un agente agrícola adicional, tal como un fungicida adicional, puede incluir la evaluación de:

- 50
- (1) Grado de control de los microbios objetivo sin estimular el crecimiento de microbios no objetivo indeseables o perjudicar a los organismos beneficiosos.
  - (2) Durabilidad del control.
  - (3) Grado de fitotoxicidad y efectos sobre el desarrollo de la planta cuando se usa repetidamente para una porción o la totalidad de una temporada de cultivo.

(4) Compatibilidad con otros productos de control utilizados en la industria.

La composición desvelada en el presente documento puede ser ligeramente fitotóxica y, preferentemente, la composición no es fitotóxica.

Como se usa en el presente documento, la expresión "levemente fitotóxico" significa que el nivel de fitotoxicidad no afecta sustancialmente al rendimiento o la calidad de la planta y, preferentemente, significa que una composición de la invención puede causar pequeñas manchas (5-15 mm<sup>2</sup>) en las hojas de la planta, y puede producir parches necróticos o cloróticos (> 15 mm<sup>2</sup>) y distorsión de la hoja, pero preferentemente no debe matar más del 30 %, preferentemente no más del 20 % de una hoja en una planta a la que se aplica una composición de la invención. La expresión "rendimiento de la planta" pretende referirse al rendimiento del producto de una planta o población de plantas. El rendimiento puede ser el rendimiento de un producto que incluye, entre otros, una o más plantas completas o partes de plantas, tales como raíces, bulbos, cormos, tubérculos, hojas, esquejes, flores, tallos, frutas y semillas u otro material propagativo.

En el tercer aspecto, la invención proporciona un procedimiento para promover el crecimiento en plantas. El procedimiento comprende la etapa de aplicar en una planta, a un material vegetal o en las proximidades de dicha planta o material vegetal, un agente de control biológico o una composición que lo comprenda, en el que el agente de control biológico comprende al menos uno de:

- a. células de *Pseudozyma aphidis* o cualquier aislado de las mismas;
- b. esporas de *Pseudozyma aphidis*;
- c. medio de cultivo condicionado de *Pseudozyma aphidis*;
- d. compuestos secretados de *Pseudozyma aphidis*;
- e. cualquier extracto o preparación de cualquiera de (a) a (d); y
- f. una combinación de al menos dos de los agentes de control biológico definidos en de (a) a (e); dicha composición comprende, opcionalmente, además vehículos diluyentes y excipientes.

La expresión "promover el crecimiento" se refiere al hecho de que la masa de al menos una parte de la planta es significativamente mayor en una planta tratada con la composición en comparación con una planta de control sin tratar después de un tiempo suficiente en el tratamiento.

Más específicamente, la composición puede inducir un aumento en al menos uno de: el peso de la planta, la altura de planta, el número de hojas de la planta, sistema radicular, espesor de la planta y biomasa de la planta.

Se aprecia que la composición puede promover el crecimiento de la planta en varias partes de la planta. La expresión "partes de la planta" como se menciona en el presente documento se refiere a uno de los discos foliares, raíces, tallos, brotes, hojas, polen, semillas, embriones, cotiledones, hipocótilos, megagametofitos, tejido del callo, tejido meristemático y diversas formas de células y cultivos tales como células individuales, protoplasto, embriones y tejido calloso. El tejido de la planta puede estar en las plantas o en el cultivo de órgano, cultivos tisulares o celulares.

La parte con masa aumentada puede ser una parte que contribuye al rendimiento comercial de la planta (frutas, cereales, raíces, flores y hojas).

Debe apreciarse que la composición de la invención puede aumentar el espesor, la biomasa y la rigidez de las plantas leñosas y, por lo tanto, pueden ser aplicables en la industria del papel.

Específicamente, la composición que mejora el crecimiento de la planta puede aumentar la altura de la planta entre aproximadamente 1 % y aproximadamente 99,9 %, más específicamente, al menos aproximadamente el 1 %, aproximadamente 3 %, aproximadamente 5 %, aproximadamente 7 %, aproximadamente 9 %, aproximadamente 11 %, aproximadamente 13 %, aproximadamente 15 %, aproximadamente 17 %, aproximadamente 19 %, aproximadamente 20 %, aproximadamente 21 %, aproximadamente 23 %, aproximadamente 25 %, aproximadamente 27 %, aproximadamente 29 %, aproximadamente 30 %, aproximadamente 31 %, aproximadamente 33 %, aproximadamente 35 %, aproximadamente 37 %, aproximadamente 39 %, aproximadamente 41 %, aproximadamente 43 %, aproximadamente 45 %, aproximadamente 47 %, aproximadamente 49 %, aproximadamente 51 %, aproximadamente 53 %, aproximadamente 55 %, aproximadamente 57 % o aproximadamente 60 %. Más específicamente, los tratamientos pueden aumentar la altura de la planta en al menos aproximadamente un 15 % a aproximadamente un 25 %.

Adicionalmente, la composición puede aumentar el peso de la planta entre aproximadamente 1 % a aproximadamente 99,9 %, más específicamente, al menos aproximadamente el 1 %, aproximadamente 3 %, aproximadamente 5 %, aproximadamente 7 %, aproximadamente 9 %, aproximadamente 11 %, aproximadamente 13 %, aproximadamente 15 %, aproximadamente 17 %, aproximadamente 19 %, aproximadamente 21 %, aproximadamente 23 %, aproximadamente 25 %, aproximadamente 27 %, aproximadamente 29 %, aproximadamente 30 %, aproximadamente 31 %, aproximadamente 33 %, aproximadamente 35 %, aproximadamente 37 %, aproximadamente 39 %, aproximadamente 41 %, aproximadamente 43 %, aproximadamente 45 %, aproximadamente 47 %, aproximadamente 49 %, aproximadamente 51 %, aproximadamente 53 %, aproximadamente 55 %, aproximadamente 57 % o aproximadamente 60 %. Más específicamente, los tratamientos pueden aumentar el peso de la planta en al menos

aproximadamente 25 % a aproximadamente 35 %.

Con respecto al número de hojas por planta, la composición puede aumentar dicho número entre aproximadamente 1 % y aproximadamente 99,9 %, más específicamente, al menos aproximadamente el 1 %, aproximadamente 3 %, aproximadamente 5 %, aproximadamente 7 %, aproximadamente 9 %, aproximadamente 11 %, aproximadamente 13 %, aproximadamente 15 %, aproximadamente 17 %, aproximadamente 19 %, aproximadamente 20 %, aproximadamente 21 %, aproximadamente 23 %, aproximadamente 24 %, aproximadamente 25 %, aproximadamente 26 %, aproximadamente 27 %, aproximadamente 29 %, aproximadamente 30 %, aproximadamente 31 %, aproximadamente 33 %, aproximadamente 35 %, aproximadamente 37 %, aproximadamente 39 %, aproximadamente 41 %, aproximadamente 43 %, aproximadamente 45 %, aproximadamente 47 %, aproximadamente 49 %, aproximadamente 51 %, aproximadamente 53 %, aproximadamente 55 %, aproximadamente 57 % o aproximadamente 60 %. Más específicamente, los tratamientos pueden aumentar el número de hojas de la planta en al menos aproximadamente 20 % a aproximadamente 30 %.

Se pueden encontrar ejemplos de dichas mejoras en el Ejemplo 11 y en las Figuras 11A-11C.

La composición también puede mejorar el sistema de la raíz de la planta, como se manifiesta en un aumento en el peso de las partes subterráneas de dicha planta. El peso de las partes subterráneas de dicha planta puede aumentar entre aproximadamente 1 % y aproximadamente 99,9 %, más específicamente, al menos aproximadamente el 1 %, aproximadamente 3 %, aproximadamente 5 %, aproximadamente 7 %, aproximadamente 9 %, aproximadamente 11 %, aproximadamente 13 %, aproximadamente 15 %, aproximadamente 17 %, aproximadamente 19 %, aproximadamente 20 %, aproximadamente 21 %, aproximadamente 23 %, aproximadamente 24 %, aproximadamente 25 %, aproximadamente 26 %, aproximadamente 27 %, aproximadamente 29 %, aproximadamente 30 %, aproximadamente 31 %, aproximadamente 33 %, aproximadamente 35 %, aproximadamente 37 %, aproximadamente 39 %, aproximadamente 41 %, aproximadamente 43 %, aproximadamente 45 %, aproximadamente 47 %, aproximadamente 49 %, aproximadamente 51 %, aproximadamente 53 %, aproximadamente 55 %, aproximadamente 57 % o aproximadamente 60 %.

La composición también puede aumentar el grosor del tallo de la planta. El grosor del tallo de dicha planta puede aumentar entre aproximadamente 1 % y aproximadamente 99,9 %, más específicamente, al menos aproximadamente el 1 %, aproximadamente 3 %, aproximadamente 5 %, aproximadamente 7 %, aproximadamente 9 %, aproximadamente 11 %, aproximadamente 13 %, aproximadamente 15 %, aproximadamente 17 %, aproximadamente 19 %, aproximadamente 20 %, aproximadamente 21 %, aproximadamente 23 %, aproximadamente 24 %, aproximadamente 25 %, aproximadamente 26 %, aproximadamente 27 %, aproximadamente 29 %, aproximadamente 30 %, aproximadamente 31 %, aproximadamente 33 %, aproximadamente 35 %, aproximadamente 37 %, aproximadamente 39 %, aproximadamente 41 %, aproximadamente 43 %, aproximadamente 45 %, aproximadamente 47 %, aproximadamente 49 %, aproximadamente 51 %, aproximadamente 53 %, aproximadamente 55 %, aproximadamente 57 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 70 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 90 % o aproximadamente 100 %.

Adicionalmente, la composición desvelada en el presente documento también puede hacer que la planta sea más leñosa (vertical), como se refleja en una disminución en el ángulo entre la planta y una línea vertical (perpendicular al suelo). Esta disminución puede ser de al menos aproximadamente 0,1°, aproximadamente 0,2°, aproximadamente 0,4°, aproximadamente 0,8°, aproximadamente 1,0°, aproximadamente 2,0°, aproximadamente 3,0°, aproximadamente 4,0°, aproximadamente 5,0°, aproximadamente 6,0°, aproximadamente 8,0°, aproximadamente 10°, aproximadamente 12°, aproximadamente 14°, aproximadamente 16°, aproximadamente 18°, aproximadamente 20°, aproximadamente 22°, aproximadamente 24°, aproximadamente 28°, aproximadamente 30° o aproximadamente 35°.

La composición puede aumentar la biomasa de la planta entre aproximadamente 1 % a aproximadamente 99,9 %, más específicamente, en al menos aproximadamente 1 %, aproximadamente 3 %, aproximadamente 5 %, aproximadamente 7 %, aproximadamente 9 %, aproximadamente 11 %, aproximadamente 13 %, aproximadamente 15 %, aproximadamente 17 %, aproximadamente 19 %, aproximadamente 20 %, aproximadamente 21 %, aproximadamente 23 %, aproximadamente 24 %, aproximadamente 25 %, aproximadamente 26 %, aproximadamente 27 %, aproximadamente 29 %, aproximadamente 30 %, aproximadamente 31 %, aproximadamente 33 %, aproximadamente 35 %, aproximadamente 37 %, aproximadamente 39 %, aproximadamente 41 %, aproximadamente 43 %, aproximadamente 45 %, aproximadamente 47 %, aproximadamente 49 %, aproximadamente 51 %, aproximadamente 53 %, aproximadamente 55 %, aproximadamente 57 % o aproximadamente 60 %.

Las composiciones desveladas en el presente documento pueden comprender además un agente agrícola adicional seleccionado del grupo que consiste en: herbicidas, insecticidas, estimulador del crecimiento y abono.

Un herbicida, también conocido como destructor de malas hierbas, es un tipo de pesticida usado para matar plantas no deseadas. Los herbicidas selectivos matan objetivos específicos mientras dejan el cultivo deseado relativamente intacto. Algunos de estos actúan interfiriendo con el crecimiento de la maleza y con frecuencia son imitaciones sintéticas de hormonas vegetales. Los herbicidas utilizados para limpiar los residuos, sitios industriales, ferrocarriles y terraplenes no son selectivos y matan todo material vegetal con el que entran en contacto. En silvicultura, sistemas de pastos y manejo de áreas reservadas como hábitat de vida silvestre se usan cantidades más pequeñas.

Los herbicidas se pueden agrupar por actividad, uso, familia química, modo de acción o tipo de vegetación controlada.

Por actividad, los herbicidas pueden ser herbicidas de contacto que destruyen solo el tejido de la planta en contacto con el producto químico, o herbicidas sistémicos que se desplazan por la planta, ya sea desde la aplicación foliar hasta las raíces, o desde la aplicación en el suelo hasta las hojas.

- 5 Por el uso, los herbicidas pueden incorporarse antes de la planta, es decir, se aplican en el suelo antes de la siembra y se incorporan mecánicamente en el suelo. El objetivo de la incorporación es prevenir la disipación mediante fotodecomposición y/o volatilidad. Pueden ser herbicidas preemergentes, que se aplican al suelo antes de que emerja el cultivo y previenen la germinación o el crecimiento temprano de las semillas de malezas, o pueden ser herbicidas postemergentes que se aplican después de que el cultivo haya emergido.
- 10 Su clasificación por mecanismo de acción (MDA) indica la primera enzima, proteína o etapa bioquímica afectada en la planta después de la aplicación. Los principales mecanismos de acción son:
- Los inhibidores de la ACCasa son compuestos que matan gramíneas. La acetil coenzima A carboxilasa (ACCasa) es parte de la primera etapa de la síntesis de lípidos. Por tanto, los inhibidores de la ACCasa afectan a la producción de la membrana celular en los meristemas de la planta de la hierba. Las ACCasas de gramíneas son sensibles a estos herbicidas, mientras que las ACCasas de las plantas dicotiledóneas no lo son.
  - 15 • inhibidores de ALS: la enzima acetolactato sintasa (ALS) (también conocida como acetohidroxiácido sintasa, o AHAS) es la primera etapa en la síntesis de los aminoácidos de cadena ramificada (valina, leucina e isoleucina). Estos herbicidas matan lentamente a las plantas afectadas de estos aminoácidos, lo que eventualmente conduce a la inhibición de la síntesis de ADN. Afectan a gramíneas y dicotiledóneas por igual. La familia de inhibidores de la ALS incluye sulfonilureas (SU), imidazolinonas (IMI), triazolpirimidinas (TP), oxibenzoatos de pirimidinilo (POB) y sulfonilamino carbonil triazolinonas (SCT). La ALS es una vía biológica que existe solo en las plantas y no en los animales, lo que hace que los inhibidores de la ALS se encuentren entre los herbicidas más seguros.
  - 20 • Inhibidores de la EPSPS: La enzima enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa EPSPS se utiliza en la síntesis de los aminoácidos triptófano, fenilalanina y tirosina. Afectan a gramíneas y dicotiledóneas por igual. El glifosato (Roundup) es un inhibidor sistémico de la EPSPS pero se inactiva por contacto con el suelo.
  - 25 • La auxina sintética inauguró la era de los herbicidas orgánicos. Se descubrieron en la década de 1940 después de un largo estudio del regulador de crecimiento de plantas auxina. Las auxinas sintéticas imitan esta hormona vegetal. Tienen varios puntos de acción en la membrana celular y son efectivos en el control de las plantas dicotiledóneas. El 2,4-D es un herbicida sintético auxina.
  - 30 • Los inhibidores del fotosistema II reducen el flujo de electrones del agua a NADPH<sub>2</sub><sup>+</sup> en la etapa fotoquímica en la fotosíntesis. Se unen al sitio Q<sub>b</sub> en la proteína D1 y evitan que la quinona se una a este sitio. Por lo tanto, este grupo de compuestos hace que los electrones se acumulen en las moléculas de clorofila. Como consecuencia, se producen reacciones de oxidación superiores a las que normalmente tolera la célula y la planta muere. Los herbicidas de triazina (incluida la atrazina) y los derivados de la urea (diurón) son inhibidores del fotosistema II,
  - 35 • Los inhibidores del fotosistema I roban electrones de la ruta normal a través de FeS - Fdx - NADP que conduce a la descarga directa de electrones en oxígeno. Como resultado, se producen ROS (especies reactivas de oxígeno) y reacciones de oxidación en exceso a las que la célula tolera normalmente, lo que lleva a la muerte de la planta.

Ejemplos de herbicidas incluyen, pero sin limitación: tralkoxidim, quizalofop, diclofop, clodinafop, setoxidim, fenoxirop, cletodim, difenzoquat, trialato, pendimetalin, trifluralin, etalfluralin, imazametabenz, sulfesulfurón, flucarbazona, 40 metsulfuron, triasulfuron, tribenuron, clorsulfuron, tifensulfuron, prosulfuron, imazapic, imazatapir. Imazamox, glifosato, sulfosato, paraquat, dicamba, clopiralid 2,4-D, quinclorac, fluoxipir, clopiralid, picloram, piridato y bromoxinilo.

Como agente activo adicional, las composiciones desveladas en el presente documento pueden comprender además un insecticida.

45 Un insecticida es un pesticida que se usa contra los insectos. Incluyen ovicidas y larvicidas utilizados contra los huevos y larvas de insectos, respectivamente. Los insecticidas se utilizan en la agricultura, medicina, industria y el hogar. Se cree que el uso de insecticidas es uno de los principales factores detrás del aumento de la productividad agrícola en el siglo XX.

- Los insecticidas sistémicos son incorporados por las plantas tratadas. Los insectos ingieren el insecticida mientras se alimentan de las plantas.
- 50 • Los insecticidas de contacto son tóxicos para los insectos que entran en contacto directo. La eficacia a menudo está relacionada con la calidad de la aplicación de pesticidas, con pequeñas gotas (tales como aerosoles) que a menudo mejoran el rendimiento.
- Los insecticidas naturales, tales como la nicotina, piretro y extractos de nim son fabricados por las plantas como defensas contra los insectos. Los insecticidas a base de nicotina están prohibidos en Estados Unidos desde 2001 para evitar que los residuos contaminen alimentos.
- 55 • Los Protectores Incorporados por la Planta (PIP) son sustancias insecticidas producidas por las plantas después de la modificación genética. Por ejemplo, un gen que codifica una proteína biocida de *Bacillus thuringiensis* específica se introduce en el material genético de una planta de cultivo. Después, la planta fabrica la proteína. Dado que el biocida se incorpora en la planta, no se necesitan aplicaciones adicionales de al menos el mismo

compuesto.

- Los insecticidas inorgánicos se fabrican con metales e incluyen arsenatos, compuestos de cobre y compuestos de flúor, que ahora se utilizan raramente, y azufre, que se utiliza habitualmente.
- Los insecticidas orgánicos son productos químicos sintéticos que comprenden el mayor número de pesticidas disponibles para su uso en la actualidad.

Los ejemplos de insecticidas incluyen, pero sin limitación: acetato de (E)-7-dodecenilo/acetato de (E)-8-dodecenilo/acetato de (Z)-8-dodecenilo, (E, E)-8,10-dodecadien-1-ol, 1,3 dicloropropeno, acetato de 3(S)-metil-6-isopropenil-9-docadien-1-ilo, abamectina, acefato, acetamiprid, aldicarbo, *Allium sativum*, alfa-cipermetrina, fosfuro de aluminio, amitraz, azadiractina, azinfos metilo, *Bacillus thuringiensis subsp. israelensis*, *Bacillus thuringiensis var aizawai kurstaki*, *Beauveria bassiana*, benfuracarb, beta-ciflutrina, beta-cipermetrina, bifentina/miclobutanilo, bifentrina, bórax, *Bradyrhizobium japonicum*, brodifacoum, bromopropilato, buprofenzina, cadusafos, aceite de cánola/extracto de ajo/piretro, carbarilo, carbofurano, dióxido de carbono/óxido de etileno, carbosulfán, clorhidrato de cartap, clorfenapir, clorpirifos, aceite de citronela, clofentezina, codlimona (E, E-8,10-dodecadieno-1-ol), codlimona [(E, E) - 8,10 dodecadieno-7-ol], cobre, oxiclورو de cobre/azufre, cumatetralilo, *Cryptophlebia leucotreta*, cianofos, ciflutrina, cihexatina, cipermetrina, ciromazina, daletrina, dazomet, deltametrina, demeton-S-metilo, diazinón, diclorvos, dicofol, difenacoum, diflubenzurón, dimetoato, dimilina, disulfotón, d-fenotrina/tetrametrina, E, E-8,10-dodecadien-1-ol/dodecadienol/tetradecadenol, E, E-8,10-dodecadien-1-ol, EDB, emamectina, endosulfán, esfenvalerato, etoprofos, dibromuro de etileno, etoxazol, fenamifos, fenazaquin, fenbutatina, fenitrohión, fenoxicarb, fenpiroximato, fentión, fenvalerato, EDTA de sodio férrico, fipronilo, flufenoxuron, flumetrin, formetanato, fostiazato, fumagilina, furfural, gamma-BHC, gama-cihalotrina, extracto de ajo, hidrametilnon, imidacloprid, lambda-cihalotrin, senecioato de lavandulilo, lufenuron, fosfuro de magnesio, mancozeb, lactona de arce, mercaptotión, metaldehído, metam-sodio, aislado IMI 330 189 de *Metarhizium anisopliae var acridium*, metano-sodio, metamidofos, metidatión, metidatión, metiocarb, metomilo, bromuro de metilo, mevinfos, milbemectina, aceite mineral, novaluron, ometoato, orto-fenilfenol, oxamilo, oxidemetón-metilo, cepa 251 de *Paecilomyces lilacinus*, paratión, permetrina, fenotoato, forato, pirimicarb, azufre polisulfuro, sales potásicas de ácidos grasos, profenofos, propargita, protiofos, piretrinas, piriproxifeno, quinalfos, aceite de colza, *Rhizobium leguminosarum biovar phaseoli*, rotenona, fluosilicato de sodio, espinosad, espirodiclofeno, azufre, tártaro emético, tau-fluvalinato, tebufenozida, temefos, terbufos, tetraclorvinfos, acetato de tetradecenilo, tetradión, tiacloprid, tiametoxam, tiodicarbo, tiram, triclorfón, *Trichoderma harzianum*, triflumurón, trimedlure, Z-8 acetato de dodecen-1-ilo/E-8 acetato de dodecen-1-ilato/Z-8 dodecen-1-ol y fosfuro de cinc.

Aún más, como agente activo adicional, las composiciones desveladas en el presente documento pueden comprender además estimuladores del crecimiento. La expresión "estimuladores del crecimiento", o "estimuladores del crecimiento de las plantas", como se usa en el presente documento, se refiere a sustancias que inducen un aumento en al menos uno de: la biomasa vegetal, las bifurcaciones y longitud del sistema radicular, el peso de la planta, el número de hojas, el grosor del tallo, la altura de la planta y el número de flores y/o frutos. Dichos estimuladores pueden ser de origen biológico, orgánico o inorgánico y pueden ser sólidos o líquidos. Los ejemplos no limitantes de dichos material incluyen: Bov-A-MuraC © (estiércol soluble pulverizable), FeRRROMEC®, Launch® Biostimulant (contiene hormonas vegetales del extracto de algas marinas de agua fría junto con ácidos húmicos y fúlvicos), Solu-Cal® (carbonato de calcio granulado molido (38 %) impregnado con un ácido orgánico patentado), estimulador VigaROOT™ (combinación soluble en seco de hierro quelado, manganeso quelado, cinc quelado, sustancia húmica natural, extracto de algas marinas, yuca y una mezcla patentada de azúcares naturales, vitaminas, aminoácidos y bacterias beneficiosas), Sprint® 330 FE Iron (10 % de hierro DTPA completamente quelado).

Las composiciones desveladas en el presente documento pueden comprender además fertilizantes. El término "fertilizante" se refiere a cualquier material orgánico o inorgánico de origen natural o sintético (distinto de los materiales calcáreos) que se añade a un suelo para suministrar uno o más nutrientes esenciales para el crecimiento de las plantas. Una evaluación reciente encontró que alrededor del 40 al 60 % de los rendimientos de los cultivos son atribuibles al uso comercial de fertilizantes.

Los fertilizantes inorgánicos minados se han utilizado durante muchos siglos, mientras que los fertilizantes inorgánicos sintetizados químicamente solo se desarrollaron ampliamente durante la revolución industrial. El uso de fertilizantes inorgánicos también ha contribuido significativamente al crecimiento de la población mundial, se ha estimado que casi la mitad de las personas en la Tierra se alimentan actualmente como resultado del uso de fertilizantes con nitrógeno sintético. Los fertilizantes orgánicos incluyen materiales orgánicos naturales, (por ejemplo, estiércol, mudas de gusano, abonos, algas marinas, guano), o depósitos minerales naturales (por ejemplo, salitre).

Los fertilizantes suelen proporcionar, en proporciones variables:

seis macronutrientes: nitrógeno (N), fósforo (P), potasio (K), calcio (Ca), magnesio (Mg) y azufre (S); y seis micronutrientes: boro (B), cloro (Cl), cobre (Cu), hierro (Fe), manganeso (Mn), molibdeno (Mo) y cinc (Zn).

Ejemplos no limitantes para fertilizantes incluyen: nitrato de amonio 33,5 % de N, amonio 21 % de N, nitrato de sulfato de amonio 26 % de N, nitrato de amonio y calcio (CAN) 27 %, nitrato de calcio 15,5 % de N, nitrato de sodio (salitre de Chile natural) 16 % de N, urea 46 % de N, urea baja en biuret, escoria básica 10 % P205, Fosfato de roca 30/32 % P205, súper fosfato único 18/20 % P205 (polvo/granular), súper fosfato triple 46 % P205 granular 43 % (soluble en agua), muriato de potasa 60 % K20, sulfato de potasa 48/52 % K20, fosfato de diamonio (DAP) 18-46-0, monofosfato de amonio (MAP) 12-52-0, harina de alfalfa, guano murciélago y ave, harina de sangre, harina de huesos, estiércol de

pollo, harina de pescado, algas marinas (líquidas), mudas de gusano/vermicompostaje, harina de semilla de algodón y otros.

En otro aspecto, la invención se refiere a un procedimiento de tratamiento, prevenir, inhibir, eliminar o retrasar la aparición de infecciones bacterianas, fúngicas o de plagas en una planta o en un material vegetal. El procedimiento de la invención comprende la etapa de aplicar sobre una planta, a un material vegetal o en las proximidades de la planta tratada o material vegetal, un agente de control biológico o una composición que comprende el mismo. El agente de control biológico comprende al menos uno de:

- a. células de *Pseudozyma aphidis* o cualquier aislado de las mismas;
- b. esporas de *Pseudozyma aphidis*;
- c. medio de cultivo condicionado de *Pseudozyma aphidis*;
- d. compuestos secretados de *Pseudozyma aphidis*;
- e. cualquier extracto o preparación de cualquiera de (a) a (d); y
- f. una combinación de al menos dos de los agentes de control biológico definidos en de (a) a (e).

Debe apreciarse que el procedimiento de la invención es aplicable en el tratamiento y prevención de la infección o infestación de cualquier patógeno vegetal y cualquier afección patológica causada por el mismo.

Como se usa en el presente documento, el término "enfermedad" o "afección" se refiere a un estado en el que existe una alteración del funcionamiento normal. Una "enfermedad" es cualquier condición anormal de la planta que causa disfunción o daña el sabor, la fragancia, el aspecto o la textura de dicha planta. Cabe señalar que los términos "enfermedad", "trastorno" y "afección" se utilizan igualmente en el presente documento. En casos específicos, una enfermedad está causada por agentes patógenos, incluyendo bacterias, hongos, virus, nematodos, insectos u otras plagas.

Los términos "prevención" o "profilaxis", como se usan en el presente documento, se refieren a la prevención de la aparición de una patología vegetal, ya sea sintomática o no. Como tales, los procedimientos de la invención pueden emplearse para evitar que se produzcan afecciones mediadas por patógenos de plantas nocivos y, por lo tanto, pueden usarse para mejorar o estabilizar la salud de cualquier planta. La aplicación del agente de control biológico de la invención o cualquiera de sus composiciones, a la planta, o cualquier parte de la planta, cultivos tisulares o celulares, con el fin de prevenir una infección o infestación bacteriana, fúngica, vírica, de insectos, nematodos, o cualquier otra plaga, o para tratar una establecida, puede ser único o múltiple, y puede tener lugar durante un período prolongado de tiempo. Por ejemplo, el agente de control biológico de la invención o cualquier composición del mismo puede aplicarse al menos aproximadamente cada 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 60, 90, 120, 150 o 180 días. Como alternativa, el agente de control biológico o una composición del mismo puede aplicarse aproximadamente cada 1 a aproximadamente cada 7 días, aproximadamente cada 1 a aproximadamente cada 14 días, aproximadamente cada 1 a aproximadamente cada 21 días, aproximadamente cada 1 a aproximadamente cada 28 días o aproximadamente cada 1 a aproximadamente cada 35 días. Como alternativa, el agente de control biológico o una composición del mismo puede aplicarse aproximadamente cada 1 a aproximadamente cada 30 días, aproximadamente cada 1 a aproximadamente cada 60 días o aproximadamente cada 1 a aproximadamente cada 90 días. Como alternativa, el agente de control biológico o una composición del mismo puede aplicarse aproximadamente cada 1 a aproximadamente cada 7 días, aproximadamente cada 7 a aproximadamente cada 14 días, aproximadamente cada 14 a aproximadamente cada 21 días, aproximadamente cada 21 a aproximadamente cada 28 días o aproximadamente cada 28 a aproximadamente cada 35 días.

De hecho, el agente de control biológico o una composición del mismo puede aplicarse periódicamente durante la vida de la planta, o incluso aplicarse a la vecindad de la planta periódicamente más allá del ciclo de vida de la planta tratada.

El agente de control biológico o cualquier composición del mismo se aplica sobre una planta o un material vegetal. Se observa que la expresión "material vegetal" utilizado en el presente documento abarca raíces, bulbos, tubérculos, cormos, hojas, flores, semillas, tallos, tejido del callo, nueces, cereales, frutas, esquejes, portainjerto, vástagos, cultivos cosechados, incluyendo raíces, bulbos, tubérculos, cormos, hojas, flores, semillas, tallos, tejido del callo, nueces, cereales, frutas, esquejes, portainjerto, vástagos o cualquier superficie que pueda entrar en contacto con los cultivos cosechados, incluidos los equipos de cosecha, equipos de embalaje y material de embalaje.

El agente de control biológico o cualquier composición del mismo se puede aplicar en las proximidades de la planta tratada o del material vegetal. La expresión "proximidad de la planta o material tratado" se refiere al perímetro que rodea dicha planta o material vegetal sobre el que se puede aplicar la composición de acuerdo con la invención para tratar o prevenir la infección o infestación de plantas o material vegetal. Por lo tanto, se entiende que la "proximidad de dicha planta o material vegetal" abarca todos los objetos presentes dentro de un intervalo de hasta al menos aproximadamente 1 cm, 2 cm, 3 cm, 4 cm, 5 cm, 6 cm, 7 cm, 8 m, 9 m, 10 cm, 20 cm, 30 cm, 40 cm, 50 cm, 60 cm, 70 cm, 80 cm, 90 cm, 1 m, 2 m, 3 m, 4 m, 5 m, 6 m, 7 m, 8 m, 9 m, 10 m, 11 m, 12 m, 13 m, 14 m, 15 m, 16 m, 17 m, 18 m, 19 m, 20 m, 30 m, 40 m o incluso 50 m de dicha planta o material vegetal. La expresión "proximidad de dicha planta o material vegetal" también se refiere a objetos a los que se aplica la composición de la invención antes de su colocación en dicho intervalo de la planta o material vegetal tratados. Por ejemplo, un fertilizante o cualquier otro

suplemento puede aumentarse con la composición de la invención antes de su aplicación a dicha planta.

Se aprecia que las composiciones desveladas en el presente documento son particularmente adecuadas para el tratamiento y la profilaxis de enfermedades de plantas y, por lo tanto, pueden ser útiles para proteger cultivos y otras plantas comercialmente importantes, o cualquier otra planta.

- 5 En una realización, el procedimiento de la invención es para tratar, inhibir, eliminar o retrasar la aparición de infecciones o infestaciones bacterianas.

Se entiende que dichas infecciones bacterianas pueden estar causadas por al menos uno de los siguientes: *Clavibacter michiganensis*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Erwinia amylovora*, *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, *Streptomyces scabies*, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* y *Xanthomonas capestris* pv. *vesicatoria*.

- 10 Ejemplos no limitativos de enfermedades bacterianas de plantas y sus instigadores incluyen: mancha foliar bacteriana (*Xanthomonas campestris* pv. *Alfalfae*); podredumbre bacteriana de los brotes (*Erwinia chrysanthemi* pv. *chrysanthemi*); marchitamiento bacteriano (*Clavibacter michiganensis* subsp. *insidiosus*); agalla de la corona (*Agrobacterium tumefaciens*); complejo de podredumbre de la corona y la raíz (*Pseudomonas viridiflava*); enanismo (*Xylella fastidiosa*); mancha foliar de *Syringae* (*Pseudomonas syringae* pv. *Syringae*); cancro bacteriano (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*); y marchitamiento bacteriano (*Ralstonia solanacearum*).

En una realización específica, el procedimiento de la invención se puede usar para el tratamiento de afecciones patológicas asociadas a *Clavibacter michiganensis*, por ejemplo, de cancro bacteriano del tomate.

- 20 El procedimiento de la invención también se puede usar para el tratamiento de la enfermedad de la agalla de la corona (la formación de tumores) en más de 140 especies de dicotiledóneas, específicamente, una enfermedad causada por *Agrobacterium tumefaciens*.

- Otra realización se refiere al procedimiento de la invención para tratar el tizón de fuego causado por *Erwinia amylovora*. El tizón de fuego es una enfermedad contagiosa que afecta a las manzanas, las peras y algunos otros miembros de la familia *Rosaceae*. Es una seria preocupación para los productores de manzanas y peras. en condiciones óptimas, puede destruir todo un huerto en una sola estación de crecimiento.

Aún más, el procedimiento de la invención puede ser aplicable para tratar afecciones patológicas asociadas a *Pseudomonas syringae*, por ejemplo, la producción de proteínas Ina por dicho patógeno hace que el agua se congele a temperaturas bastante altas, causando lesiones a las plantas.

- 30 En otra realización, el procedimiento de la invención es aplicable en el tratamiento de enfermedades patológicas asociadas a *Streptomyces scabies*, por ejemplo, síntomas de sarna en patatas y otros cultivos de tubérculos.

En otra realización, el procedimiento de la invención puede ser aplicable para tratar enfermedades de plantas causadas por *Xanthomonas campestris*. Más específicamente, los síntomas de dichas enfermedades incluyen clorosis marginal de la hoja y oscurecimiento del tejido vascular, acompañado de extenso marchitamiento y necrosis. El amarilleamiento de toda la hoja, el marchitamiento y la necrosis se producen a medida que avanza la enfermedad.

- 35 En realizaciones más específicas, el procedimiento puede ser aplicable para tratar, inhibir, eliminar o retrasar la aparición de infecciones fúngicas.

En dichas realizaciones, las infecciones por hongos pueden estar causadas por al menos uno de los siguientes: *Botrytis cinerea*, *Penicillium digitatum*, *Alternaria brassicicola*, *Uromyces appendiculatus*, *Leveillula taurica*, *Sclerotinia sclerotiorum* y *Puccinia coronata*.

- 40 Los ejemplos no limitativos de enfermedades de hongos en plantas y sus instigadores incluyen: podredumbre de la raíz y la corona de *Acrocalymma* (*Acrocalymma medicaginis*, *Massarina walkeri*); antracnosis (*Colletotrichum trifolii*); podredumbre de la raíz de *Aphanomyces* (*Aphanomyces euteiches*); parche negro (*Rhizoctonia leguminicola*); podredumbre de la raíz negra (*heliaviopsis basicola*, *Chalara elegans*); tizón de la flor (*Botrytis cinerea*, *Botryotinia fuckeliana*, *Sclerotinia sclerotiorum*); podredumbre marrón de la raíz (*Phoma sclerotoides*); complejo de podredumbre de la corona y la raíz (*Fusarium acuminatum*, *Gibberella acuminata*, *Fusarium avenaceum*, *Gibberella avenacea*, *Fusarium Equiseti*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium sambucinum*, *Fusarium solani*, *Nectria haematococca*, *Fusarium* spp., *Phoma medicaginis*, *Pythium* spp., *Rhizoctonia solani*, *Thanatephorus cucumeris*, *Thielaviopsis basicola*, *Chalara elegans*); podredumbre del carbón (*Macrophomina phaseolina*); mancha foliar común (*Pseudopeziza medicaginis*); podredumbre de la raíz del corcho (*Xylaria* sp.); verruga de la corona (*Physoderma alfalfae*); podredumbre de la raíz de *Cylindrocarpon* (*Cylindrocarpon magnusianum*, *Nectria ramulariae*); podredumbre de la raíz y la corona de *Cylindrocladium* (*Cylindrocladium crotalariae*, *Calonectria crotalariae*); mal de los semilleros (*Fusarium acuminatum*, *Gibberella acuminata*, *Mycocleptodiscus terrestris*, *Phytophthora medicaginis*, *Phytophthora megasperma* f.sp. *medicaginis*, *Pythium* spp., *Pythium debaryanum*, *Pythium irregulare*, *Pythium splendens*, *Pythium ultimum*, *Rhizoctonia solani*, *Thanatephorus cucumeris*); mildiú veloso (*Peronospora trifoliorum*); marchitamiento por *Fusarium* (*Fusarium oxysporum* f.sp. *medicaginis*); mancha foliar por *Lepto* (*Leptosphaerulina trifolii*); podredumbre de la raíz de

Marasmius (*Marasmius sp.*); podredumbre de la raíz y la corona de *Mycoleptodiscus* (*Mycoleptodiscus terrestris*); podredumbre de la raíz de *Myrothecium* (*Myrothecium roridum*, *Myrothecium verrucaria*); podredumbre de la raíz de *Phymatotrichum* (*Phymatotrichopsis omnivore*), podredumbre de la raíz de *Phytophthora* (*Phytophthora medicaginis*, *Phytophthora megasperma f.sp. medicaginis*); oídio (*Erysiphe pisi*, *Leveillula taurica*); podredumbre de la raíz de *Rhizoctonia* y tizón del tallo (*Rhizoctonia solani*, *Thanatephorus cucumeris*); podredumbre del broe de *Rhizopus* (*Rhizopus stolonifer*); roya (*Uromyces striatus*); podredumbre del tallo y la corona de *Sclerotinia* (*Sclerotinia trifoliorum*, *Sclerotinia sclerotiorum*); tizón del sur (*Sclerotium rolfsii*, *Athelia rolfsii*); mancha negra primaveral y mancha foliar (*Phoma medicaginis*); mancha foliar de *Stagonospora* y podredumbre de la raíz (*Stagonospora meliloti*, *Phoma meliloti*, *Leptosphaeria pratensis*); mancha foliar de *Stemphylium* (*Pleospora spp.*, *Stemphylium alfalfae*, *Pleospora alfalfae*, *Stemphylium botryosum*, *Pleospora tarda*, *Stemphylium globuliferum*, *Stemphylium herbarum*, *Pleospora herbarum*, complejo de especies de *Stemphylium vesicarium*); mancha negra del verano y mancha foliar (*Cercospora medicaginis*); marchitamiento de *Verticillium* (*Verticillium albo-atrum*, *Verticillium dahliae*); podredumbre de la raíz de violeta (*Helicobasidium brebissonii*, *Rhizoctonia crocorum*); podredumbre de la corona de invierno (*Coprinus psychromorbidus*); mancha negra (*Alternaria alternata*); y mancha foliar amarilla (*Leptotrochila medicaginis*, *Sporonema phacioides*).

Según una realización, el procedimiento de la invención es aplicable en el tratamiento de afecciones patógenas asociadas a *Botrytis cinerea*. Por ejemplo, este hongo da lugar a dos tipos diferentes de infecciones en las uvas, la primera, la podredumbre gris, es el resultado de condiciones consistentemente húmedas o mojadas, y generalmente resulta en la pérdida de los racimos afectados. La segunda, la podredumbre noble, se produce cuando hay condiciones más secas después de más húmedas, y pueden dar como resultado vinos de postre claramente dulces, tal como los Sauternes o el Aszú de Tokaji. *Botrytis cinerea* afecta a muchas otras plantas. es económicamente importante en frutas blandas, tales como fresas y bulbos.

De acuerdo con otra realización, el procedimiento de la invención puede ser adecuado para tratar el deterioro fúngico en frutas y verduras y cualquier otra afección patológica causada por *Penicillium italicum*, *Penicillium digitatum*, *Penicillium expansum*. Por ejemplo, la podredumbre viscosa y la producción de conidios azul-verdosos y la producción de micotoxinas (por ejemplo, *P. expansum* produce una llamada patulina).

De acuerdo con otra realización, el procedimiento de la invención puede ser útil para tratar la enfermedad de la mancha negra (también llamada mancha oscura) en prácticamente todas las especies importantes de Brassica cultivadas, incluyendo brécol, col, cánola y mostaza, y cualquier otra condición patógena causada por el género *Alternaria*.

Aún más, el procedimiento de la presente invención puede ser aplicable para tratar la enfermedad común de la roya de la judía causada por el hongo basidiomiceto *Uromyces appendiculatus* (Pers.: Pers.) Unger.

En otra realización más, el procedimiento de la invención se puede usar para tratar el oídio del tomate causado por el hongo *Leveillula taurica*.

Otra realización se refiere al procedimiento de la invención para tratar el moho blanco causado por *Sclerotinia sclerotiorum*.

De acuerdo con ciertas realizaciones, el procedimiento de la invención se puede usar para tratar la roya de la corona de avena y la roya de la corona de cebada causada por *Puccinia coronata*.

Este procedimiento antifúngico puede ser particularmente adecuado para inhibir al menos una de las germinaciones de esporas y la formación de hifas.

Los procedimientos desvelados en el presente documento pueden ser aplicables para tratar afecciones asociadas con nematodos. Los ejemplos no limitativos de enfermedades de nematodos de plantas y sus instigadores incluyen: nematodos del bulbo y el tallo (*Ditylenchus dipsaci*); nematodo foliar del crisantemo (*Aphelenchoides ritzemabosi*); nematodo de quiste (*Heterodera trifolii*); nematodo daga (*Xiphinema americanum*); nematodo de la lesión (*Pratylenchus spp.*, *Pratylenchus neglectus*, *Pratylenchus penetrans*); nematodo de aguja (*Longidorus spp.*); nematodo del pasador (*Paratylenchus spp.*, *Paratylenchus hamatus*); nematodo reniforme (*Rotylenchulus spp.*); nematodo del nudo de la raíz (*Meloidogyne spp.*, *Meloidogyne arenaria*, *Meloidogyne chitwoodi*, *Meloidogyne hapla*, *Meloidogyne incognita*, *Meloidogyne javanica*); nematodo espiral (*Helicotylenchus spp.*); nematodo de raíz gruesa (*Paratrichodorus spp.*); y nematodo del raquitismo (*Tylenchorhynchus spp.*).

Aún más, los procedimientos y composiciones desvelados en el presente documento pueden usarse para tratar afecciones patológicas causadas por patógenos víricos. Los ejemplos no limitativos de enfermedades víricas de plantas y sus instigadores incluyen: enanismo de la alfalfa (género *Rhabdovirus*, virus del enanismo de la alfalfa (AEV)); mosaico de alfalfa (género *Alfavirus*, virus del mosaico de la alfalfa (AMV)); enrollamiento de la hoja de la judía (género *Luteovirus*, virus del enrollamiento de la hoja de la judía (BLRV)); mosaico amarillo de la judía (género *Potyvirus*, virus del mosaico amarillo de la judía (BYMV)); mosaico del pepino (género *Cucumovirus*, virus del mosaico del pepino (CMV)); latente australiano de la alfalfa (género *Nepovirus*, virus latente australiano de la alfalfa (LALV)); sintomático australiano de la alfalfa (género *Comoviridae*, virus asintomático australiano de la alfalfa (LASV)); rayado transitorio de la alfalfa (género *Sobemovirus*, virus rayado transitorio de la alfalfa (LTSV)); rayado del guisante (género *Carlavirus*, virus rayado del guisante (PSV)); mosaico de las venas del trébol rojo (género *Carlavirus*, virus del mosaico

de las venas del trébol rojo (RCVMV)); rayado del tabaco (género *Ilarvirus*, virus rayado del tabaco (TSV)); grabado del tomate (virus del grabado del tabaco); y mosaico del trébol blanco (género *Potexvirus*, virus del mosaico del trébol blanco (WCMV)).

5 El procedimiento de la invención protege a las plantas del patógeno al conferir resistencia en las plantas contra infecciones o infestaciones de plagas. Más específicamente, el procedimiento de la invención comprende la etapa de aplicar sobre una planta, a un material vegetal o en las proximidades de dicha planta o material vegetal o vegetal, un agente de control biológico o una composición que comprende el mismo. El agente de control biológico de la invención comprende al menos uno de:

- 10 a. células de *Pseudozyma aphidis* o cualquier aislado de las mismas;
- b. esporas de *Pseudozyma aphidis*;
- c. medio de cultivo condicionado de *Pseudozyma aphidis*;
- d. compuestos secretados de *Pseudozyma aphidis*;
- e. cualquier extracto o preparación de cualquiera de (a) a (d); y
- f. una combinación de al menos dos de los agentes de control biológico definidos en de (a) a (e).

15 Los procedimientos de la invención confieren resistencia en plantas tratadas. El término "resistencia" se refiere a la capacidad de las plantas para soportar infecciones o infestaciones bacterianas, fúngicas, víricas, por insectos u otras plagas, es decir, dichas plantas pueden demostrar mejores tasas de supervivencia durante y después de tales infecciones o infestaciones en comparación con plantas no tratadas, pueden mostrar síntomas menores en comparación con las plantas no tratadas o pueden no estar infectadas o infestadas en tasas tan altas como las plantas no tratadas.

20 La concentración del agente de control biológico para su uso para las composiciones y procedimientos de la presente invención varía dependiendo de las diferencias en los cultivos objetivos, el procedimiento de uso, la forma de preparación, la cantidad de aplicación, el tiempo de aplicación, los tipos de patógenos dañinos y similares, y no necesariamente pueden definirse.

25 En una realización, el procedimiento regula al alza o induce la expresión de genes relacionados con el sistema inmunológico.

En una realización más específica, los genes relacionados con el sistema inmunitario de la planta codifican al menos una de la familia de proteínas relacionadas con la patogenicidad y la familia de las defensinas.

30 Las composiciones pesticidas desveladas en el presente documento son eficaces en el tratamiento, mejora, prevención, eliminación, demora de patógenos o confiere resistencia contra patógenos que incluyen, entre otros, virus o viroides, bacterias, insectos, nematodos, hongos y similares. Los virus incluyen cualquier virus vegetal, por ejemplo, virus del mosaico del tabaco o del pepino, virus de la mancha anular, virus de la necrosis, virus del mosaico del enanismo del maíz, etc. Los patógenos fúngicos, de tipo fúngico y víricos específicos para los principales cultivos incluyen: Sojas: *Phytophthora megasperma* sp. *glycinea*, *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium oxysporum*, *Diaporthe phaseolorum* var. *sojiae* (*Phomopsis sojiae*), *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora*, *Sclerotium rolfsii*, *Cercospora kikuchii*, *Cercospora sojina*, *Peronospora manshurica*, *Colletotrichum dematium* (*Colletotrichum truncatum*), *Corynespora cassiicola*, *Septoria glycines*, *Phyllosticta sojicola*, *Alternaria alternata*, *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*, *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*, *Microsphaera diffusa*, *Fusarium semitectum*, *Phialophora gregata*, virus del mosaico de la soja, *Glomerella glycines*, virus de la mancha anular del tabaco, virus rayado del tabaco, *Phakopsora pachyrhizi*, *Pythium aphanidermatum*, *Pythium ultimum*, *Pythium debaryanum*, un virus del marchitamiento manchado del tomate, *Heterodera glycines* *Fusarium solani*; Canola: *Albugo candida*, *Alternaria brassicae*, *Leptosphaeria maculans*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Mycosphaerella brassicicola*, *Pythium ultimum*, *Peronospora parasitica*, *Fusarium roseum*, *Alternaria alternata*; Alfalfa: *Clavibacter michiganensis* subsp. *insidiosum*, *Pythium ultimum*, *Pythium irregulare*, *Pythium splendens*, *Pythium debaryanum*, *Pythium aphanidermatum*, *Phytophthora megasperma*, *Peronospora trifoliorum*, *Phoma medicaginis* var. *medicaginis*, *Cercospora medicaginis*, *Pseudopeziza medicaginis*, *Leptotrochila medicaginis*, *Fusarium*, *Xanthomonas campestris* pv. *alfalfae*, *Aphanomyces euteiches*, *Stemphylium herbarum*, *Stemphylium alfalfae*; Trigo: *Pseudomonas syringae* p.v. *atrofaciens*, *Urocystis agropyri*, *Xanthomonas campestris* pv. *translucens*, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *Alternaria alternata*, *Cladosporium herbarum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium avenaceum*, *Fusarium culmorum*, *Ustilago tritici*, *Ascochyta tritici*, *Cephalosporium gramineum*, *Colletotrichum graminicola*, *Erysiphe graminis* f.sp. *tritici*, *Puccinia graminis* f.sp. *tritici*, *Puccinia recondita* f.sp. *tritici*, *Puccinia striiformis*, *Pyrenophora tritici-repentis*, *Septoria nodorum*, *Septoria tritici*, *Septoria avenae*, *Pseudocercospora herpotrichoides*, *Rhizoctonia solani*, *Rhizoctonia cerealis*, *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, *Pythium aphanidermatum*, *Pythium arrhenomanes*, *Pythium ultimum*, *Bipolaris sorokiniana*, virus de la enana amarilla de la cebada, virus del mosaico Brome, virus del mosaico del trigo transmitido por el suelo, virus del mosaico del rayado del trigo, virus del rayado de la veta del trigo, virus del estriado del trigo americano, *Claviceps purpurea*, *Tilletia tritici*, *Tilletia laevis*, *Ustilago tritici*, *Tilletia indica*, *Rhizoctonia solani*, *Pythium arrhenomanes*, *Pythium graminicola*, *Pythium aphanidermatum*, virus de las tierras altas, virus estriado del trigo europeo; Girasol: *Plasmophora halstedii*, *Sclerotinia sclerotiorum*, Aster Yellow, *Septoria helianthi*, *Phomopsis helianthi*, *Alternaria helianthi*, *Alternaria zinniae*, *Botrytis cinerea*, *Phoma macdonaldii*, *Macrophomina phaseolina*, *Erysiphe cichoracearum*, *Rhizopus oryzae*, *Rhizopus arrhizus*, *Rhizopus stolonifer*, *Puccinia helianthi*, *Verticillium*

5 *dahliae*, *Erwinia carotovorum* p.v. *carotovora*, *Cephalosporium acremonium*, *Phytophthora cryptogea*, *Albugo tragopogonis*; Maíz: *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans*, *Erwinia stewartii*, *Fusarium verticilloides*, *Fusarium moniliforme*, *Gibberella zeae* (*Fusarium graminearum*), *Stenocarpella maydis* (*Diplodia maydis*), *Pythium irregulare*,  
 10 *Pythium debaryanum*, *Pythium graminicola*, *Pythium splendens*, *Pythium ultimum*, *Pythium aphanidermatum*,  
*Aspergillus flavus*, *Bipolaris maydis* O, T (*Cochliobolus heterostrophus*), *Helminthosporium carbonum* I, II & III  
 15 (*Cochliobolus carbonum*), *Exserohilum turcicum* I, II y III, *Helminthosporium pedicellatum*, *Physoderma maydis*,  
*Phyllosticta maydis*, *Kabatiella maydis*, *Cercospora sorghi*, *Ustilago maydis*, *Puccinia sorghi*, *Puccinia polysora*,  
*Macrophomina phaseolina*, *Penicillium oxalicum*, *Nigrospora oryzae*, *Cladosporium herbarum*, *Curvularia lunata*,  
*Curvularia inaequalis*, *Curvularia pallescens*, *Clavibacter michiganense* subsp. *nebraskense*, *Trichoderma viride*, virus  
 20 de mosaico del enanismo del maíz A y B, virus del mosaico del rayado del trigo, virus del enanismo clorótico del maíz,  
*Claviceps sorghi*, *Pseudomonas avenae*, *Erwinia chrysanthemi* pv. *zea*, *Erwinia carotovora*, *Corn stunt Spiroplasma*,  
*Diplodia macrospora*, *Sclerophthora macrospora*, *Peronosclerospora sorghi*, *Peronosclerospora philippinensis*,  
*Peronosclerospora maydis*, *Peronosclerospora sacchari*, *Sphacelotheca reiliana*, *Physopella zeae*, *Cephalosporium*  
 25 *maydis*, *Cephalosporium acremonium*, virus del moteado clorótico del maíz, virus de las tierras altas, virus del mosaico  
 del maíz, virus del rayado fino del maíz, virus del rayado del maíz, virus lineal del maíz, virus del enanismo áspero del  
 maíz; Sorgo: *Exserohilum turcicum*, *Colletotrichum graminicola* (*Glomerella graminicola*), *Cercospora sorghi*,  
*Gloeocercospora sorghi*, *Ascochyta sorghina*, *Pseudomonas syringae* p.v. *syringae*, *Xanthomonas campestris* p.v.  
*holcicola*, *Pseudomonas andropogonis*, *Puccinia purpurea*, *Macrophomina phaseolina*, *Periconia circinata*, *Fusarium*  
 30 *moniliforme*, *Alternaria alternata*, *Bipolaris sorghicola*, *Helminthosporium sorghicola*, *Curvularia lunata*, *Phoma*  
*insidiosa*, *Pseudomonas avenae* (*Pseudomonas alboprecipitans*), *Ramulispora sorghi*, *Ramulispora sorghicola*,  
*Phyllachara sacchari*, *Sporisorium reilianum* (*Sphacelotheca reiliana*), *Sphacelotheca cruenta*, *Sporisorium sorghi*,  
 mosaico H de la caña de azúcar, virus de mosaico del enanismo del maíz A y B, *Claviceps sorghi*, *Rhizoctonia solani*,  
*Acremonium strictum*, *Sclerophthora macrospora*, *Peronosclerospora sorghi*, *Peronosclerospora philippinensis*,  
 35 *Sclerospora graminicola*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium oxysporum*, *Pythium arrhenomanes*, *Pythium graminicola*;  
*Rice Magnaporthe grisea*, *Rhizoctonia solani*, etc.

También se observa que el procedimiento de la invención es eficaz para prevenir, mejorar, inhibir, eliminar o retrasar la aparición de infecciones o infestaciones por plagas en productos agrícolas e industriales, lo que prolonga la vida útil o el tiempo de almacenamiento de dicho producto.

30 En el quinto aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para promover el crecimiento en plantas. El procedimiento de la invención comprende la etapa de aplicar sobre una planta, a un material vegetal o en las proximidades de dicha planta o material vegetal o vegetal, un agente de control biológico o una composición que comprende el mismo. El agente de control biológico de la invención comprende al menos uno de:

- a. células de *Pseudozyma aphidis* o cualquier aislado de las mismas;
- b. esporas de *Pseudozyma aphidis*;
- 35 c. medio de cultivo condicionado de *Pseudozyma aphidis*;
- d. compuestos secretados de *Pseudozyma aphidis*;
- e. cualquier extracto o preparación de cualquiera de (a) a (d); y
- f. una combinación de al menos dos de los agentes de control biológico definidos en de (a) a (e).

40 Este procedimiento puede llevar a un aumento en al menos uno de: el peso de la planta, la altura de planta, el número de hojas de la planta, sistema radicular, espesor de la planta y biomasa de la planta.

Cabe señalar que todo el procedimiento de la invención implica la aplicación en una planta o en las proximidades de la planta tratada.

45 El procedimiento puede implicar adecuadamente la aplicación de la composición de la invención a un medio de cultivo, tal como el suelo, turba, arena o agua, en una zona donde exista dicha planta o material vegetal. Por ejemplo, la composición puede aplicarse o mezclarse con un medio de cultivo, tal como el suelo, turba, arena o agua, es decir, tener plantas plantadas en él o se pueden aplicar o mezclar con un medio de cultivo, tal como el suelo, turba, arena o agua, que tiene plantas plantadas en el mismo, especialmente cuando las plantas son las que son vulnerables a las plagas descritas en el presente documento.

50 La composición puede, por ejemplo, aplicarse mediante riego, pulverización, aplicación directa en dicho medio de cultivo antes de plantar dichas plantas e impregnar toallas, toallitas, tejidos y similares con dicha composición antes de su uso en contacto con la planta o material vegetal a proteger

También se desvela el uso de un agente de control biológico en la fabricación de una composición pesticida para prevenir, mejorar, inhibir, eliminar o retrasar la aparición de infecciones o infestaciones por plagas. El agente de control biológico puede comprender al menos uno de:

- 55 a. Células de *Pseudozyma aphidis* o cualquier aislado o mutante de las mismas;
- b. esporas de *Pseudozyma aphidis*;
- c. medio de cultivo condicionado de *Pseudozyma aphidis*;
- d. compuestos secretados de *Pseudozyma aphidis*;

- e. cualquier extracto o preparación de cualquiera de (a) a (d); y
- f. una combinación de al menos dos de los agentes de control biológico definidos en de (a) a (e).

5 El agente de control biológico desvelado en el presente documento se puede usar para preparar composiciones pesticidas, específicamente, composiciones bactericidas, para tratar, prevenir, mejorar, inhibir, eliminar o retrasar la aparición de infecciones o infestaciones bacterianas.

Estas infecciones bacterianas pueden estar causadas por al menos una de: *Clavibacter michiganensis*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Erwinia amylovora*, *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, *Streptomyces scabies*, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* y *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*.

10 El uso del agente de control biológico puede resultar en una composición fungicida para tratar, prevenir, mejorar, inhibir, eliminar o retrasar la aparición de infecciones o infestaciones por hongos.

Esta composición fungicida puede ser particularmente adecuada para tratar infecciones por hongos causadas por al menos uno de: *Botrytis cinerea*, *Penicillium digitatum*, *Alternaria brassicicola*, *Uromyces appendiculatus*, *Leveillula taurica*, *Sclerotinia sclerotiorum* y *Puccinia coronata*.

15 Más que simplemente actuar contra patógenos de plantas, la composición pesticida producida usando el agente de control biológico confiere resistencia en las plantas contra las infecciones o infestaciones de plagas.

También se desvela el uso del agente de control biológico en la preparación de cualquier composición pesticida, por ejemplo, una composición antiviral, una composición antinemátodo o cualquier composición que pueda usarse para tratar afecciones patológicas asociadas a insectos.

20 La composición pesticida producida usando el agente de control biológico puede regular por aumento o inducir la expresión de genes relacionados con el sistema inmunológico de la planta. Específicamente, dichos genes relacionados con el sistema inmunitario de la planta codifican al menos una de la familia de proteínas relacionadas con la patogenicidad y la familia de las defensinas.

Los genes relacionados con el sistema inmunitario pueden codificar al menos uno de la familia de proteínas relacionadas con la patogenicidad y la familia de las defensinas.

25 El miembro de la familia de proteínas relacionadas con la patogenicidad puede ser PR1 y el miembro de la familia de las defensinas puede ser PDF1.2.

La composición pesticida puede inducir la expresión de PR1 en dicha planta.

La composición pesticida puede inducir la expresión de PDF1.2 en dicha planta.

30 La composición pesticida puede inducir la expresión de PR1 y PDF1.2 en dicha planta, opcionalmente, dicha composición induce la expresión de al menos un gen adicional relacionado con el sistema inmunitario.

Adicionalmente, esta composición también es adecuada para prevenir, mejorar, inhibir, eliminar o retrasar la aparición de infecciones o infestaciones por plagas en productos agrícolas e industriales, lo que prolonga la vida útil o el tiempo de almacenamiento de dicho producto.

También se desvela la preparación de una composición para promover el crecimiento en plantas.

35 Aún más, también se desvela un agente de control biológico como se ha definido anteriormente, para su uso en el tratamiento, prevención, mejora, inhibición, eliminación o retraso de la aparición de infecciones o infestaciones por plagas. Específicamente, en el tratamiento, prevención, mejora, inhibición, eliminación o retraso de la aparición de infecciones o infestaciones bacterianas, fúngicas o víricas.

40 También se desvela un agente de control biológico como se ha definido anteriormente, para su uso en conferir resistencia en plantas contra infecciones o infestaciones de plagas.

También se desvela un agente de control biológico como se ha definido anteriormente, para su uso para prevenir, mejorar, inhibir, eliminar o retrasar la aparición de infecciones o infestaciones por plagas en productos agrícolas e industriales, lo que prolonga la vida útil o el tiempo de almacenamiento de dicho producto.

45 Aún más se desvela un agente de control biológico como se ha definido anteriormente, para su uso en la promoción del crecimiento en plantas.

Un aspecto adicional de la invención se refiere a una composición para su uso para tratar, prevenir, mejorar, inhibir, eliminar o retrasar la aparición de infestaciones por hongos o infestaciones en seres humanos o ganado.

50 Divulgado y descrito, debe entenderse que la presente invención o ha de limitarse a los ejemplos concretos, etapas de los procedimientos, y composiciones desveladas en el presente documento dado que tales etapas de procedimientos y composiciones pueden variar algo. También debe entenderse que la terminología usada en el

presente documento se usa con el fin de describir únicamente formas de realización concretas y no se pretende que sean limitantes, ya que el ámbito de la presente invención solo estará limitado por las reivindicaciones adjuntas y equivalentes de las mismas.

5 Debe destacarse que, tal como se usa en la presente memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "uno/a" y "el/la", incluyen las referencias plurales salvo que el contexto indique claramente otra cosa.

10 A lo largo de esta especificación y los ejemplos y reivindicaciones que siguen, a menos que el contexto requiera otra cosa, la palabra "comprenden" y variaciones tales como "comprende" y "que comprende", se entenderá que implican la inclusión de un número entero o etapa o grupo de números enteros indicados o etapas, pero no la exclusión de ningún otro número entero o etapa o grupo de números enteros.

### **Ejemplos**

15 Se hace ahora referencia a los siguientes ejemplos, que junto con las descripciones anteriores, ilustran algunas realizaciones de la invención de una manera no limitativa. En general, la nomenclatura utilizada en el presente documento y en los procedimientos de laboratorio utilizados en la presente invención incluyen técnicas moleculares, bioquímicas, microbiológicas, y técnicas de ADN recombinante. Dichas técnicas se explican ampliamente en las referencias. Véanse, por ejemplo, "Molecular Cloning: A laboratory Manual" Sambrook y col., (1989); "Current Protocols in Molecular Biology" Volúmenes I-III Ausubel, R. M., ed. (1994); Ausubel y col., "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning", John Wiley, Sons, New York (1988); Watson y col., "Recombinant DNA", Scientific American Books, Nueva York; Birren y col., (eds) "Genome Analysis: A Laboratory Manual Series", Vols. 1 -4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York (1998). "Nucleic Acid Hybridization" Hames, B. D. y Higgins S. J., eds. (1985); "Transcription and Translation" Hames, B. D. y Higgins S. J., Eds. (1984); "Immobilized Cells and Enzymes" IRL Press, (1986); "A Practical Guide to Molecular Cloning" Perbal, B., (1984) y "Methods in Enzymology" Vol. 1 -317, Academic Press; "PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications", Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak y col., "Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual" CSHL Press (1996). Otras referencias generales se proporcionan a lo largo del presente documento. Se considera que los procedimientos de dichos documentos son bien conocidos en la materia y se proporcionan para la comodidad del lector.

### **Materiales**

30 Agar dextrosa de patata (Difco)  
Caldo dextrosa de patata (Difco)  
medio de agar nutritivo (Difco)

### **Equipos y kits**

35 Kit de extracción EZ Fungal DNA (Eisenberg Bros. Ltd., Israel)  
Kit Qiagen RNeasy (Invitrogen, San Diego, CA)  
kit de síntesis de ADNc de primera cadena EZ (Biological industries, Israel)  
Fermentador multigen (Nuevo Brunswick)  
Placas Biolog SF-N (Biolog, Hayward, CA, EE. UU.)  
cartuchos Sep-Pak C18 (Waters)  
40 Evaporador rotatorio (Buchi, Flawil, Suiza)  
E5150 Sputter Coater (Polaron Equipment Ltd., War-ford Hertfordshire WD1, Reino Unido)  
Microscopio electrónico de barrido (JSM-5410LV; JEOL Ltd, Tokio, Japón)

### **Procedimientos experimentales**

#### Cultivo de *P. aphidis*

45 El aislado L12 de *P. aphidis* se mantuvo en cultivo sólido en agar de dextrosa (PDA) de patata a 26 °C y se transfirió a medio fresco cada mes. Los cultivos líquidos se mantuvieron en caldo de dextrosa de patata (PDB) durante 7-10 días a 26 °C en un agitador rotatorio a 150 rpm. Después de 10 días en cultivo líquido, se obtuvieron 10<sup>8</sup> conidios/ml.

#### Extracción de ADN

50 Las células se cultivaron en PDB en un agitador rotatorio (150 rpm) a 26 °C. La biomasa fúngica se centrifugó a 10.000 rpm durante 20 minutos y el medio de cultivo se descartó. Las células fúngicas se lavaron dos veces con agua destilada estéril y se centrifugaron durante 20 minutos adicionales a 10.000 rpm. El agua se descartó y la biomasa fúngica se transfirió a microtubos Eppendorf estériles de 1,5 ml y se liofilizó. El ADN genómico se preparó a partir de 10 mg liofilizados de material fúngico utilizando el kit de extracción de ADN EZ Fungal según las instrucciones del fabricante.

#### Secuencia de ADN

El ADN extraído se usó para la PCR con cebadores específicos para todas las ITS ITS1f 5'-

CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3' (también indicado por la SEQ ID NO.5) e ITS4r 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3', (también indicado por la SEQ ID NO. 6). Las reacciones de PCR se llevaron a cabo mediante el sistema de ADN polimerasa Readymix *Taq* (Sigma) en volúmenes de 25  $\mu$ l y 1  $\mu$ l del ADN molde. Las amplificaciones se realizaron en un termociclador (BioRad Inc., Hercules, CA) programado para una etapa de desnaturalización inicial a 95 °C durante 3 minutos, 35 ciclos a 92 °C durante 30 s, 58 (ITS) o 52 °C (nSSU) durante 30 s y 72 °C durante 1 min. Las amplificaciones se completaron con una extensión final de 10 minutos a 72 °C. Las bandas amplificadas se enviaron a secuenciación y las secuencias se alinearon con las bases de datos. Las secuencias se presentan en la Figura 2 y se indican como SEQ ID NO.: 7, 8, 9 Y 10, correspondiente a L12, *P. aphidis*, *P. rogulosa* y *P. Antarctica*, respectivamente.

#### 10 Aislamiento de ARN y análisis por RT-PCR

El ARN total se aisló de plantas de tomate o *Arabidopsis* no tratadas y de plantas 10 días después del tratamiento con 10<sup>8</sup> esporas de *P. aphidis*/ml con el kit Qiagen RNeasy según las instrucciones del fabricante. El tratamiento con DNasa se realizó en columnas RNeasy Qiagen, según las instrucciones de fabricación (Invitrogen, San Diego, CA). 1  $\mu$ g de ARN total se transcribió de forma inversa con el kit de síntesis de ADNc de primera cadena EZ-. La RT-PCR se realizó utilizando el programa de termociclado de la siguiente manera: 96 °C durante 2 min; 27-33 ciclos de 95 °C durante 15 segundos, 55 °C durante 20 segundos y 72 °C durante 30 segundos. Los cebadores fueron los siguientes: LePR1F-5' TCTTGAGGCCCCAAAATTC 3' (indicado como la SEQ ID NO.: 1); LePR1R-5' ATAGTCTGGCCTCTCGGACA 3' (indicado como la SEQ ID NO.: 2); LeActineF- 5' AGGCACACAGGTGTTATGGT 3' (indicado como la SEQ ID NO.: 3) y LeActineR- 5' AGCAACTCGAAGCTCATTGT 3' (indicado como la SEQ ID NO.: 4), LePIN1F-5' CTT CTTCCAATTCCTTT G 3' (indicado como la SEQ ID NO.: 11); y LePINIR-5' TGTTTTCTTCGCACATC 3' (indicado como la SEQ ID NO.: 12); AtPR1F- 5' GCCCACAAGATTATCTAAGGG 3' (indicado como la SEQ ID NO.: 13); y AtPR1R-5' ACCTCCTGCATATGATGCTCCT 3' (indicado como la SEQ ID NO.: 14); AtPDF1.2F-TCATGGCTAAGTTTGCTTCC (indicado como la SEQ ID NO.: 15); y PDF1.2R-5 'AATACACACGATTTAGCACC 3' (indicado como la SEQ ID NO.: 16).

#### 25 Aislamiento de la fracción secretada por *P. aphidis* para ensayos de inhibición *in vitro*

*P. aphidis* se colocó en un PDA cubierto con un tubo de diálisis y se incubó a 26 °C durante 10 días. Luego se retiró el tubo que contenía los hongos y se usaron las placas con la fracción secretada por *P. aphidis* para los ensayos de inhibición con diferentes patógenos fúngicos. Las placas se inocularon con los diferentes patógenos. se incubaron a su temperatura óptima y su germinación de esporas y el crecimiento lineal hifal se midió durante varios días. Además, los metabolitos se extrajeron del filtrado de cultivo de PDB utilizando acetato de etilo y hexano. Más específicamente, *P. aphidis* se cultivó en medio PDB a 26 °C durante 10 días en matraces Erlenmeyer a una agitación constante de 150 rpm. Las células fúngicas se centrifugaron (20 min a 10.000 rpm). El sobrenadante, que consiste en filtrado de cultivo, se tituló a pH 2,0 usando HCl 1N y se extrajo con un volumen equivalente de acetato de etilo usando embudos de separación. La fracción de acetato de etilo se recogió y se evaporó en un evaporador rotatorio a 42 °C [Paz, Z., y col., (2007) J. apl. Microbiol. 103(6):2570-2579]. Cuando se usó hexano, la fracción de acetato de etilo recolectada se volvió a extraer con hexano y se evaporó en un evaporador rotatorio a 42 °C como se ha indicado anteriormente. La fracción seca se reconstituyó en metanol y se usó para experimentos *in vitro* después de la aplicación en discos de papel Whatman (6 mm de diámetro). Los discos se colocaron en el centro de las placas de PDA inoculadas con las diferentes bacterias.

#### 40 Propagación de plantas y patógenos

*Botrytis cinerea* (B05.10), *Penicillium digitatum*, *Alternaria brassicicola* y *Sclerotinia sclerotiorum* se cultivaron en medio PDA a 22-27 °C con una iluminación diaria de 12 horas. *Leveillula taurica* se mantuvo en plantas de pimiento a 25 °C. *Puccinia graminis* y *Uromyces appendiculatus* se mantuvieron en plantas de trigo y judías, respectivamente, a 25 °C.

*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (CMM44), *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, *X. campestris* pv. *campestris*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Erwinia amylovora*, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, *P. syringae* pv. *Lachrymans* y *Streptomyces scabies* se cultivaron en medio de agar nutriente (NA) en completa oscuridad a 28-37 °C. Todos los patógenos son de colecciones locales.

Las plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum*, ecotipo 870) se cultivaron a 25 °C y 40 % de humedad relativa en el invernadero.

#### 50 Inhibición de *B. cinerea* en plantas de tomate

Para examinar la inhibición de *B. cinerea* en hojas desprendidas y en plantas enteras, las hojas/plantas de tomate se pulverizaron con diferentes concentraciones (10<sup>4</sup> y 10<sup>8</sup> esporas/ml) de *P. aphidis* para fluir y se dejaron establecer durante 3 días sobre las hojas/plantas. Luego se inocularon las plantas con el patógeno (un total de 15.000 esporas) y se monitorizaron los síntomas de la enfermedad en las plantas tratadas y las plantas de control tratadas con agua.

#### 55 Inhibición de *C. michiganensis* en plantas de tomate

Las plantas de tomate se pulverizaron con diferentes concentraciones (10<sup>4</sup> y 10<sup>8</sup> esporas/ml) de *P. aphidis*. Se permitió

que el *P. aphidis* estableciera durante 2-3 días en las plantas, después de lo cual se inocularon con *C. michiganensis* cortando la primera hoja con tijeras sumergidas en suspensión bacteriana ( $DO^{600} \sim 0,9$ ). Se monitorizaron los síntomas de la enfermedad en las plantas tratadas y en las plantas de control rociadas con agua. Algunos experimentos incluyeron aplicaciones adicionales de *P. aphidis* después de la inoculación de *C. michiganensis* como se describe en el Ejemplo 6.

#### Inhibición de *Sphaerotheca fuliginea* en plantas de pepino

Las plántulas de pepino (*Cucumis sativus* cultivar 'Saphi') se rociaron con esporas de *P. aphidis* ( $10^8$  esporas/ml) o con agua (diez plántulas para cada tratamiento) tres días antes de la inoculación con *Sphaerotheca fuliginea* y la infección se clasificó 11, 12 y 16 días después de la inoculación. Para la inoculación, las esporas de una planta donante portadora de inóculo se soplaron directamente en plántulas sanas de cuatro lados. La infección se puntuó mediante la determinación del porcentaje de cobertura de hojas con síntomas de oídio utilizando escalas del 1 al 5 %, 5-25 %, 25-50 % y 50-100 %.

#### Inhibición de la descomposición de las uvas posrecolección

Las uvas Thompson sin semillas de la viña de Yuval en Moshav Lachis se cosecharon y empaquetaron en racimos de 1,25 kg en 3 grupos (32 réplicas). Un día después, las uvas se rociaron con agua o *P. aphidis* ( $10^6$  o  $10^8$  esporas/ml) y se transfirieron al almacenamiento a 0 °C. 2,5 meses después, las uvas se transfirieron a 20 °C durante tres días y se monitorizó la descomposición. La cantidad de uvas en descomposición (en gramos) se determinó para cada réplica. Debido a la variabilidad de la muestra, los resultados de dos réplicas consecutivas se agruparon para obtener un tamaño de muestra de 2,5 kg. Se determinó la descomposición promedio y se calculó la importancia mediante el uso de la prueba posthoc de Student-Newman Keuls a un valor de p de 0,01.

#### Microscopio de electrones

Para preservar y examinar las esporas y las hifas de hongos en las hojas de *Arabidopsis*, se empleó un procedimiento de fijación de vapor en este estudio como se describe en Kim, (2007) [Kim, K.W. (2007), J. Phytopathology 156:125-128] con cambios menores. Las hojas de *Arabidopsis* se unieron en una campana extractora de humos bien ventilada a un vial cuatro días después del tratamiento con *P. aphidis*. Las muestras se expusieron en un vial cerrado al vapor de tetróxido de osmio al 2 % (p/v) durante al menos 2 horas y luego permanecieron en la campana extractora durante toda la noche. Los cuadrados (cada uno de 5 x 5 mm<sup>2</sup>) de hojas osmicadas se cortaron con una cuchilla de afeitar y se montaron en un trozo de metal (10 mm de diámetro). Se recubrieron con pulverización catódica con oro (aproximadamente 30 nm de grosor) utilizando un dispositivo de recubrimiento por pulverización catódica E5150 y se examinaron con un microscopio electrónico de barrido a un voltaje de aceleración de 20 kV.

#### Ensayo de la actividad biológica de compuestos volátiles emitidos

*P. aphidis* se cultivó en PDA en la mitad de una placa de Petri compartimentada producida comercialmente durante 10 días a 25 °C antes de la adición del tapón micelial de *B. cinerea* en la otra mitad de la placa de Petri compartimentada. Los diámetros de colonias de *B. cinerea* se registraron hasta 4 días después de la inoculación y se compararon con el crecimiento en placas de control en ausencia de *P. aphidis*.

#### Actividad celulosa

*P. aphidis* se cultivó en placas de agar de agua corriente (8 %) cubiertas con membrana de celulosa esterilizada en autoclave. El número de células se registró siete días después de la inoculación.

#### Exposición de *P. aphidis* a UV

Las placas de PDA se inocularon con  $10^8$  células de *P. aphidis* y se sometieron a exposición a UV durante diferentes períodos (0, 10, 20 y 30 min). Las placas se transfirieron a la incubadora a 25 °C y se registraron después de 72 h con una cámara digital.

### **Ejemplo 1**

#### ***Asilamiento de P. aphidis***

Los inventores aislaron una cepa de *P. aphidis* (aislado L12) de hojas de fresa. El aislado de L12 se asoció con el colapso de las colonias de oídio que se ve en la Figura 1A. El aislado de L12 se identificó como *P. aphidis* usando cebadores específicos para la región de ADNr completa del espaciador transcrito interno (ITS1) y para la secuencia parcial de la subunidad grande mitocondrial (mtLSU) y la subunidad pequeña nuclear (nSSU) como se describe en los procedimientos experimentales anteriores [Avis, T.J., y col., (2001) Phytopathology 91(3):249-254]. Las secuencias mostraron una identidad del 100 % con *P. aphidis*, como se muestra en la Tabla 1 y la Figura 2.

**Tabla 1: Identificación de secuencias de *P. aphidis***

	% de similitud con <i>P. aphidis</i>
ITS <sup>a,b</sup>	100
nSSU <sup>b</sup>	100
mtLSU <sup>a,b</sup>	100
<sup>aa</sup> realizado por Boekhout Teun, realizado por Levy Maggie como se describe en Avis y col., 2001	

**Ejemplo 2*****P. aphidis* es un hongo de tipo levadura epífita**

Los inventores caracterizan aún más el aislado de L12. La microscopía electrónica de barrido que se muestra en la Figura 3) reveló que el aislado de L12 de *P. aphidis* es un hongo epífita dimórfico. El hongo puede tener una forma similar a levadura (Fig. 3E) y una estructura similar a un sinemata (Fig. 3C) en PDA y también pueden formar hifas (Fig. 3D). El hongo aislado puede crecer y cubrir la superficie de las hojas de tomate y *Arabidopsis*, como se muestra en las Figuras 3F, 3I y 3J. Seccionando hojas inoculadas con *P. aphidis* no reveló ninguna estructura fúngica dentro del tejido. Los inventores concluyeron que, en las condiciones experimentales específicas utilizadas, *P. aphidis* solo se encuentra como epífita; sin embargo, no puede ser excluido como endófito ya que *P. aphidis* se identificó en la superficie de las hojas después de la esterilización de dicha superficie con hipoclorito de sodio al 1 % e incluso con llama directa. Adicionalmente, como muestra claramente la Figura 4, *P. aphidis* sobrevivió hasta 30 minutos de exposición a los rayos UV, y por lo tanto, no se puede excluir que los hongos identificados en las superficies de las hojas esterilizadas con hipoclorito y con llama resistieron estos duros procedimientos.

**Ejemplo 3****Temperatura óptima para el crecimiento del aislado L12 de *P. aphidis***

Se utilizó un medio común de agar de dextrosa de patata (PDA) para estudiar el crecimiento de *P. aphidis* a varias temperaturas. Se determinó un intervalo de 25 a 28 °C como el intervalo de temperatura óptimo para el crecimiento lineal de colonias (que se muestra en las Figuras 5A y 5C) y las secreciones de hongos (que se muestran en las Figuras 5B y 5C).

**Ejemplo 4*****P. aphidis* secreta celulasa**

Para verificar que *P. aphidis* secreta celulasa, los inventores incubaron el hongo en placas de agar con agua suplementadas con membrana de celulosa. Como muestra la Figura 6, *P. aphidis* creció mejor en placas suplementadas con celulosa, lo que sugiere que secreta celulasa.

**Ejemplo 5****Colonización, proliferación y mantenimiento de *P. aphidis* en plantas de tomate**

Los inventores examinaron la capacidad de *P. aphidis* para colonizar y proliferar en plantas de tomate. Las esporas de *P. aphidis* se rociaron sobre las plantas y se determinó la dinámica de su población. Las hojas se visualizaron bajo un microscopio óptico para verificar la presencia de esporas de *P. aphidis*, y se aplicaron muestras de hojas a placas de PDA para verificar la viabilidad. *P. aphidis* se observó en las hojas por debajo y por encima del punto de pulverización y también sobre las nuevas hojas emergentes. Se descubrió *P. aphidis* en todas las hojas hasta 21 días después de la aplicación.

**Ejemplo 6****Patogenicidad de *P. aphidis***

La aplicación foliar de *P. aphidis* en dos concentraciones diferentes ( $10^4$  y  $10^8$  esporas/ml) en plantas de tomate y *Arabidopsis* y hojas desprendidas no mostró evidencia de patogenicidad o síntomas de sensibilidad de la planta hasta 4 semanas después de la aplicación. De forma similar, no hubo evidencia de patología asociada con las plantas de tomate después de empapar el sistema radicular con la suspensión del agente de control biológico (por ejemplo, clorosis o cualquier otro síntoma, datos no mostrados).

**Ejemplo 7****Impacto *in vitro* de las secreciones de *P. aphidis* en patógenos de plantas****Impacto de las secreciones de *P. aphidis* en patógenos fúngicos**

Se muestra en la Figura 1B y en la Figura 3A, el aislado de L12 de *P. aphidis* secreta metabolitos extracelulares de color rosado. Se encontró que esas secreciones inhiben la germinación de esporas de varios patógenos fúngicos *in*

*vitro*, como se demuestra en la Figura 7A. Inhibieron completamente la germinación de esporas del agente causante de moho gris *Botrytis cinerea*, de *Puccinia graminis*, que causa la roya del tallo de los cereales pequeños (trigo, cebada, avena y centeno) y de *Penicillium digitatum* que causa el moho verde en los cítricos. *Alternaria brassicicola*, que causa la mancha foliar oscura de Brassica en la mayoría de las especies de Brassica, fue inhibida en un 85 a 90 %, *Uromyces appendiculatus*, el agente casual de la roya de la judía, fue inhibida en un 70 % y *Leveillula taurica*, que causa el oídio en los tomates y el pimiento, se inhibió en un 45 %. Las secreciones también inhibieron completamente la germinación esclerotial de *Sclerotinia sclerotiorum*, mientras que solo inhibieron ligeramente (10 %) la germinación de esporas en *Puccinia coronata*, el agente causal de la roya de la corona de avena y la roya de la corona de cebada, mostrado en la Figura 7A.

La inhibición de la germinación de esclerocios de *Sclerotinia sclerotiorum* y el crecimiento lineal de micelio de *B. cinerea*, *A. brassicicola* y *S. sclerotiorum* persistió incluso cuando se utilizaron las secreciones de *P. aphidis* autoclavadas (datos no mostrados). En un ensayo adicional, los inventores utilizaron placas de Petri divididas con *P. aphidis* limitada a un lado de dichas placas, y *B. cinerea*, *A. Brassicicola* o *S. sclerotiorum* en la otra. Tal como se representa en la figura 8, no se detectó inhibición de patógenos en estas condiciones, lo que sugiere que las secreciones responsables de la inhibición de patógenos no son volátiles.

### Impacto de las secreciones de *P. aphidis* en patógenos bacterianos

El efecto inhibitorio del crecimiento de los extractos de *P. aphidis* en diversas bacterias se determinó midiendo los halos de descomposición alrededor de los filtros saturados con acetato de etilo o extractos de hexano de metabolitos de filtrado de aislamiento de L12 de *P. aphidis* (como se demuestra en la Figura 7B). Los inventores encontraron inhibición de varios patógenos bacterianos *in vitro* utilizando extracto de acetato de etilo, como se ilustra en la Figura 7B. La inhibición más significativa fue la de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (26 mm), que causa el cancro bacteriano de las plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum*), y de *Agrobacterium tumefaciens* (25 mm), que causa la enfermedad de las agallas de la corona. Otros patógenos bacterianos *Erwinia amylovora*, *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, *Streptomyces scabies*, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* and *Xanthomonas capestris* pv. *vesicatoria* mostraron una inhibición moderada (7-15 mm).

La inhibición de varios patógenos bacterianos y fúngicos que utilizan extracto de hexano se muestra en la Figura 7C. En el caso del hexano, la inhibición más significativa fue también de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* (24 mm), y de *X. capestris* pv. *vesicatoria* (15 mm). Otros patógenos bacterianos tales como *A. tumefaciens*, *E. amylovora*, *P. syringae* pv. *Tomate* y *X. campestris* pv. *Campestris* mostraron una inhibición moderada (9-12 mm). Aún más, los extractos de hexano inhibieron los hongos analizados de *B. cinerea* (13 mm) y *A. brassicicola* (19 mm).

### Ejemplo 8

#### Impacto de *P. aphidis* en la infección por hongos en hojas desprendidas y en la planta

Las hojas de tomate desprendidas se rociaron con *P. aphidis* ( $10^4$  o  $10^8$  esporas/ml) tres días antes de la inoculación con *B. cinerea* (1.600 o 16.000 esporas en total). Las figuras 9A y 9B muestran que la infección se redujo significativamente en un 55 a 70 % y en casi un 100 % cuando las hojas desprendidas se rociaron con  $10^4$  o  $10^8$  esporas/ml de *P. aphidis*, respectivamente, en comparación con las hojas rociadas con agua. La aplicación de *P. aphidis* en hojas desprendidas infectadas con *B. cinerea* detuvo la propagación de la infección (Fig. 9E).

Como se muestra en la Figura 9C, la aplicación de  $10^4$  esporas de *P. aphidis*/ml o  $10^8$  esporas de *P. aphidis*/ml a las plantas de tomate en el invernadero 3 días antes de la inoculación con *B. cinerea* redujo la infección en un 15 a 50 % y en un 45 a 80 %, respectivamente. El autoclavado de *P. aphidis* abolió los efectos inhibitorios de la infección por *B. cinerea*, como se ilustra en la Figura 9D.

La Figura 9F muestra el efecto de las esporas de oídio de *P. aphidis* en las plántulas de pepino. La aplicación de  $10^8$  esporas de *P. aphidis*/ml a plántulas de pepino en el invernadero 3 días antes de la inoculación con un oídio que causa hongos *Sphaerotheca fuliginea* redujo la infección en un 77 a 97 %.

### Ejemplo 9

#### Actividad de control biológico de *C. michiganensis* por *P. aphidis* en plantas

La aplicación de  $10^8$  esporas de *P. aphidis*/ml a plantas de tomate en el invernadero tres días antes de la inoculación con *C. michiganensis* fue de 27 a 53 % efectiva para prevenir los síntomas de *C. michiganensis* (Fig. 10A), así, se demuestra un potencial de protección del agente de control biológico de la invención. Cuando los inventores añadieron tres aplicaciones más, una vez a la semana, tras la infección con *C. michiganensis*, se obtuvo una reducción de síntomas del 70 al 80 %. Como se ilustra en la Figura 10B, los inventores también observaron una recuperación del 50 % de las plantas después de mostrar los primeros síntomas. Parece que este es el primer informe sobre la capacidad de recuperación del agente de control biológico en plantas infectadas. Los mecanismos por los cuales las plantas pueden recuperarse son aún desconocidos. Sin pretender quedar vinculados a teoría alguna, los inventores especulan que existe una correlación entre la recuperación y la resistencia inducida. Para evaluar esta hipótesis, un análisis del curso de tiempo de la inducción del gen PR se lleva a cabo antes, durante y después de la recuperación.

**Ejemplo 10****Actividad de control biológico de *P. aphidis* en la descomposición de las uvas después de la recolección**

Las uvas sin semillas Thompson se trataron con agua (control) o con *P. aphidis* ( $10^6$  o  $10^8$  esporas/ml) un día después de la recolección y se transfirieron a un ambiente de 0 °C durante 2,5 meses de almacenamiento. Tres días después de que las uvas estuvieron fuera de almacenamiento y se mantuvieron a 20 °C, las uvas tratadas con *P. aphidis* mostraron un 50 % menos de uvas en descomposición. Los resultados se presentan en la Tabla 2 que se expone a continuación.

**Tabla 2: Decaimiento en uvas después de la recolección**

Tratamiento	Decaimiento (%)	SE	SNK
PA $10^8$	10,8	1,2	b
PA $10^6$	10,0	2,2	b
Control	19,2	1,0	a

Abreviaturas: SNK (prueba posthoc de Student-Newman Keuls,  $P = 0,01$ ); SE (error estándar; PA, *P. aphidis*)

**Ejemplo 11*****P. aphidis* induce el crecimiento de las plantas**

Se descubrió que *P. aphidis* promueve el crecimiento de las plantas de tomate. Las plantas de tomate que fueron tratadas con un total de tres aplicaciones (una vez a la semana) con *P. aphidis* fueron un 20 % más altas, pesaban un 30 % más y tenían un 25 % más de hojas que las plantas no tratadas (véanse las Figuras 11A-11C, respectivamente). Las plantas tratadas también eran más leñosas (vertical) y tenían un sistema radicular más grande (datos no mostrados). Sin pretender quedar vinculados a teoría alguna, los inventores especulan que la aplicación de *P. aphidis* mejora la fotosíntesis al reducir la transpiración del agua.

**Ejemplo 12*****P. aphidis* promueve la expresión de genes inmunitarios inducidos**

El tratamiento con *P. aphidis* no solo mejora el crecimiento de las plantas, sino que también induce el sistema inmunológico de la planta. En la Figura 12A se muestra la inducción de la expresión del gen PR1 observada en plantas de tomate 6 y 10 días después de la aplicación foliar de *P. aphidis*, mientras que en plantas tratadas con agua, no se exhibió ninguna inducción. La expresión de PR1 y PDF1.2 también se reguló por aumento en las plantas de *Arabidopsis thaliana* después de la aplicación de *P. aphidis* (Fig. 12B). Cuando los mutantes de *Arabidopsis* se deterioran en señalización de JA *jar1* y en la acumulación y señalización de SA *NahG* y *npr1-1*, respectivamente, se trataron con *P. aphidis*, seguido de inoculación con *B. cinerea*, la inhibición persistió de manera similar a las plantas SV, tal como se muestra en las Figuras 13A, 13B y 13C. Por tanto, parece que la resistencia inducida es independiente de SA, JA y NPR1. Los inventores ahora determinan si los metabolitos extraídos pueden inducir resistencia o controlar la infección de *B. cinerea* en la planta.

**Ejemplo 13****Caracterización de las condiciones necesarias para la producción en masa de *P. aphidis***

Los inventores primero calibran un procedimiento para obtener suficientes inóculos activos para experimentos de laboratorio y de campo. El aislado L12 de *P. aphidis* se cultiva en diferentes medios de crecimiento líquidos a diferentes temperaturas y la concentración de esporas y la actividad se controla en un ensayo biológico contra *B. cinerea*. En experimentos preliminares, los inventores utilizaron el medio común agar de dextrosa de patata (PDA) a varias temperaturas y establecieron de 25 a 28 °C como el intervalo de temperatura óptimo para el diámetro y la secreción de las colonias, tal como se muestra en las Figuras 5A-5C. Cuando los inventores cultivaron los hongos en caldo líquido de dextrosa de patata (PDB) en matraces Erlenmeyer a una agitación constante de 150 rpm, se obtuvieron  $10^8$  conidios/ml después de 10 días a 26 °C. A continuación, diferentes medios líquidos (por ejemplo, dextrosa peptona de malta de levadura, medio de glucosa-peptona, CZAPEX-DOX) se exploran a varias temperaturas utilizando un fermentador Multigen, con el fin de obtener las condiciones óptimas para la producción en masa de esporas y la secreción activa según lo determinado en los bioensayos contra *B. cinerea*. En paralelo, se examina la utilización de diferentes fuentes de carbono de *P. aphidis* en placas Biolog SF-N. Las placas también se utilizan para el bioensayo de actividad aplicando agar de bajo punto de fusión inoculado con esporas de *Agrobacterium tumefaciens* o *B. cinerea* y examinando la inhibición del crecimiento de la secreción de *P. aphidis* en cada fuente de carbono diferente. Sobre la base de esos resultados, se intenta establecer condiciones y medios óptimos para la máxima esporulación y actividad.

**Ejemplo 14****Exploración de *P. aphidis* - interacciones del huésped**

L12 de *P. aphidis* se aisló por primera vez de la superficie de las hojas de fresa y se designó como epífita. Los inventores ahora examinan las condiciones requeridas para el establecimiento de L12 de *P. aphidis* y se extienden sobre las partes aéreas de la planta y su sistema de raíces. Mediante microscopía se controla el tiempo necesario para que los hongos se establezcan en el huésped y su capacidad para propagarse a diferentes partes de la planta. A continuación, los inventores proponen verificar la designación epifítica de L12. Las hojas de tomate se rocían con L12 y se dejan reposar en la planta. La ubicación de los hongos en las partes de las plantas pulverizadas y no pulverizadas y en las secciones transversales después de la esterilización de la superficie se controla. Además, los inventores construyen un aislado L12 fluorescente que expresa GFP como se describe para *P. flocculosa*. Los inventores luego monitorizan el establecimiento de L12-GFP usando un binocular de fluorescencia. Los inventores también usan microscopía confocal para detectar L12-GFP dentro del tejido de la planta. Esto permite estudiar el establecimiento L12 de *P. aphidis* en plantas y determinar si también puede penetrar en la planta y crecer como un endófito.

### Ejemplo 15

#### **Ensayo de fracciones secretadas por *P. aphidis* contra diversos patógenos fúngicos y bacterianos de plantas *in vitro***

En resultados preliminares, Los inventores demostraron que los compuestos secretados de *P. aphidis*, aislado L12, pueden inhibir varios patógenos fúngicos, como se ilustra en la Figura 7A y que los extractos de acetato de etilo de estos compuestos pueden inhibir varios patógenos bacterianos de una manera sensible a la dosis, como se demuestra en la Figura 7B. Los extractos de hexano también inhiben los patógenos bacterianos y fúngicos, como lo demuestra la Figura 7C.

A continuación, la capacidad de control biológico de la fracción secretada por L12 contra el patógeno fúngico *B. cinerea* y el patógeno bacteriano *Clavibacter michiganensis* se exploran más a fondo, y la investigación se extiende a otros patógenos. En primer lugar, los inventores examinan la capacidad de toda la fracción secretada de L12 para inhibir los patógenos *in vitro*. Los inventores utilizan la fracción secretada sembrada sobre PDA cultivando los hongos en un tubo de diálisis que cubre una placa de PDA durante 10 días y luego retirando el tubo con los hongos. Los inventores concentran la fracción secretada del filtrado de cultivo de PDB y examinan el efecto de respuesta a la dosis contra los patógenos. Más específicamente, para obtener la fracción secretada, L12 se cultivan en 1 litro de PDB durante 10 días en la oscuridad con agitación constante (150 rpm), y el cultivo se centrifuga para eliminar los hongos. El filtrado de cultivo se transfiere a través de cartuchos de extracción en fase sólida y se eluye con 1 ml de metanol. La fracción de "filtrado de cultivo" eluido se usa luego para experimentos de bioensayo *in vitro*, primero con *B. cinerea* y *C. michiganensis*, y luego con otros patógenos (por ejemplo, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Oidium lycopersicum*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* y *X. campestris* pv. *campestris*). La fracción eluida se aplica en diferentes concentraciones en discos de filtro de 6 mm que luego se secan en una campana de flujo laminar y se usan en bioensayos de inhibición contra diferentes patógenos en placas en comparación con los discos de filtro con metanol solamente. Como alternativa, la fracción eluida se aplica (a diferentes concentraciones) a placas que contienen medios adecuados para bioensayos con los diferentes patógenos.

Además, los metabolitos se extraen del filtrado de cultivo utilizando acetato de etilo y hexano. El filtrado del cultivo se titula a pH 2,0 con HCl 1 N y la extracción con 100 ml de acetato de etilo se repite tres veces utilizando embudos de separación. Las fracciones de acetato de etilo/hexano se recogen y se evaporan en un evaporador rotatorio a 42 °C [Paz, Z., y col., (2007) J. apl. Microbiol. 103(6):2570-2579]. El filtrado de cultivo de PDB restante se concentra utilizando Sep-Pak C18. Cada una de las fracciones secas se reconstituye con 1 ml de metanol y se usa para experimentos *in vitro* como se ha descrito anteriormente: cada fracción se aplica por separado en diferentes concentraciones en discos de filtro de 6 mm que se secan en una campana de flujo laminar y luego se usan en bioensayos de inhibición contra diferentes patógenos en placas en comparación con los discos de filtro con metanol solamente. Como alternativa, las fracciones se aplican (a diferentes concentraciones) a placas que contienen medios adecuados para bioensayos con los diferentes patógenos. Para verificar si el compuesto activo es sensible al calor, los inventores repiten los experimentos con filtrado de cultivo que se ha hervido antes de la extracción. A continuación, los inventores identifican la fracción activa y posteriormente los compuestos activos.

### Ejemplo 16

#### **Análisis de los efectos de *P. aphidis* contra varios patógenos fúngicos y bacterianos de plantas *in vivo***

En experimentos preliminares presentados en la Figura 9A y 9B, los inventores demostraron la inhibición de L12 de *B. cinerea* en hojas desprendidas y en plantas enteras. Los inventores extienden sus experimentos *in vivo* a otros patógenos (*S. sclerotiorum*, oídio, *X. campestris* pv. *vesicatoria* y *C. michiganensis*). Las plantas de tomate se pulverizan con diferentes concentraciones ( $10^4$ ,  $10^8$  y  $10^{12}$  esporas/ml) de L12, y se permite que el aislado L12 se establezca en las plantas. Las plantas se inoculan con los agentes patógenos anteriores y se monitorizan los síntomas de la enfermedad en comparación con las plantas pulverizadas con agua.

### Ejemplo 17

#### **Aislamiento e identificación del compuesto o compuestos activos de la fracción secretada**

Como se indica en los resultados presentados, L12 de *P. aphidis* tiene un potencial significativo como agente biológico eficiente contra diversos patógenos de plantas. Se requiere una caracterización de las condiciones para la producción eficiente de esporas y la secreción de metabolitos, y la identificación de compuestos activos puede ayudar a desarrollar un agente de control biológico eficiente contra una amplia gama de patógenos.

- 5 Para aislar e identificar el compuesto o compuestos activos de la fracción secretada, L12 se cultiva en PDB durante 10 días en la oscuridad con agitación constante (150 rpm). Se obtiene un extracto crudo de L12 como se ha descrito anteriormente, y las fracciones secas se reconstituyen en 1:9 (v/v) de metanol:agua y se someten a cromatografía. La separación por cromatografía líquida en fase inversa (RPLC) se realiza en el extracto crudo de acuerdo con [Paz, Z., y col., (2007) J. apl. Microbiol. 103(6):2570-2579]. Cada uno de los compuestos detectados se recolecta y se realiza el bioensayo contra *B. cinerea*. El compuesto o compuestos activos se identifican después usando HPLC-MS y, si es necesario, RMN.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Yissum Research Development Company of The Hebrew university of Jerusalem Ltd
- 15 <120> PSEUDOZYMA APHIDIS COMO AGENTE DE CONTROL BIOLÓGICO CONTRA VARIOS PATÓGENOS VEGETALES
- <130> 28477/WO/11
- <160> 16
- <170> PatentIn versión 3.3
- 20 <210> 1  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> artificial
- <220>  
<223> LePR1F
- 25 <400> 1  
tctgtgagg cccaaaattc 20
- <210> 2  
<211> 20  
<212> ADN  
30 <213> artificial
- <220>  
<223> LePR1R
- <400> 2  
atagtctggc ctctcgaca 20
- 35 <210> 3  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Artificial
- <220>  
40 <223> Le ActineF
- <400> 3  
aggcacacag ggttatggt 20
- <210> 4  
<211> 20  
45 <212> ADN  
<213> Artificial
- <220>  
<223> leActineR
- <400> 4  
50 agcaactcga agctcattgt 20

ES 2 740 023 T3

<210> 5  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 5 <220>  
 <223> Cebador directo ITS  
 <400> 5  
 cttggtcatt tagaggaagt aa 22  
 <210> 6  
 10 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> ITS cebador inverso  
 15 <400> 6  
 tcctccgctt attgatatgc 20  
 <210> 7  
 <211> 191  
 <212> ADN  
 20 <213> Desconocido  
 <220>  
 <223> Aislado L12  
 <400> 7  
 tttc gatgaa aac tttttt cttg aggtgt ggct cgcacc tgtcta acta aatc gagcta 60  
 ccac atttta acac ggttgc atcgg ttggc tgtcaa acag tgcgc gcggc gattt atttc 120  
 gcct cccgc gcatt gccga gacgg tgcac atttacc aaa aacact gttg atacc atagg 180  
 atttga acgt a 191  
 25 <210> 8  
 <211> 191  
 <212> ADN  
 <213> Pseudozyma aphidis  
 <400> 8  
 tttc gatgaa aac tttttt cttg aggtgt ggct cgcacc tgtcta acta aatc gagcta 60  
 ccac atttta acac ggttgc atcgg ttggc tgtcaa acag tgcgc gcggc gattt atttc 120  
 gcct cccgc gcatt gccga gacgg tgcac atttacc aaa aacact gttg atacc atagg 180  
 atttga acgt a 191  
 30 <210> 9  
 <211> 187  
 <212> ADN  
 <213> Pseudozyma rogulosa  
 35 <400> 9  
 tttc gatgaa aac tttttt cttg aggtgt tgct cgcacc tgtcta acta aatc gagcta 60  
 ccac atttta acac ggttgc atcgg ttggc tgtcaa acag tgcgc gcggc gattt atttc 120  
 gcc caccgc cttg cgaga cgg tgcacat ttacc aaaaa cactg ttgat accat aggat 180  
 ttga acg 187

ES 2 740 023 T3

<210> 10  
 <211> 189  
 <212> ADN  
 <213> Pseudozyma antarctica

5 <400> 10

tttcgatgaa aacctttttt cttgaggtgt ggctcgcacc tgtcctaacta aatcgagcta 60  
 ccacatttta acacggttgc atcggttggc tgtcaaacag tgcgcgcggc gaattcattt 120  
 tcgcccgcgc tctgcgagac ggtcgacact ttaccaaaaa cactgttgat accataggat 180  
 ttgaacgta 189

<210> 11  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Cebador LePIN1F

10 <400> 11

cttcttccaa cttcctt 18

<210> 12  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Cebador LePIN1R

15 <400> 12

tgtttcctt cgcacatc 18

<210> 13  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Cebador AtPR1F

20 <400> 13

gcccacaaga ttatctaagg g 21

<210> 14  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Cebador AtPR1R

25 <400> 14

acctcctgca tatgatgctc ct 22

<210> 15  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Cebador AtPDF1.2F

30 <400> 15

tcatggctaa gtttgcttc 20

<210> 16  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Cebador PDF1.2R

35 <400> 16

aatacacacg atttagcacc 20

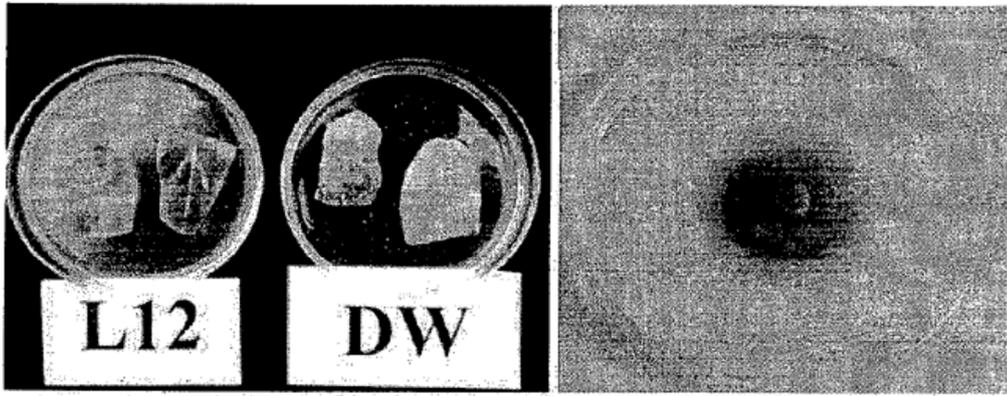
40

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Un procedimiento para tratar, prevenir, inhibir, eliminar o retrasar la aparición de infecciones o infestaciones bacterianas, fúngicas o de plagas en una planta o en un material vegetal, que comprende la etapa de aplicar en una planta, a un material vegetal o en las proximidades de dicha planta o material vegetal, un agente de control biológico o una composición que lo comprenda, dicho agente de control biológico comprende al menos uno de:
- 10 a. células de *Pseudozyma aphidis* o cualquier aislado de las mismas;  
 b. esporas de *Pseudozyma aphidis*;  
 c. medio de cultivo condicionado de *Pseudozyma aphidis*;  
 d. compuestos secretados de *Pseudozyma aphidis*;  
 e. extractos de cualquiera de (a) a (d); y  
 f. una combinación de al menos dos de los agentes de control biológico definidos en de (a) a (e).
2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho procedimiento es para tratar, inhibir, eliminar o retrasar la aparición de infecciones o infestaciones bacterianas.
- 15 3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2, en el que dichas infecciones bacterianas están causadas por al menos uno de: *Clavibacter michiganensis*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Erwinia amylovora*, *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, *Streptomyces scabies*, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* y *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*.
4. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho procedimiento es para tratar, inhibir, eliminar o retrasar la aparición de infecciones fúngicas.
- 20 5. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4, en el que dichas infecciones fúngicas están causadas por al menos uno de: *Botrytis cinerea*, *Penicillium digitatum*, *Alternaria brassicicola*, *Uromyces appendiculatus*, *Leveillula taurica*, *Sclerotinia sclerotiorum* y *Puccinia coronata*.
6. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4, en el que dicho procedimiento inhibe al menos uno de la germinación de esporas y formación de hifas.
- 25 7. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, para prevenir, inhibir, eliminar o retrasar la aparición de infecciones o infestaciones por plagas en productos agrícolas e industriales, lo que prolonga la vida útil o el tiempo de almacenamiento de dicho producto.
8. Un procedimiento para conferir resistencia en plantas contra infecciones o infestaciones de plagas, El procedimiento comprende la etapa de aplicar sobre una planta, a un material vegetal o en las proximidades de dicha planta o material vegetal, un agente de control biológico o una composición que lo comprenda, dicho agente de control biológico comprende al menos uno de:
- 30 a. células de *Pseudozyma aphidis* o cualquier aislado de las mismas;  
 b. esporas de *Pseudozyma aphidis*;  
 c. medio de cultivo condicionado de *Pseudozyma aphidis*;  
 d. compuestos secretados de *Pseudozyma aphidis*;  
 e. extractos de cualquiera de (a) a (d); y  
 f. una combinación de al menos dos de los agentes de control biológico definidos en de (a) a (e).
9. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8, en el que dicho procedimiento regula por aumento o induce la expresión de genes relacionados con el sistema inmunológico.
- 40 10. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8, en el que dichos genes relacionados con el sistema inmunitario codifican al menos uno de la familia de proteínas relacionadas con la patogenicidad y la familia de las defensinas.
11. Un procedimiento para promover el crecimiento en una planta que comprende la etapa de aplicar sobre una planta, a un material vegetal o en las proximidades de dicha planta o material vegetal, un agente de control biológico o una composición que lo comprenda, dicho agente de control biológico comprende al menos uno de:
- 45 a. células de *Pseudozyma aphidis* o cualquier aislado de las mismas;  
 b. esporas de *Pseudozyma aphidis*;  
 c. medio de cultivo condicionado de *Pseudozyma aphidis*;  
 d. compuestos secretados de *Pseudozyma aphidis*;  
 e. extractos de cualquiera de (a) a (d); y  
 50 f. una combinación de al menos dos de los agentes de control biológico definidos en de (a) a (e),
- en el que dicho procedimiento conduce a un aumento en al menos uno de: el peso de la planta, la altura de planta, el número de hojas de la planta, sistema radicular, espesor de la planta y biomasa de la planta.
12. Una composición pesticida que comprende como principio activo un agente de control biológico para su uso para

tratar, prevenir, inhibir, eliminar o retrasar la aparición de infecciones o infestaciones por hongos en seres humanos o ganado, dicha composición comprende al menos uno de:

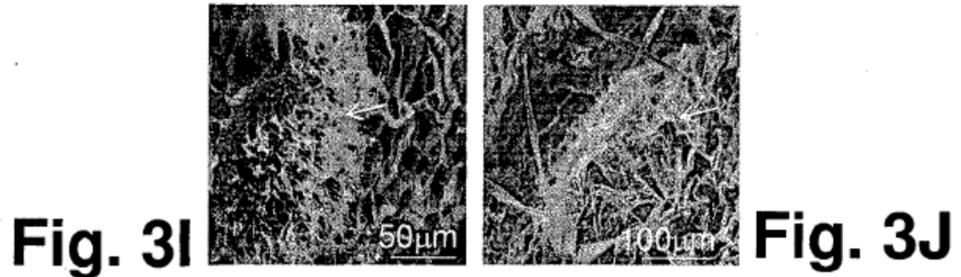
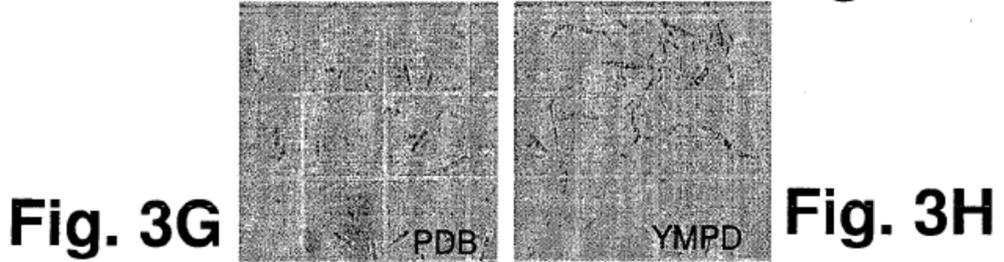
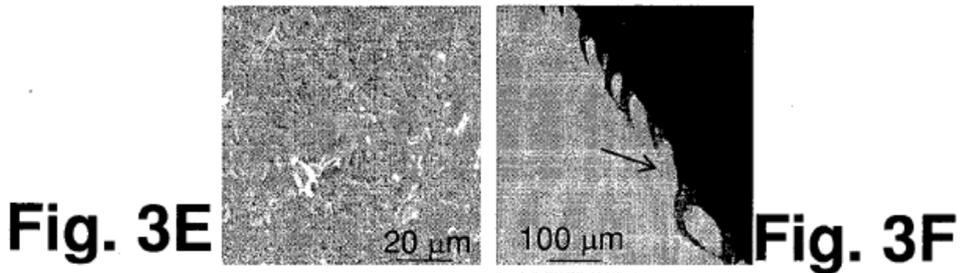
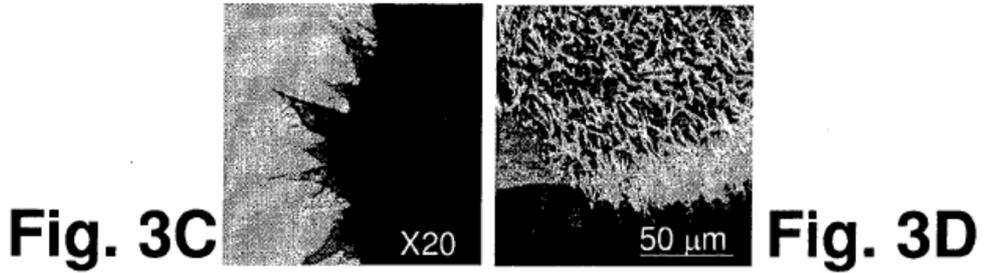
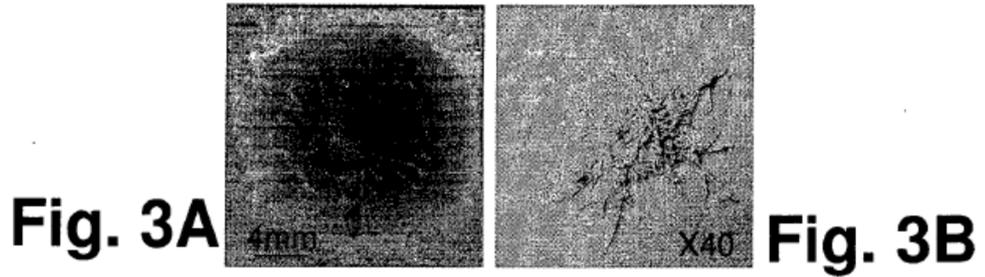
- a. células de *Pseudozyma aphidis* o cualquier aislado de las mismas;
- b. esporas de *Pseudozyma aphidis*;
- 5 c. medio de cultivo condicionado de *Pseudozyma aphidis*;
- d. compuestos secretados de *Pseudozyma aphidis*;
- e. extractos de cualquiera de (a) a (d); y
- f. una combinación de al menos dos de los agentes de control biológico definidos en de (a) a (e); dicha composición comprende, opcionalmente, además vehículos diluyentes y excipientes.

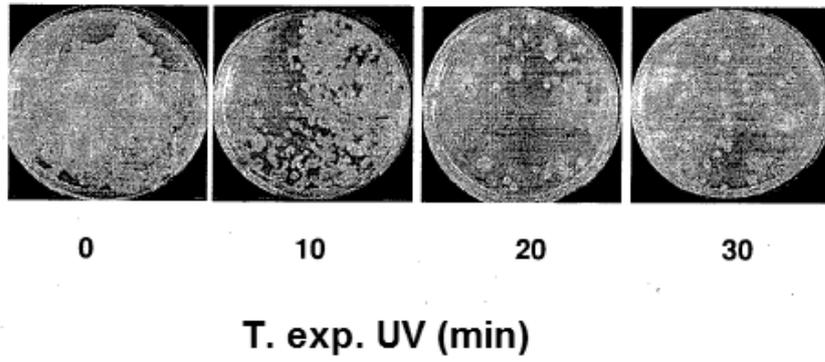


**Fig. 1A**

**Fig. 1B**

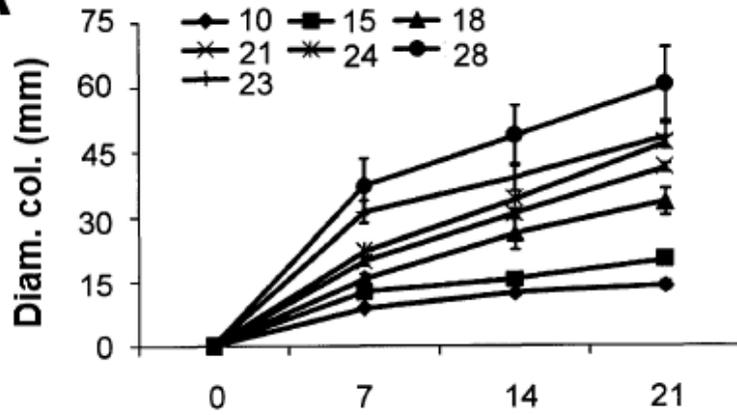




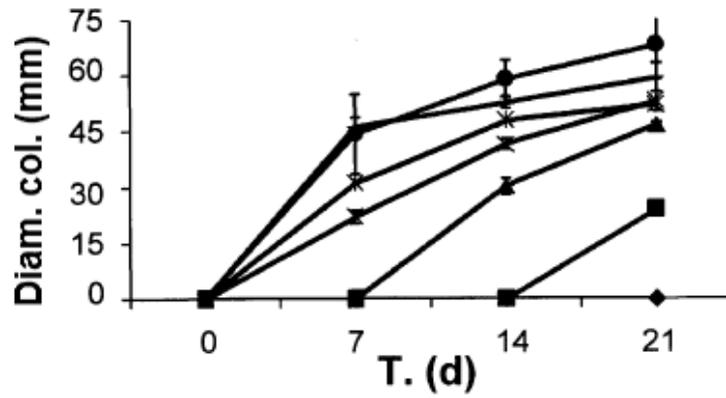


**Fig. 4**

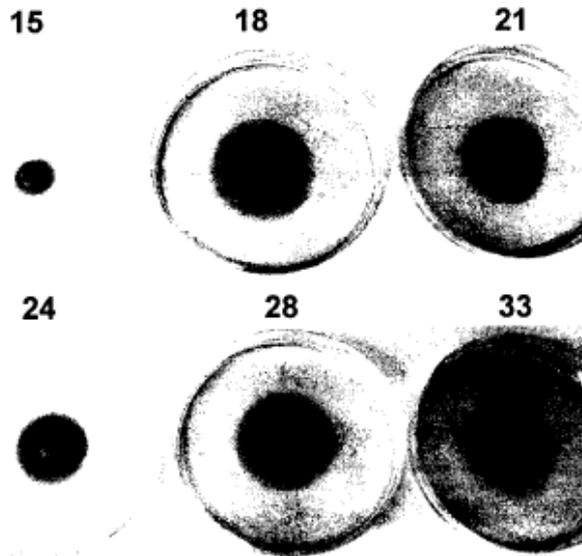
**Fig. 5A**

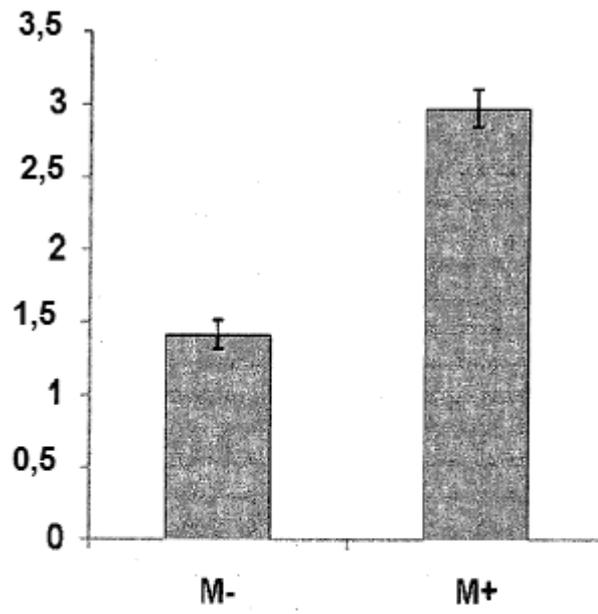


**Fig. 5B**

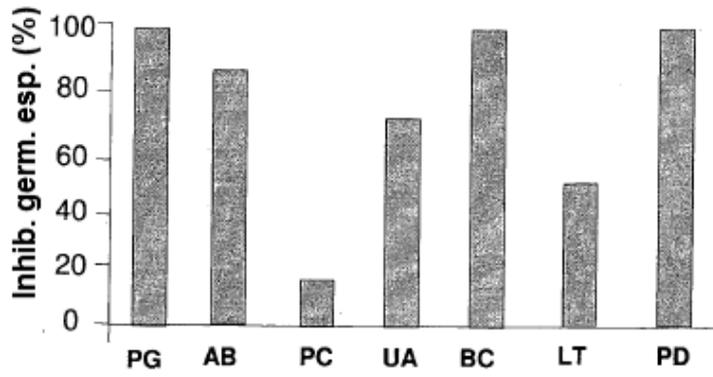


**Fig. 5C**

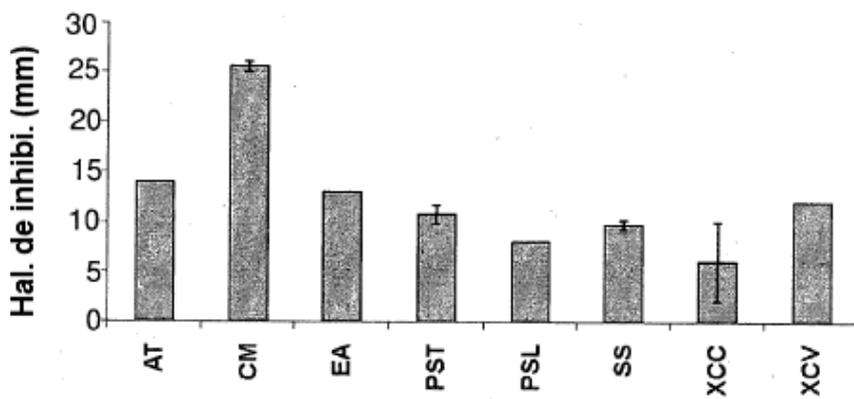




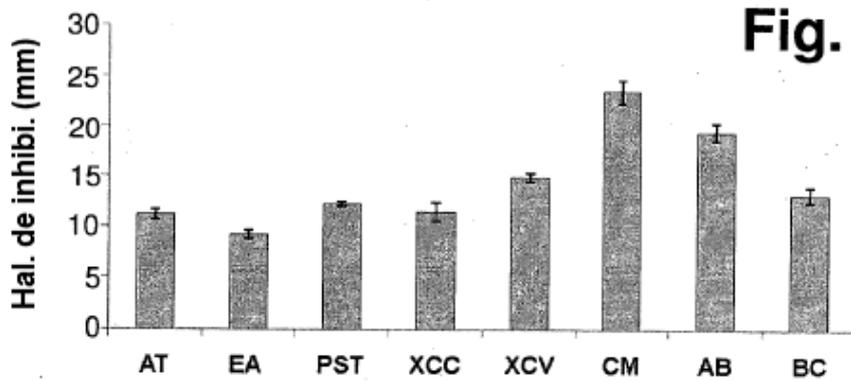
**Fig. 6**



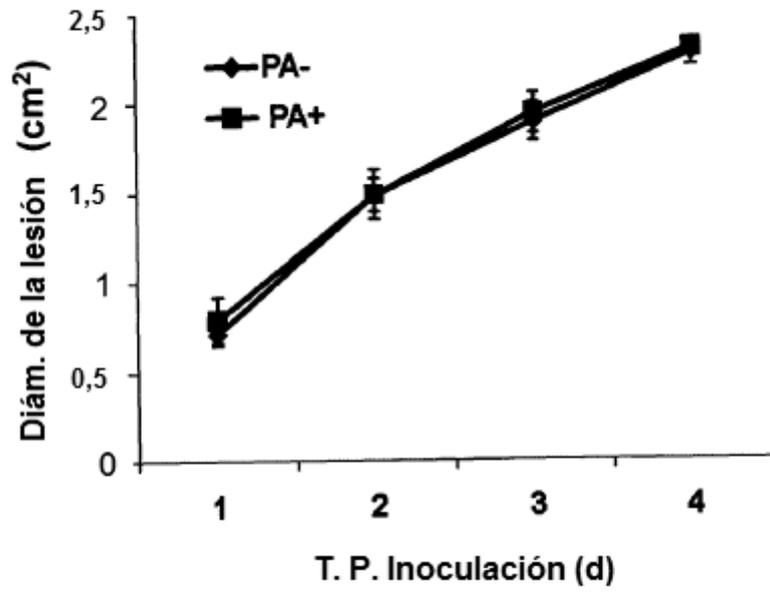
**Fig. 7A**



**Fig. 7B**



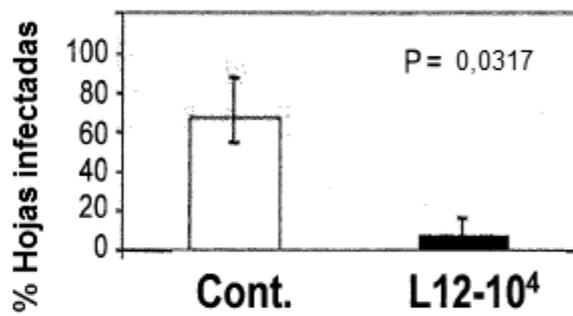
**Fig. 7C**



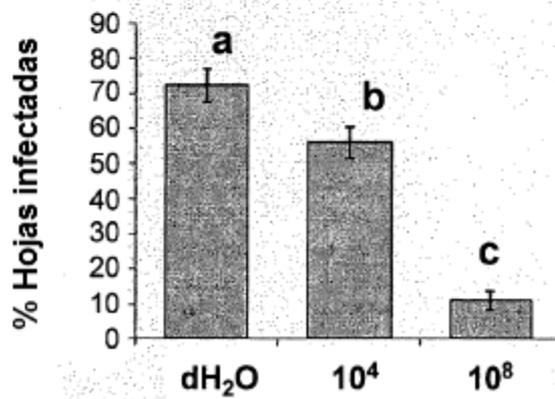
**Fig. 8**



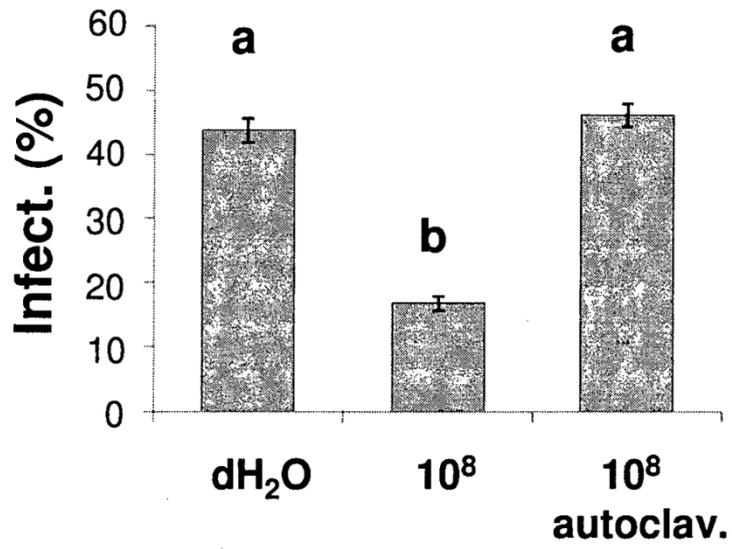
**Fig. 9A**



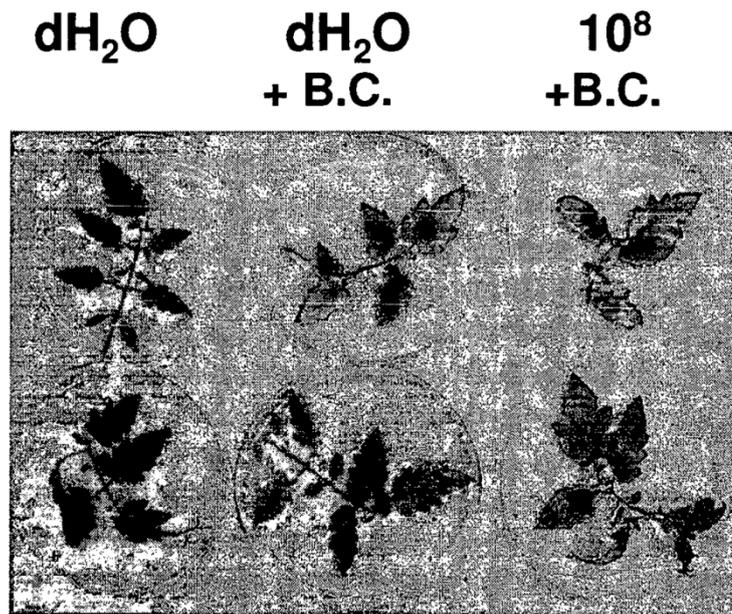
**Fig. 9B**



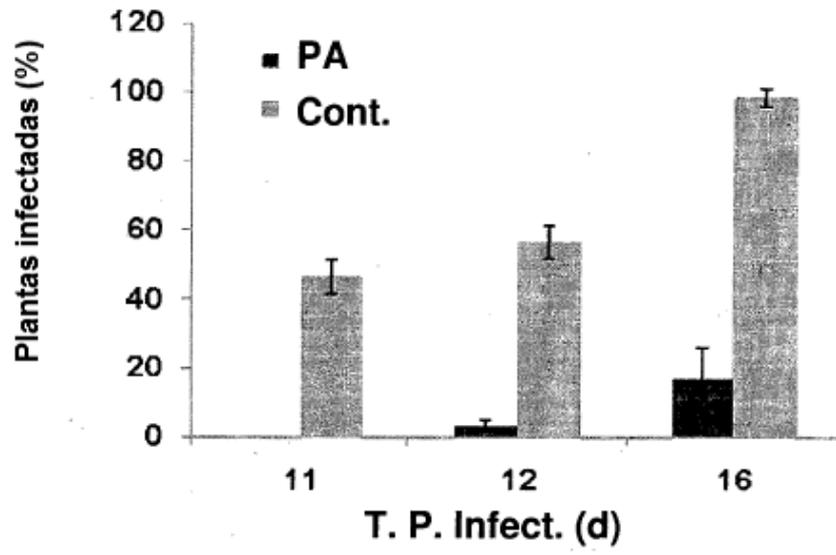
**Fig. 9C**



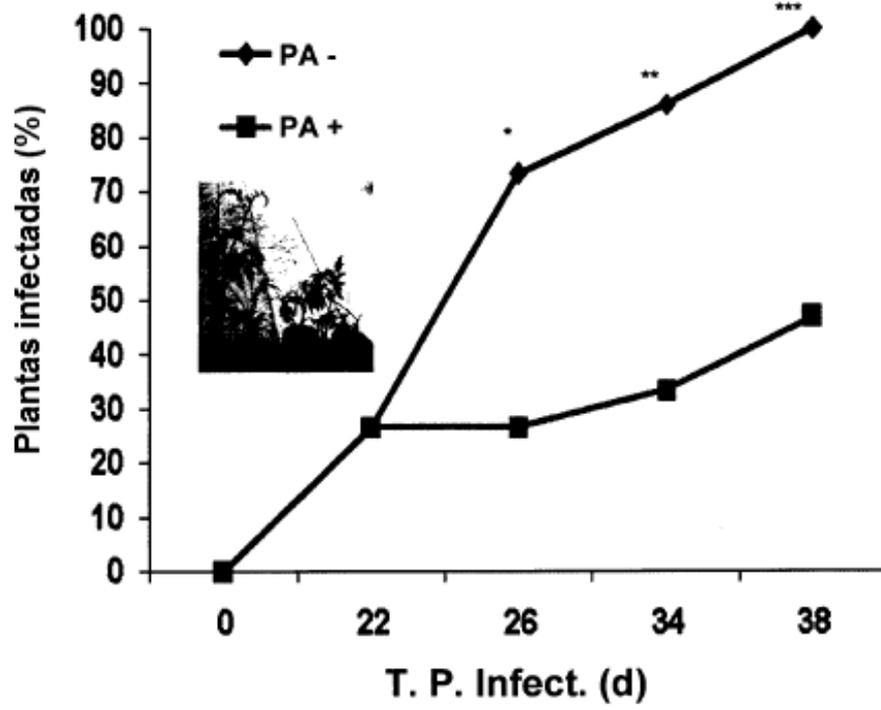
**Fig. 9D**



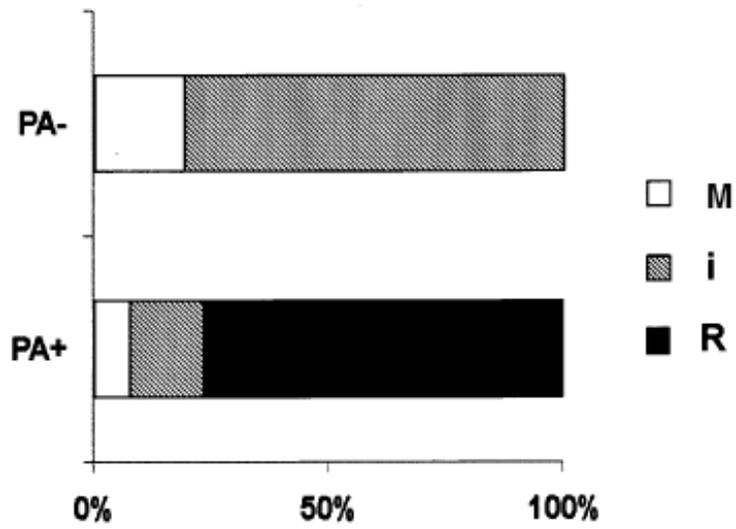
**Fig. 9E**



**Fig. 9F**



**Fig. 10A**



**Fig. 10B**

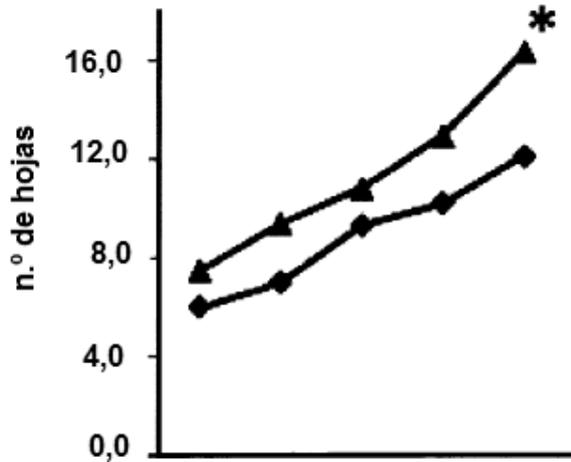


Fig. 11A

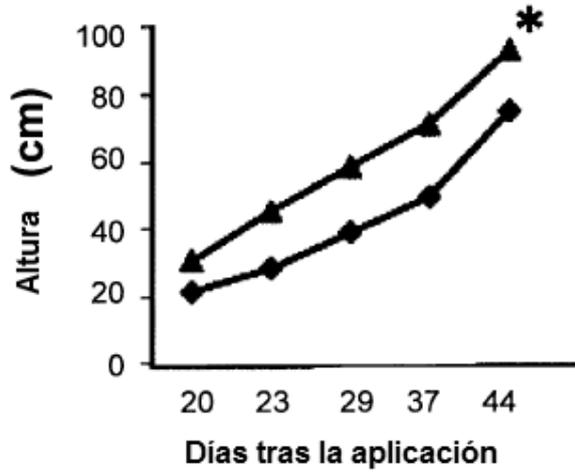


Fig. 11B

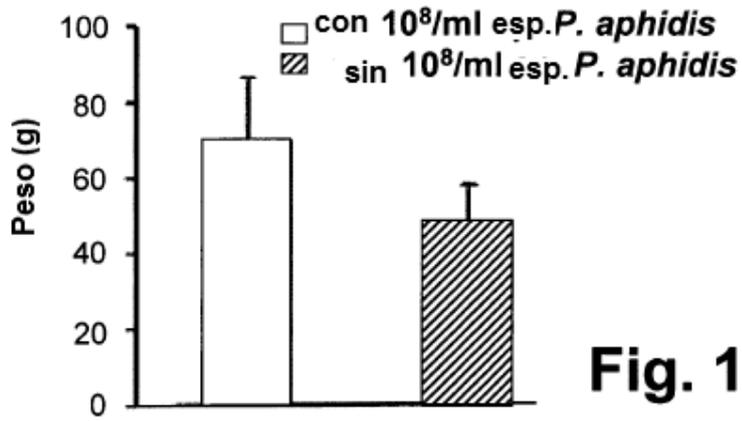
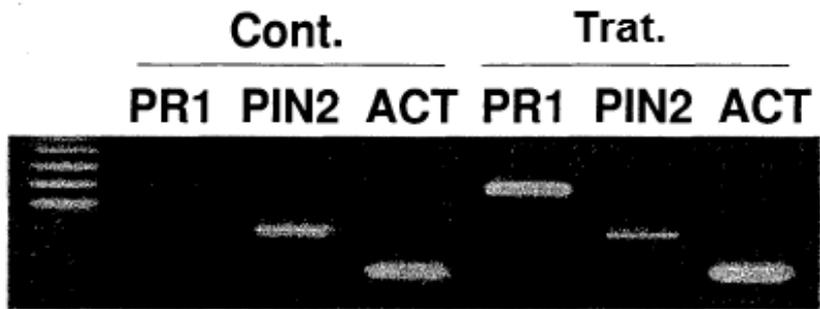
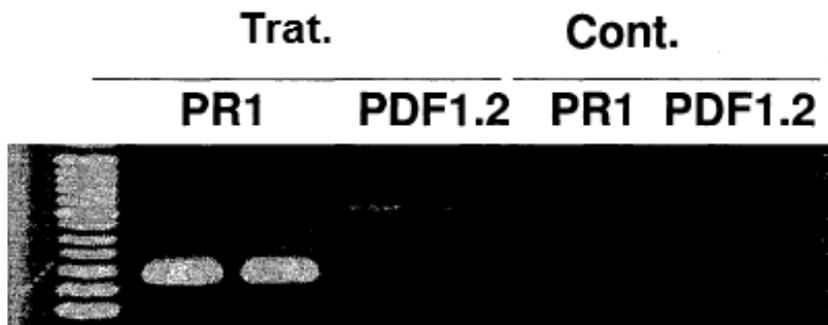


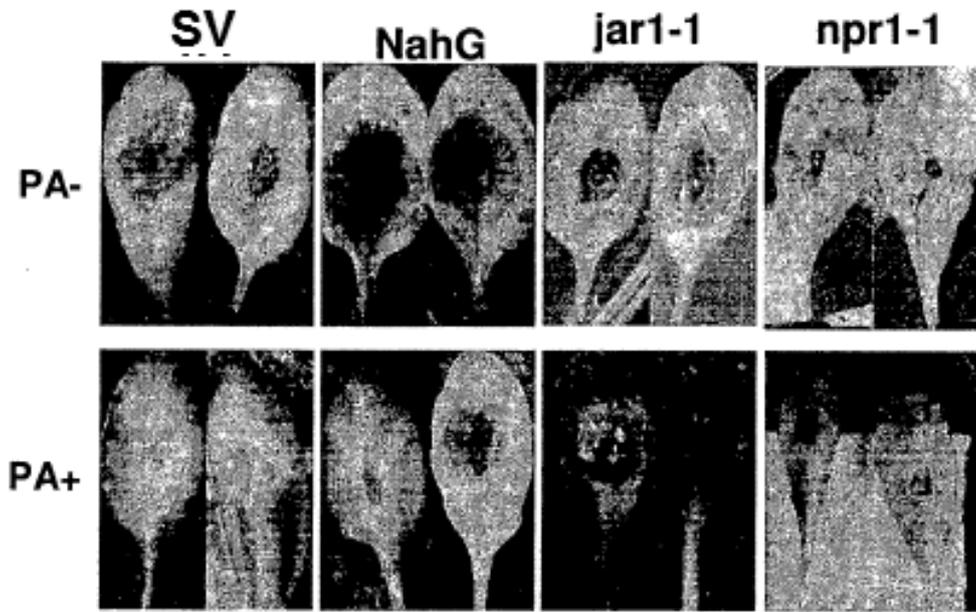
Fig. 11C



**Fig. 12A**



**Fig. 12B**



**Fig. 13A**

