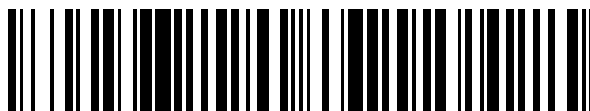


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 759 336**

51 Int. Cl.:

C12R 1/07 (2006.01)

C12R 1/125 (2006.01)

A01N 63/00 (2006.01)

C05F 11/08 (2006.01)

C05G 3/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.12.2015** **PCT/US2015/067668**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.07.2016** **WO16109424**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.12.2015** **E 15831258 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.11.2019** **EP 3240403**

54 Título: **Composiciones microbianas y métodos de uso para beneficiar el crecimiento de las plantas y tratar enfermedades de plantas**

30 Prioridad:

29.12.2014 US 201462097287 P

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

08.05.2020

73 Titular/es:

FMC CORPORATION (100.0%)
FMC Tower at Cira Centre South, 2929 Walnut
Street
Philadelphia, PA 19104, US

72 Inventor/es:

TAGHAVI, SAFIYH;
VAN DER LELIE, DANIEL;
MCLEOD, RODERICK;
BROST, KEVIN, RONALD JOHN y
KIBBEE, JOHN, EDWARD

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 759 336 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

Composiciones microbianas y métodos de uso para beneficiar el crecimiento de las plantas y tratar enfermedades de plantas

Campo técnico

- 5 El objeto de estudio descrito en la presente se refiere a composiciones que comprenden cepas microbianas aisladas para su aplicación a plantas, semillas de plantas y suelo que rodea las plantas para beneficiar el crecimiento de las plantas y tratar enfermedades de las plantas. En ciertos casos, las cepas microbianas se distribuyen a las plantas, las semillas de las plantas y al suelo que rodea a las plantas combinadas con un agente químico activo que tiene propiedades antimicrobianas.

10 Antecedentes

- Se sabe que varios microorganismos que tienen efectos beneficiosos sobre el crecimiento y la salud de las plantas están presentes en el suelo, viven en asociación con plantas específicamente en la zona de la raíz (Rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas "PGPR", en sus siglas en inglés) o residen como endófitos dentro de la planta. Sus propiedades beneficiosas que promueven el crecimiento de la planta incluyen fijación de nitrógeno, quelación de hierro, solubilización de fosfato, inhibición de microorganismos no beneficiosos, resistencia a plagas, Resistencia Sistémica Inducida (ISR, en sus siglas en inglés), Resistencia Sistémica Adquirida (SAR, en sus siglas en inglés), descomposición del material vegetal en el suelo para aumentar de la materia orgánica del suelo útil y síntesis de fitohormonas tales como ácido indol-acético (IAA), acetoina y 2,3-butanodiol que estimulan el crecimiento de las plantas, el desarrollo y las respuestas al estrés ambiental tales como la sequía. Además, estos microorganismos pueden interferir en la respuesta al estrés de etileno de una planta al descomponer la molécula precursora, 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC), estimulando así el crecimiento de la planta y ralentizando la maduración del fruto. Estos microorganismos beneficiosos pueden mejorar la calidad del suelo, el crecimiento de las plantas, el rendimiento y la calidad de los cultivos. Varios microorganismos muestran actividad biológica por ejemplo, útiles para controlar enfermedades de las plantas. Tales bioplaguicidas (organismos vivos y los compuestos producidos naturalmente por estos organismos) son más seguros y más biodegradables que los fertilizantes y plaguicidas sintéticos.

- Los fitopatógenos fúngicos, que incluyen pero no se limitan a, *Botrytis* spp. (p. ej., *Botrytis cinerea*), *Fusarium* spp. (p. ej., *F. oxysporum* y *F. graminearum*), *Rhizoctonia* spp. (p. ej., *R. solani*), *Magnaporthe* spp., *Mycosphaerella* spp., *Puccinia* spp. (p. ej., *P. recondita*), *Phytophthora* spp. y *Phakopsora* spp. (p. ej., *P. pachyrhizi*), son un tipo de plaga vegetal que puede causar pérdidas económicas en las industrias agrícolas y hortícolas. Los agentes químicos se pueden utilizar para controlar los fitopatógenos fúngicos, pero el uso de los agentes químicos presenta desventajas que incluyen un alto coste, falta de eficacia, emergencia de cepas resistentes de hongos e impactos ambientales no deseables. Además, tales tratamientos químicos tienden a ser indiscriminados y pueden afectar negativamente a bacterias, hongos y artrópodos beneficiosos, además del patógeno de la planta al que se dirigen los tratamientos. Un segundo tipo de plaga vegetal son los patógenos bacterianos, que incluyen pero no se limitan a *Erwinia* spp. (tal como *Erwinia chrysanthemi*), *Pantoea* spp. (tal como *P. citrea*), *Xanthomonas* (p. ej., *Xanthomonas campestris*), *Pseudomonas* spp. (tal como *P. syringae*) y *Ralstonia* spp. (tal como *R. soleacearum*) que causan pérdidas económicas graves en las industrias agrícola y hortícola. Al igual que los patógenos fúngicos, el uso de agentes químicos para tratar estos patógenos bacterianos presenta desventajas. Los virus y organismos similares a virus comprenden un tercer tipo de agente causante de enfermedades de plantas que es difícil de controlar, pero al que los microorganismos bacterianos pueden proporcionar resistencia en las plantas a través de la resistencia sistémica inducida (ISR). Por lo tanto, los microorganismos que se pueden aplicar como biofertilizantes y/o bioplaguicidas para controlar hongos, virus y bacterias patógenos son deseables y tienen una gran demanda para mejorar la sostenibilidad agrícola. Un último tipo de patógeno de plantas incluye nematodos e insectos patógenos de plantas, que pueden causar daños severos y pérdida de plantas.

- Algunos miembros de las especies de *Bacillus* se han referido como cepas de biocontrol, y algunas se han aplicado en productos comerciales (Joseph W. Kloepper, et al. 2004, Phytopathology Vol. 94, N° 11, 1259-1266). Por ejemplo, las cepas que se utilizan en este momento en productos comerciales de biocontrol incluyen: *Bacillus pumilus* cepa QST2808, utilizada como ingrediente activo en SONATA y BALLAD-MÁS, producida por BAYER CROP SCIENCE; *Bacillus pumilus* cepa GB34, utilizada como ingrediente activo en YIELDSHIELD, producida por BAYER CROP SCIENCE; *Bacillus subtilis* cepa QST713, utilizada como ingrediente activo de SERENADE, producida por BAYER CROP SCIENCE; *Bacillus subtilis* cepa GBO3, utilizada como ingrediente activo en KODIAK y SYSTEM3, producida por HELENA CHEMICAL COMPANY. Varias cepas de *Bacillus thuringiensis* y *Bacillus firmus* se han aplicado como agentes de control biológico contra nematodos e insectos vectores y estas cepas sirven como base de numerosos productos de control biológico disponibles comercialmente, incluidos NORTICA y PONCHO-VOTIVO, producidos por BAYER CROP SCIENCE. Además, las cepas de *Bacillus* que se utilizan en la actualidad en productos bioestimulantes comerciales incluyen: *Bacillus amyloliquefaciens* cepa FZB42 utilizada como ingrediente activo en RHIZOVITAL 42, producida por ABITEP GmbH, así como otras varias especies de *Bacillus subtilis* que se incluyen como células completas, incluido su extracto de fermentación en productos bioestimulantes, tal como FULZYME producido por JHBIotech Inc.

El documento US 2013/0236522 describe gránulos de esporas viables de *Bacillus amyloliquefaciens* y/o *Bacillus subtilis*, p. ej., *Bacillus sp.* D747, con una cubierta de un compuesto que contiene metal.

- 5 Kumar et al. (ARPH Journal of Agricultural and Biological Science, Vol. 1, 1 de enero de 2012, páginas 509-519) describen que *Bacillus subtilis* y *Bacillus amyloliquefaciens*, respectivamente, tienen potencial para promover el crecimiento de las plantas y fitoestimulador. El objeto de estudio descrito en la presente proporciona composiciones microbianas y métodos para su uso en beneficio del crecimiento de las plantas y el tratamiento de enfermedades de las plantas.

Compendio de la invención

- 10 En una realización, se proporciona una composición para beneficiar el crecimiento de la planta y/o la salud de la planta, comprendiendo la composición: un cultivo biológicamente puro de *Bacillus amyloliquefaciens* RTI301 depositado como ATCC Núm. PTA-121165; y un cultivo biológicamente puro de *Bacillus subtilis* RTI477 depositado como ATCC Núm. PTA-121167, en donde la aplicación de la composición a la semilla de la planta, las raíces de la planta o al suelo que rodea la planta beneficia el crecimiento de la planta y/o la salud de la planta.

- 15 En una realización, se proporciona un método para beneficiar el crecimiento de la planta y/o la salud de la planta, comprendiendo el método suministrar a la semilla de una planta, raíces de una planta o suelo que rodea una planta una composición que comprende: un cultivo biológicamente puro de *Bacillus amyloliquefaciens* RTI301 depositado como ATCC Núm. PTA-121165; y un cultivo biológicamente puro de *Bacillus subtilis* RTI477 depositado como ATCC Núm. PTA-121167, en donde el suministro de la composición beneficia el crecimiento de la planta y/o la salud de la planta.

- 20 En una realización, se proporciona una semilla de planta, en donde la semilla de planta se recubre con la composición definida anteriormente en la presente memoria. En una realización, se proporciona un método para beneficiar el crecimiento de la planta y/o la salud de la planta, comprendiendo el método plantar una semilla de una planta en un medio de crecimiento adecuado, en donde la semilla se ha recubierto con una composición que comprende: esporas de un cultivo biológicamente puro de *Bacillus amyloliquefaciens* RTI301 depositado como ATCC Núm. PTA-121165; y esporas de un cultivo biológicamente puro de *Bacillus subtilis* RTI477 depositado como ATCC Núm. PTA-121167, presente en una cantidad adecuada para beneficiar el crecimiento de la planta y/o la salud de la planta.

- 25 En una realización, se proporciona un producto, comprendiendo el producto: una primera composición como se define anteriormente en la presente memoria; una segunda composición que comprende uno o una combinación de un insecticida, fungicida, nematocida, bactericida, herbicida, extracto de plantas, regulador de crecimiento de plantas o fertilizante microbiano, biológico o, químico, en donde la primera y segunda composiciones se envasan por separado; e instrucciones para el suministro en una cantidad adecuada para beneficiar el crecimiento de la planta, una combinación de la primera y segunda composiciones a: follaje de la planta, corteza de la planta, fruto de la planta, flores de la planta, semilla de la planta, raíces de la planta, un esqueje de la planta, un injerto de la planta, tejido calloso de la planta; suelo o medio de crecimiento que rodea la planta; suelo o medio de crecimiento antes de sembrar semillas de la planta en el suelo o medio de crecimiento; o suelo o medio de crecimiento antes de plantar la planta, el esqueje de la planta, el injerto de la planta o el tejido calloso de la planta en el suelo o medio de crecimiento.

Breve descripción de las figuras

- 30 La Figura 1 muestra un diagrama esquemático de la organización genómica que rodea e incluye el operón de biosíntesis lantibiótico único que se encuentra en *Bacillus amyloliquefaciens* cepa RTI301 en comparación con las regiones correspondientes para dos cepas de referencia *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 y *Bacillus amyloliquefaciens* TrigoCor1448 de acuerdo con una o más realizaciones de la presente invención.

- 35 La Figura 2A es una imagen de plantas de trigo extraídas después de 13 días de crecimiento que muestran las plantas de control. La Figura 2B es una imagen de plantas de trigo extraídas después de 13 días de crecimiento que muestran las plantas inoculadas con la cepa RTI477. Estas imágenes muestran los efectos positivos de *Bacillus subtilis* cepa RTI477 sobre el crecimiento temprano de la planta en trigo de acuerdo con una o más realizaciones de la presente invención.

- 40 La Figura 3A es una imagen que muestra la cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* RTI301 aplicada sobre un césped de la cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* RTI472. La Figura 3B es una imagen que muestra la cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* RTI301 aplicada sobre un césped de la cepa de *Bacillus subtilis* RTI477. Estas imágenes muestran la compatibilidad entre *Bacillus amyloliquefaciens* cepa RTI301 y *Bacillus subtilis* cepa RTI477 de acuerdo con una o más realizaciones de la presente invención.

- 45 La Figura 4A es una imagen que muestra la morfología de la cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* RTI301 de acuerdo con una o más realizaciones de la presente invención. La Figura 4B es una imagen que muestra la morfología de la cepa de *Bacillus subtilis* RTI477 de acuerdo con una o más realizaciones de la presente invención.

- 50 La Figura 5A muestra plantas de control. La Figura 5B muestra plantas inoculadas con RTI301 más RTI477 (razón 3:1) a 10^6 ufc/ml. Las Figuras 5A-5B son imágenes que muestran el efecto positivo en el crecimiento temprano de la

planta como resultado de la inoculación de semillas de soja con la combinación de *Bacillus amyloliquefaciens* RTI301 más *Bacillus subtilis* cepa RTI477 y extraída después de 8 días de crecimiento de acuerdo con una o más realizaciones de la presente invención.

- 5 La Figura 6 es un diagrama esquemático que muestra tanto los lipopéptidos cíclicos de tipo Fengicina y de tipo Deshidroxifengicina referidos previamente producidos por especies microbianas, incluyendo *Bacillus amyloliquefaciens* y *Bacillus subtilis* y moléculas de tipo Fengicina y Deshidroxifengicina recientemente identificadas (mostradas en negrita) producidas por uno o ambos de los productos aislados de *Bacillus amyloliquefaciens* RTI301 y *Bacillus subtilis* RTI477 de acuerdo con una o más realizaciones de la presente invención.

Descripción detallada

- 10 Los términos "un", "uno", "una" y "el" y "la" se refieren a "uno o más" cuando se utilizan en esta solicitud, incluidas las reivindicaciones. De este modo, por ejemplo, la referencia a "una planta" incluye una pluralidad de plantas, a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

- 15 A lo largo de toda esta memoria descriptiva y de las reivindicaciones, los términos "comprenden", "comprende" y "que comprende" se utilizan en un sentido no exclusivo, excepto cuando el contexto lo requiera de otra manera. Del mismo modo, se pretende que el término "incluir" y sus variantes gramaticales no sean limitantes, de manera que la mención de los puntos de una lista no excluye otros puntos similares que puedan ser sustituidos por o añadidos a los puntos enumerados.

- 20 La mención de los intervalos numéricos por medio de los extremos incluye todos los números, p. ej., la totalidad de los números enteros, incluidas las fracciones de los mismos, comprendidos dentro de ese intervalo (por ejemplo, la mención de 1 a 5 incluye 1, 2, 3, 4 y 5, así como las fracciones de los mismos, p. ej., 1,5, 2,25, 3,75, 4,1 y similares) y cualquier intervalo dentro de ese intervalo.

Para los fines de esta memoria descriptiva y las reivindicaciones, los términos "metabolito" y "compuesto" se utilizan indistintamente cuando se utilizan en relación con compuestos que tienen actividad antimicrobiana que son producidos por la cepa RTI301 u otras cepas de *Bacillus amyloliquefaciens*.

- 25 En una o más realizaciones de la presente invención, se proporcionan composiciones y métodos para beneficiar el crecimiento de la planta y/o la salud de la planta. En una realización, se proporciona una composición para beneficiar el crecimiento de la planta y/o la salud de la planta, incluyendo la composición dos o más microorganismos compatibles, donde se utiliza un primer microorganismo con propiedades antimicrobianas para crear un nicho al inhibir el crecimiento y el desarrollo de microorganismos endógenos presentes en el suelo o viviendo en asociación con la planta. El segundo microorganismo tiene propiedades beneficiosas para el crecimiento de la planta y/o la salud de la planta y es compatible con el crecimiento del primer microorganismo. El segundo microorganismo está presente en una cantidad suficiente para establecerse y beneficiar el crecimiento de la planta y/o la salud de la planta. La aplicación de la composición a la semilla de la planta, las raíces de la planta o al suelo que rodea la planta beneficia el crecimiento de la planta y/o la salud de la planta. Las propiedades del segundo microorganismo que son beneficiosas para el crecimiento de la planta y/o la salud de la planta incluyen uno de mayor rendimiento de la planta, mejor vigor de las plántulas, mejor desarrollo de la raíz, mejor crecimiento de la planta, mejor salud de la planta, mejor apariencia, mejor resistencia a los patógenos de la planta, reducción de la infección patogénica, o una combinación de los mismos. El patógeno de la planta puede incluir uno o una combinación de insectos, nematodos, hongos patógenos de plantas o bacterias patógenas de plantas.

- 40 En otra realización, se proporciona un método para beneficiar el crecimiento de la planta y/o la salud de la planta, comprendiendo el método el suministro a la semilla de una planta, raíces de una planta o al suelo que rodea una planta, de una composición que incluye dos o más microorganismos compatibles. La composición incluye al menos un cultivo biológicamente puro de un primer microorganismo que tiene propiedades antimicrobianas y presente en una cantidad adecuada para inhibir el crecimiento de microorganismos endógenos presentes en el suelo que rodea o vive en asociación con la planta. Esto es para establecer un nicho para que se establezca un segundo microorganismo. La composición también incluye al menos un cultivo biológicamente puro de un segundo microorganismo que tiene propiedades beneficiosas para el crecimiento de la planta y/o la salud de la planta, en donde el crecimiento del segundo microorganismo es compatible con el crecimiento del primer microorganismo, y en donde el segundo microorganismo está presente en una cantidad adecuada para establecerse y beneficiar el crecimiento de la planta y/o la salud de la planta. El suministro de la composición a la semilla de la planta, las raíces de la planta o al suelo que rodea la planta beneficia el crecimiento de la planta y/o la salud de la planta.

Para facilitar el proceso de establecimiento del segundo microorganismo, el crecimiento del segundo microorganismo puede ser más rápido que el del primer microorganismo y el segundo microorganismo puede caracterizarse por un fenotipo de motilidad de tipo movimiento en enjambre ("swarming") y de alta motilidad.

- 55 Las composiciones y métodos incluyen el uso con cualquier tipo de planta, incluyendo, por ejemplo, monocotiledóneas, dicotiledóneas, Cereales, Maíz, Maíz dulce, Maíz para palomitas, Maíz de semilla, Maíz ensilado, Maíz de campo, Arroz, Trigo, Cebada, Sorgo, Espárragos, Bayas, Arándano azul, Zarzamoras, Frambuesas, Mora roja, Arándanos, Arándano rojo, Grosella silvestre, Bayas de saúco, Pasa de Corinto, Bayas de tallo, Bayas de arbusto, Hortalizas del

género Brassica, Brócoli, Col, Coliflor, Coles de Bruselas, Berza, Col rizada, Hojas de mostaza, Colinabo, Hortalizas del género Cucurbitáceas, Pepino, Cantalupo, Melón, Melón almizcleño, Calabacín, Sandía, Calabaza, Berenjena, Hortalizas de Bulbo, Cebolla, Ajo, Chalotas, Cítricos, Naranja, Pomelo, Limón, Mandarina, Tangelo, Pomelo chino, Hortalizas de fruto, Pimiento, Tomate, Tomate cherry enano, Tomatillo, Okra, Uva, Hierbas/Especias, Hortalizas de hoja, Lechuga, Apio, Espinacas, Perejil, Achicoria, Legumbres/Hortalizas (judías y guisantes succulentos y secos), Judías, Judías verdes, Abichuelas, Habas, Soja, Judías secas, Garbanzos, Alubias de Lima, Guisantes, Judías pintas, Guisantes partidos, Lentejas, Cultivos de semillas oleaginosas, Canola, Ricino, Coco, Algodón, Lino, Aceite de palma, Oliva, Cacahuete, Colza, Cártamo, sésamo, Girasol, Soja, Fruta de pepita, Manzana, Manzana silvestre, Pera, Membrillo, Mayhaw, Hortalizas de Raíz/Tubérculos y Bulbo, Zanahoria, Patata, Batata, Yuca, Remolacha, Jengibre, Rábano picante, Rábano, Ginseng, Nabo, Fruta de hueso, Albaricoque, Cereza, Nectarina, Melocotón, Ciruela, Ciruela pasa, Fresa, Frutos secos, Almendra, Pistacho, Pecan, Nuez, Avellanas, Castaño, Anacardo, Hayuco, Nuez Blanca, Macadamia, Kiwi, Banana, Agave (Azul), Hierba, Césped, Plantas ornamentales, Flor de pascua, Esquejes de madera dura, Castañas, Roble, Arce, Caña de azúcar o Remolacha azucarera.

Los términos "antagonista" y "antimicrobiano" se utilizan indistintamente en la presente memoria para los fines de la memoria descriptiva y las reivindicaciones. Las propiedades beneficiosas para el crecimiento de las plantas y/o la salud de las plantas pueden ser una o ambas propiedades promotoras del crecimiento y propiedades antagonistas para conferir protección contra las infecciones patógenas de las plantas y/o para tratar o controlar las infecciones patógenas de las plantas.

Una bacteria asociada a la planta, identificada como perteneciente a la especie *Bacillus subtilis*, se aisló de la raíz de Moringa oleifera cultivada en Carolina del Norte y posteriormente se probó para determinar las propiedades de promoción del crecimiento de la planta y antagonicas de patógenos de la planta. Más específicamente, la cepa bacteriana aislada se identificó como una nueva cepa de *Bacillus subtilis* a través del análisis de secuencia de los genes de ARNr de 16S y *rpoB* altamente conservado (véase Ejemplo 1). Se determinó que la secuencia de ARN de 16S del nuevo producto aislado bacteriano (denominado "*Bacillus subtilis* RTI477") era idéntica a la secuencia del gen de ARNr de 16S de otras tres cepas conocidas de *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens* cepa NS6 (KF177175), y *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* cepa DSM 10 (NR_027552). Además, se determinó que la secuencia *rpoB* de RTI477 tiene el nivel más alto de similitud de secuencia con las cepas conocidas de *Bacillus subtilis* PY79 (CP006881) o *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* 6051-HGW (CP003329) (es decir, 99% de identidad de secuencia; diferencia de 9 pb) o *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* BAB-1a (CP004405) (es decir, 99% de identidad de secuencia; diferencia de 10 pb). Las diferencias en secuencia para el gen *rpoB* a nivel de ADN indican que RTI477 es una nueva cepa de *Bacillus subtilis*. La cepa de *Bacillus subtilis* RTI477 se depositó el 17 de abril de 2014 bajo los términos del Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento internacional del Depósito de Microorganismos para los Fines del Procedimiento de Patentes en la Colección de Cultivos Tipo Americana (ATCC) en Manassas, Virginia, EE. UU., y tiene el Núm. de acceso de Patente PTA-121167.

El primer microorganismo es una bacteria asociada a la planta, identificada como perteneciente a la especie *Bacillus amyloliquefaciens*, aislada del suelo de la rizosfera de las vides que crecen en un viñedo en Nueva York y posteriormente sometido a prueba para determinar las propiedades antagonicas de los patógenos de las plantas. La cepa bacteriana aislada se identificó como una nueva cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* a través del análisis de secuencia de los genes de ARNr de 16S y *rpoB* altamente conservado (véase Ejemplo 2). Se determinó que la secuencia de ARN de 16S del nuevo producto aislado bacteriano (denominado "*Bacillus amyloliquefaciens* RTI301") era idéntica a la secuencia del gen ARNr de 16S de otras tres cepas conocidas de *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus amyloliquefaciens* cepa NS6 (KF177175), *Bacillus amyloliquefaciens* cepa FZB42 (NR_075005), y *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* cepa DSM 10 (NR_027552). También se determinó que la secuencia del gen *rpoB* de la cepa RTI301 tiene similitud de secuencia con el mismo gen en *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* TrigoCor1448 (CP007244) (99% de identidad de secuencia; diferencia de 3 pares de bases); *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* AS43.3 (CP003838) (99% de identidad de secuencia; diferencia de 7 pares de bases); *Bacillus amyloliquefaciens* CC178 (CP006845) (99% de identidad de secuencia; diferencia de 8 pares de bases), y *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 (CP000560) (99% de identidad de secuencia; diferencia de 8 pares de bases). La cepa RTI301 se identificó como un *Bacillus amyloliquefaciens*. Las diferencias en la secuencia para el gen *rpoB* a nivel de ADN indican que RTI301 es una nueva cepa de *Bacillus amyloliquefaciens*. La cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* RTI301 se depositó el 17 de abril de 2014 bajo los términos del Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos para los Fines del Procedimiento de Patentes en la Colección de Cultivos Tipo Americana (ATCC) en Manassas, Virginia, EE. UU. y tiene el Núm. de Acceso de Patente PTA-121165.

El análisis de secuencia adicional del genoma de *Bacillus amyloliquefaciens* cepa RTI301 reveló que la cepa tiene genes relacionados con la biosíntesis de antibióticos para los cuales faltan homólogos en las otras cepas de *Bacillus amyloliquefaciens* RTI301 estrechamente relacionadas (véase Ejemplo 3). Esto se ilustra en la Figura 1 que muestra un diagrama esquemático de la organización genómica de la única agrupación biosintética de antibióticos encontrada en *Bacillus amyloliquefaciens* RTI301 y la región correspondiente para las dos cepas de referencia de *Bacillus amyloliquefaciens*, FZB42 (centro) y TrigoCor1448 (abajo) conocidas, que se muestran debajo de la cepa RTI301. Se puede observar en la Figura 1 que las cepas FZB42 y TrigoCor1448 carecen de muchos de los genes presentes en ésta agrupación, y hay un bajo grado de identidad de secuencia dentro de varios de los genes que están presentes. El análisis BLASTn de ésta agrupación frente a la base de datos de nucleótidos no redundantes (nr) en NCBI mostró una alta homología con las regiones flanqueantes 5' y 3' (análogas al alto % de similitud en la Figura 1) con cepas de

B. amyloliquefaciens. Sin embargo, la agrupación biosintética de lantipéptidos fue única para RTI301, y se observó una homología no significativa con ningún ADN previamente secuenciado en la base de datos nr NCBI. Los datos indican que RTI301 recientemente identificada tiene una vía de biosíntesis de lantibióticos única.

Además, el análisis de secuencia adicional del genoma de la *Bacillus amyloliquefaciens* RTI301 reveló que esta cepa tiene genes relacionados con un gran número de rutas biosintéticas para la producción de moléculas que tienen propiedades antimicrobianas. Estos incluyen las rutas biosintéticas para subtilosina, surfactina, iturina, fengicinas, amilociclicina, difcidina, bacilisina, bacilomicina y bacileno. A diferencia de la cepa RTI301 con su amplio intervalo de rutas biosintéticas antimicrobianas, el análisis de la secuencia adicional de la cepa RTI477 reveló que esta cepa tiene genes relacionados con las rutas biosintéticas para un grupo más limitado de moléculas que tienen propiedades antimicrobianas. La cepa RTI477 tiene rutas biosintéticas para subtilosina, fengicinas, surfactina, difcidina, bacileno, bacilisina y bacilomicina, pero no se observaron rutas biosintéticas completas para iturinas, lantibióticos y amilociclicinas.

Se realizaron experimentos para determinar las actividades de promoción y antagonismo del crecimiento de las cepas RTI301 y RTI477. Los experimentos realizados para determinar las actividades de promoción y antagonismo del crecimiento de *Bacillus subtilis* cepa RTI477 en diversas plantas y en condiciones variables se describen en la presente memoria en los Ejemplos 4-6. El Ejemplo 4 describe la actividad antagónica del producto aislado de *Bacillus subtilis* RTI477 frente a los principales patógenos de plantas como se mide en ensayos en placa. El ejemplo 5 describe la medición de varios rasgos fenotípicos del producto aislado de *Bacillus subtilis* RTI477 y muestra que este producto aislado tiene un fenotipo de rápido crecimiento y fuerte movimiento en enjambre. El Ejemplo 6 describe la actividad promotora del crecimiento del producto aislado de RTI477 en trigo. Las semillas de trigo germinadas se inocularon durante 2 días en una suspensión de $\sim 2 \times 10^7$ UFC/ml de la cepa RTI477 y posteriormente se plantaron en macetas. Las fotografías de las plantas extraídas después de 13 días de crecimiento se muestran en la Figura 2. La Figura 2A muestra plantas de control y la Figura 2B muestra plantas inoculadas con RTI477. El peso seco de las plántulas de trigo se determinó dando como resultado un peso promedio total de planta seca igual a 35,41 mg para las plantas a las que se había inoculado *Bacillus subtilis* cepa RTI477 frente a un peso igual a 33,38 mg para el control no inoculado, que es un aumento de 6% en el peso seco sobre el control no inoculado para las plantas tratadas con RTI477.

Se realizaron experimentos de manera similar a la cepa RTI477, para determinar las actividades de promoción y antagonismo del crecimiento de *amyloliquefaciens* cepa RTI301 en varias plantas y en condiciones variables. Estos experimentos se describen en la presente memoria en los Ejemplos 4-5. El Ejemplo 4 describe la actividad antagónica del producto aislado de *amyloliquefaciens* RTI301 frente a los principales patógenos de plantas como se mide en ensayos en placa. La cepa RTI301 mostró propiedades antagónicas superiores contra una amplia gama de microorganismos patógenos de plantas en comparación con la cepa RTI477. El Ejemplo 5 describe la medición de varios rasgos fenotípicos del producto aislado de *amyloliquefaciens* RTI301. Notablemente, en comparación con RTI301, RTI477 crece más rápido y tiene un fenotipo de movimiento en enjambre fuerte.

La compatibilidad de la cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* RTI301 con otros productos aislados de *Bacillus* se probó aplicando de manera diseminada la cepa RTI301 sobre un césped de varias otras cepas. Estos datos se describen en el Ejemplo 7. Los resultados de este experimento se muestran en las Figura 3A-3B. Las Figura 3A-3B son imágenes que muestran la compatibilidad del crecimiento entre cepas *Bacillus amyloliquefaciens* RTI301 y *Bacillus subtilis* RTI477 y una falta de compatibilidad entre la cepa RTI301 con otra cepa de *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus amyloliquefaciens* RTI472 depositada como PTA-121166 en la Colección de Cultivos Tipo Americana (ATCC). Cuando la cepa RTI301 se aplicó de manera diseminada sobre un césped de la cepa RTI472 (Figura 3A), se observó una clara zona de inhibición para el crecimiento de la cepa RTI472. Por el contrario, cuando la cepa RTI301 se aplicó de manera diseminada sobre un césped de la cepa RTI477 (Figura 3B), solo se observó una inhibición mínima y no se observó aclaramiento del césped de células para la cepa RTI477. Por lo tanto, se concluyó que el crecimiento de RTI301 y RTI477 es compatible.

Sin limitarse a ningún mecanismo de acción particular, se propone un modo de acción de la siguiente manera para explicar las diferencias observadas en la compatibilidad de las cepas. Según las secuencias del genoma de las tres cepas probadas (es decir, RTI301, RTI472 y RTI477), se predijo que todas estas cepas producirían los compuestos antagónicos bacilisina, bacileno, difcidina y bacilomicina. Sin embargo, mientras ambos *Bacillus amyloliquefaciens* RTI301 y *Bacillus subtilis* RTI477 poseen el gen para la síntesis de subtilosina, este gen está ausente en el genoma de *Bacillus amyloliquefaciens* RTI472. La subtilosina es una bacteriocina, una clase de toxinas proteínicas producidas por bacterias para inhibir el crecimiento de cepas bacterianas similares o estrechamente relacionadas. Por lo tanto, se postuló que la subtilosina sintetizada por *Bacillus amyloliquefaciens* RTI301 podría ser el inhibidor del crecimiento de *Bacillus amyloliquefaciens* RTI472. En contraste, la cepa de *Bacillus subtilis* RTI477 no es inhibida por RTI301, porque la cepa RTI477 produce su propia subtilosina y, por lo tanto, es resistente al compuesto.

También se analizaron las diferencias en la morfología de la cepa entre las cepas de *Bacillus amyloliquefaciens* RTI301 y *Bacillus subtilis* RTI477. Las imágenes que muestran la morfología de cada una de estas cepas se muestran en la Figura 4: *Bacillus amyloliquefaciens* RTI301 (Figura 4A) y *Bacillus subtilis* RTI477 (FIG 4B). La morfología de las colonias de las cepas de *Bacillus amyloliquefaciens* RTI301 y *Bacillus subtilis* RTI477 mostradas en las Figura 4A-4B indican una diferencia potencial en el comportamiento de la cepa cuando se trata de motilidad. La motilidad es un rasgo clave para la colonización de la rizosfera por bacterias asociadas a plantas. *Bacillus amyloliquefaciens* RTI301

crece como colonias redondas bien definidas. A diferencia de, *Bacillus subtilis* RTI477 que crece como una colonia esponjosa, una morfología que es indicativa de movimiento en enjambre y motilidad. La movimiento en enjambre y la motilidad son fenotipos relevantes para la rápida colonización de la rizosfera y la superficie de la raíz de la planta. Nuevamente, sin limitarse a ningún mecanismo de acción particular, se postuló que el fenotipo de movimiento en enjambre fuerte asociado con la morfología de la cepa *Bacillus subtilis* RTI477 hace que esta cepa sea un colonizador más eficaz de la rizosfera que *Bacillus amyloliquefaciens* RTI301.

A la luz de la compatibilidad de crecimiento y las diferencias observadas en el fenotipo, la combinación de las cepas RTI301 y RTI477 se probó para determinar su capacidad de promover el crecimiento y la salud de las plantas. Se realizaron experimentos para determinar los efectos de la aplicación de las cepas *Bacillus subtilis* RTI477 y *Bacillus amyloliquefaciens* RTI301, solas y combinadas, a semillas de soja en germinación, desarrollo de raíces y crecimiento temprano de la planta. Los experimentos se realizaron como se describe en el Ejemplo 8 utilizando esporas de RTI301 y RTI477. Se añadieron combinaciones de las esporas RTI301 y RTI477 a las semillas a las razones de 1:3, 1:1 y 3:1. Los datos se muestran en la Tabla V. La inoculación de semillas de soja con *Bacillus amyloliquefaciens* RTI301 a concentraciones de 1×10^6 , 1×10^7 y 1×10^8 no tuvo efecto sobre el crecimiento de las plantas, y el desarrollo y la arquitectura de las raíces. La inoculación de semillas de soja con *Bacillus subtilis* RTI477 a las mismas concentraciones proporcionó solo una ligera mejora en la concentración más baja en el desarrollo y la arquitectura de las raíces. Sin embargo, la inoculación de semillas de soja con la combinación de RTI301 y RTI477 (en una razón de 1:3) dio como resultado, a todas las concentraciones probadas, una mejora en el desarrollo de la raíz y el crecimiento temprano de la planta. Los mejores resultados en el desarrollo de la raíz se observaron cuando RTI301 y RTI477 se aplicaron en una razón de 3:1 a una concentración de 1×10^6 UFC/ml. Las imágenes de los efectos positivos de la inoculación de la semilla con las esporas de RTI301 más RTI477 a esta razón de 3:1 se muestran en las Figura 5A y 5B (A - plantas de control; B - plantas inoculadas con RTI301 más RTI477 (razón 3:1) a 10^6 ufc/ml). Los efectos fueron especialmente positivos con respecto a la formación y la arquitectura de las raíces, como se muestra en las Figura 5A-5B. Los pelos finos de la raíz son importantes en la absorción de agua, nutrientes y la interacción de las plantas con otros microorganismos en la rizosfera. Estos resultados muestran que, si bien la aplicación de cepas individuales tuvo poco o ningún efecto en comparación con las plantas de control, el tratamiento de semillas con la aplicación de una combinación de las cepas *Bacillus subtilis* RTI477 y *Bacillus amyloliquefaciens* RTI301 proporcionaron un beneficio mayor al esperado para el crecimiento temprano y establecimiento de la soja. Se observaron los efectos sinérgicos de la combinación de las cepas *Bacillus subtilis* RTI477 y *Bacillus amyloliquefaciens* RTI301 y proporcionaron beneficios inesperados para el crecimiento de las plantas.

Se realizó un experimento adicional en soja para examinar el efecto del tratamiento de semillas con la combinación de las cepas RTI301 y RTI477 sobre el rendimiento. El experimento se estableció de la siguiente manera: 1) la semilla no se trató; 2) la semilla se trató con una combinación de CRUISERMAXX (tiametoxam, fludioxonil más metalaxil-M; SYNGENTA CROP PROTECTION, INC) y tiofanato metilo, que es un tratamiento típico de semillas de soja (la combinación de CRUISERMAXX y tiofanato metilo se conoce como "CHEM CONTROL"); 3) la semilla se trató con CHEM CONTROL más inoculación con $5,0 \times 10^{+5}$ ufc/semilla de la cepa RTI301; 4) la semilla se trató con CHEM CONTROL más inoculación con $5,0 \times 10^{+5}$ ufc/semilla de la cepa RTI477; 5) la semilla se trató con CHEM CONTROL más inoculación con una combinación de ambas cepas a $5,0 \times 10^{+5}$ ufc/semilla. Se realizaron diez estudios como 10 parcelas independientes y los resultados del rendimiento de soja (kilogramos por hectárea) se presentan en la Tabla VI. Los resultados en la Tabla VI muestran que la inoculación con cualquiera de *Bacillus amyloliquefaciens* RTI301 o *Bacillus subtilis* RTI477 solas no tuvo ningún efecto sobre el rendimiento general de la soja en comparación con las semillas que fueron tratadas con CHEM CONTROL solo. Como se observó en el experimento anterior, la inoculación con la combinación de *Bacillus amyloliquefaciens* RTI301 y *Bacillus subtilis* RTI477 proporcionó un efecto sinérgico y dio como resultado un aumento de 5% en el rendimiento de soja (de 3914,01 a 4109,04 kilogramos por hectárea). La combinación de las cepas *Bacillus subtilis* RTI477 y *Bacillus amyloliquefaciens* RTI301 proporcionó beneficios inesperados al rendimiento de soja.

El Ejemplo 9 describe los beneficios del tratamiento de semillas con una combinación de las cepas *Bacillus subtilis* RTI477 y *Bacillus amyloliquefaciens* RTI301 en maíz. Para el experimento en maíz, los datos se resumen en la Tabla VII y se estableció de la siguiente manera: 1) la semilla no se trató ("UTC"); 2) la semilla se trató con una combinación de 3 agentes químicos activos comúnmente utilizados, denominados "CHEM CONTROL" (o "CC"); y 3) la semilla se trató con CHEM CONTROL más una combinación de $5,0 \times 10^{+5}$ ufc/semilla de cada una de las cepas RTI301 y RTI477 ("CC+RTI 301/477 1:1"). Se realizaron dos estudios en condiciones de presión de enfermedades naturales o inoculación del suelo con *Rhizoctonia*. En particular, se observó un aumento del rendimiento de 719,59 kilogramos por hectárea y 4021,61 kilogramos por hectárea para la combinación 1:1 de RTI301 y RTI477 más el control químico sobre el control químico solo para la presión del patógeno natural y los estudios de campo en los que se inoculó *Rhizoctonia*, respectivamente. Estos datos indican que el tratamiento de la semilla con la combinación de estas cepas puede dar como resultado mejoras muy grandes en el rendimiento de maíz.

El Ejemplo 10 describe experimentos que muestran el efecto sobre la emergencia y el rendimiento en la soja cuando las semillas se tratan con una combinación de las cepas RTI301 y RTI477 además de agentes químicos activos para el control de patógenos. Específicamente, se estableció un experimento en soja de la siguiente manera: 1) la semilla no se trató (UTC); 2) la semilla se trató con una combinación de 3 agentes químicos activos comúnmente utilizados, denominados "CHEM CONTROL"; 3) la semilla se trató con VIBRANCE (ingrediente activo Sedaxane; SYNGENTA CROP PROTECTION, INC; y 4) la semilla se trató con CHEM CONTROL más $5,0 \times 10^{+5}$ ufc/semilla de cada una de las

cepas RTI301 y RTI477. Se realizaron dos estudios en los que se inocularon las semillas de la planta con *Rhizoctonia solani* en el momento de la plantación. Los resultados en la Tabla VIII muestran que el tratamiento con la combinación de *Bacillus amyloliquefaciens* RTI301 y *Bacillus subtilis* RTI477 además de CHEM CONTROL dio como resultado un aumento promedio en el rendimiento de 894,44 kilogramos por hectárea sobre el de CHEM CONTROL solo (de 3994,71 a 4889,15 kilogramos por hectárea). Por lo tanto, el tratamiento de semillas con la combinación de RTI301 y RTI477 proporciona una mejora significativa en los rendimientos de soja, incluso en condiciones de presión severa del patógeno.

El Ejemplo 11 describe los beneficios del riego por goteo con una combinación de las cepas *Bacillus subtilis* RTI477 y el *Bacillus amyloliquefaciens* RTI301 en calabacín, tomate y pimiento. La presión de la enfermedad causada por hongos transmitidos por el suelo no se registró en ninguno de los transectos. En el estudio de calabacín, las esporas se aplicaron a una tasa de $3,75 \times 10^{12}$ UFC/hectárea para *Bacillus amyloliquefaciens* RTI301 y $0,625 \times 10^{12}$ UFC/hectárea para *Bacillus subtilis* RTI477 en el momento de la plantación a través de la inundación de la zona de la raíz, sin aplicación adicional a través del riego por goteo. Se utilizó ACCOMPLISH LM (LOVELAND PRODUCTS) como control comercial y se aplicó de la misma manera que se describe para la combinación RTI301 + RTI477 a una tasa de 2.340 ml/Ha. Este producto contiene una mezcla de *Acidovorax facilis* (1×10^3 ufc/ml), *Bacillus licheniformis* (1×10^3 ufc/ml), *Bacillus subtilis* (1×10^3 ufc/ml), *Bacillus oleronius* (1×10^3 ufc/ml), *Bacillus marinus* (1×10^3 ufc/ml), *Bacillus megaterium* (1×10^3 ufc/ml), y *Rhodococcus rhodochrous* (1×10^3 ufc/ml). La adición de las esporas de RTI301 más RTI477 dio como resultado un aumento en el rendimiento tanto total como comercializable para calabacín en comparación con las plantas de control no tratadas en las que las esporas bacterianas no se incluyeron en la inundación, así como en comparación con las plantas de control comerciales. Específicamente, las plantas tratadas con RTI301+RTI477 dieron como resultado un total de 873,4 kg/Ha de calabacín, en comparación con 838,3 kg/Ha y 836,1 kg/Ha para las plantas de control no tratadas y las plantas tratadas con ACCOMPLISH, respectivamente, lo que representa un 4,2% y 4,5% de aumento respectivo en el peso total de calabacines. El aumento en el peso total de calabacines de las plantas tratadas con las esporas de *Bacillus amyloliquefaciens* RTI301 más *Bacillus subtilis* RTI477 en relación con las plantas de control no tratadas y las plantas tratadas con el patrón comercial demuestra el efecto de crecimiento positivo proporcionado por este tratamiento.

En el estudio en tomate, las esporas se aplicaron a una tasa de $0,625 \times 10^{12}$ UFC/hectárea para *Bacillus amyloliquefaciens* RTI301 y $3,75 \times 10^{12}$ UFC/hectárea para *Bacillus subtilis* RTI477 en el momento de la plantación a través de la inundación de la zona de la raíz, seguido de dos aplicaciones de goteo de la misma tasa a los 17 y 35 días después del trasplante. Se utilizó ACCOMPLISH LM como control comercial y se aplicó de la misma manera que se describe para la combinación RTI301 + RTI477 a una tasa de 2.340 ml/Ha. La adición de las esporas de RTI301 más RTI477 dio como resultado un aumento en el rendimiento tanto total como comercializable para los tomates en comparación con las plantas de control no tratadas en las que las esporas bacterianas no se incluyeron en la inundación y el riego, así como en comparación con las plantas de control comerciales. Específicamente, las plantas tratadas con RTI301 + RTI477 dieron como resultado un total de 21.824 kg/Ha de tomates comercializables, en comparación con 16.765 kg/Ha y 21.420 kg/Ha para las plantas de control no tratadas y las plantas tratadas con ACCOMPLISH, respectivamente, lo que representa un aumento respectivo de 30,2% y 1,9% en el peso de los tomates comercializables. El aumento sustancial en el peso de los tomates comercializables de las plantas tratadas con las esporas de *Bacillus amyloliquefaciens* RTI301 más *Bacillus subtilis* RTI477, especialmente en comparación con las plantas de control no tratadas, demuestra el efecto de crecimiento positivo proporcionado por este tratamiento.

En el estudio en pimiento (pimiento jalapeño), se aplicaron esporas a una tasa de $1,25 \times 10^{12}$ UFC/hectárea por cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* RTI301 y *Bacillus subtilis* RTI477 en el momento de la plantación a través de la inundación de la zona de la raíz, seguido de dos aplicaciones de goteo de la misma tasa 17 y 35 días después del trasplante. Se utilizó ACCOMPLISH LM como control comercial y se aplicó de la misma manera que se describe para la combinación RTI301 + RTI477 a una tasa de 2.340 ml/Ha. La adición de las esporas de RTI301 más RTI477 dio como resultado un aumento en el rendimiento de los pimientos jalapeños en comparación con las plantas de control no tratadas en las que no se aplicaron esporas bacterianas, así como en comparación con las plantas de control comerciales. Específicamente, las plantas tratadas con RTI301 + RTI477 dieron como resultado un total de 4.154 kg/Ha de pimientos comercializables, en comparación con 3.455 kg/Ha y 3.930 kg/Ha para las plantas de control no tratadas y las plantas tratadas con ACCOMPLISH, respectivamente, lo que representa un aumento respectivo de 20% y 5,7% en el peso de los pimientos comercializables. El aumento sustancial en el peso de los pimientos comercializables de las plantas tratadas con las esporas de *Bacillus amyloliquefaciens* RTI301 más *Bacillus subtilis* RTI477 en relación con las plantas de control no tratadas y las plantas tratadas con el patrón comercial demuestra el efecto de crecimiento positivo proporcionado por este tratamiento.

Los metabolitos antimicrobianos producidos por las cepas RTI301 y RTI477 se identifican en el Ejemplo 12 y se ilustran en la Figura 6. El Ejemplo 12 describe la investigación de los lipopéptidos cíclicos, Fengicinas y Deshidroxifengicinas, producidos por las cepas RTI301 y RTI477, y sorprendentemente, la identificación de varias clases de estas moléculas no referidas previamente. Se determinó que *Bacillus amyloliquefaciens* RTI301 produce los compuestos Fengicina A, B y C previamente referidos y los compuestos Deshidroxifengicina A, B y C. De manera inesperada, además de estos compuestos conocidos, se determinó que la cepa RTI301 también produce derivados no identificados previamente de estos compuestos donde la L-isoleucina en la posición 8 de la cadena del péptido cíclico (denominada X₃ en la Figura 6) se reemplaza por L-metionina. Las nuevas clases de Fengicina y Deshidroxifengicina se denominan en la presente memoria MA, MB y MC, en referencia a los derivados de las clases A, B y C en las que la L-isoleucina en X₃ en la

Figura 6 ha sido reemplazada por L-metionina. Las moléculas recientemente identificadas se muestran en la Figura 6 y en la Tabla IX en negrita. Los compuestos Fengicina MA, MB y MC recientemente identificados también se observaron para la cepa RTI477, sin embargo, no se observaron los correspondientes compuestos de Deshidroxifengicina MA, MB y MC para la cepa RTI477 (véase Tabla IX).

- 5 Se determinó adicionalmente que la cepa RTI301 produce una clase adicional de Fengicina y Deshidroxifengicina que no se ha identificado previamente. En esta clase, la L-isoleucina de Fengicina B y Deshidroxifengicina B (posición X₃ en la Figura 6) se reemplaza por L-homo-cisteína (Hcy). Estos metabolitos de Fengicina y Deshidroxifengicina previamente no identificados se denominan en la presente memoria Fengicina H y Deshidroxifengicina H y se muestran en la Figura 6 y en la Tabla IX. El compuesto de Fengicina H recientemente identificado también se observó para la
10 cepa RTI477, sin embargo, el compuesto de Deshidroxifengicina H correspondiente no se observó para la cepa RTI477 (Tabla IX).

- Se determinó adicionalmente que la cepa RTI301 produce una clase adicional de metabolitos de Fengicina y Deshidroxifengicina no identificados previamente. En esta clase, el aminoácido en la posición 4 de la estructura de la cadena principal del péptido cíclico (posición X₁ en la Figura 6) se reemplaza por L-isoleucina. Estos metabolitos
15 previamente no identificados se denominan en la presente memoria Fengicina I y Deshidroxifengicina I y se muestran en la Figura 6 y en la Tabla IX. Tanto los compuestos recientemente identificados de Fengicina I como Deshidroxifengicina I también se observaron para la cepa RTI477 (Tabla IX).

En las composiciones y métodos de la presente invención, la planta puede incluir soja o maíz y el beneficio para el crecimiento de la planta puede mostrarse mediante un aumento del rendimiento.

- 20 Las propiedades del segundo microorganismo que son beneficiosas para el crecimiento de la planta y/o la salud de la planta incluyen uno entre mayor rendimiento de la planta, mejor vigor de las plántulas, mejor desarrollo de la raíz, mejor crecimiento de la planta, mejor salud de la planta, mejor apariencia, mejor resistencia a los patógenos de las plantas, reducción de la infección patológica, o una combinación de las mismas. El patógeno de la planta puede incluir uno o una combinación de insectos, nematodos, hongos patógenos de plantas o bacterias patógenas de plantas.

- 25 En una realización, se proporciona una composición como se define en la presente memoria. La aplicación de la composición a la semilla de la planta, las raíces de la planta o al suelo que rodea la planta beneficia el crecimiento de la planta y/o la salud de la planta.

- Como se utiliza en la presente memoria, la frase "un cultivo biológicamente puro de una cepa bacteriana" se refiere a una o una combinación de: esporas del cultivo de fermentación biológicamente puro de una cepa bacteriana, células vegetativas del cultivo de fermentación biológicamente puro de una cepa bacteriana, uno o más productos del cultivo de fermentación biológicamente puro de una cepa bacteriana, un cultivo sólido del cultivo de fermentación biológicamente puro de una cepa bacteriana, un sobrenadante de cultivo del cultivo de fermentación biológicamente puro de una cepa bacteriana, un extracto del cultivo de fermentación biológicamente puro de la cepa bacteriana y uno o más metabolitos del cultivo de fermentación biológicamente puro de una cepa bacteriana.

- 35 En una realización, las composiciones están en forma de una matriz de plantación. La matriz de plantación puede estar en forma de suelo para macetas.

En una realización, las composiciones incluyen adicionalmente uno o una combinación de un portador, un dispersante o un extracto de levadura.

- 40 En una realización, las composiciones comprenden adicionalmente uno o una combinación de un insecticida, fungicida, nematicida, bactericida, herbicida, extracto de plantas, regulador de crecimiento de plantas o fertilizantes microbianos, biológicos o químicos presentes en una cantidad adecuada para beneficiar el crecimiento de las plantas y/o para conferir protección contra una infección patológica en la planta.

En una realización, la composición como se define en la presente memoria incluye un insecticida de bifentrina.

- 45 En una realización, la composición y el insecticida de bifentrina están en una formulación compatible con un fertilizante líquido. La formulación compatible con un fertilizante líquido puede comprender un silicato de aluminio y magnesio hidratado y al menos un dispersante. El insecticida de bifentrina puede estar presente a una concentración que varía de 0,1 g/ml a 0,2 g/ml. El insecticida de bifentrina puede estar presente a una concentración de aproximadamente 0,1715 g/ml. Se pretende que el término "en una formulación compatible con un fertilizante líquido" como se utiliza en toda la memoria descriptiva y las reivindicaciones signifique que la formulación es susceptible de disolución o
50 dispersión o emulsión en una solución acuosa para permitir la mezcla con un fertilizante para el suministro a las plantas en una formulación líquida.

- En una realización, se proporciona un método para beneficiar el crecimiento de la planta y/o la salud de la planta como se define en la presente memoria *NOTA, opcionalmente en forma de una combinación de: una primera composición que comprende un cultivo biológicamente puro de un *Bacillus amyloliquefaciens* RTI301 depositado como ATCC Núm. PTA-121165; y una segunda composición que comprende un cultivo biológicamente puro de un *Bacillus subtilis* RTI477
55 depositado como ATCC Núm. PTA-121167, en donde la administración de la combinación beneficia el crecimiento de

la planta y/o la salud de la planta.

Las composiciones que comprenden los microorganismos pueden estar en forma de un líquido, una dispersión en aceite, un espolvoreable, un polvo mojable seco, un gránulo dispersable o un gránulo mojable seco. Los microorganismos pueden estar presentes en forma de esporas o células vegetativas. La composición puede estar en forma de un líquido y cada uno de *Bacillus subtilis* RTI477 y *Bacillus amyloliquefaciens* RTI301 puede estar presente a una concentración de aproximadamente $1,0 \times 10^8$ UFC/ml a aproximadamente $1,0 \times 10^{12}$ UFC/ml. La composición puede estar en forma de un espolvoreable, un polvo mojable seco, un gránulo dispersable o un gránulo mojable seco y cada uno de *Bacillus subtilis* RTI477 y *Bacillus amyloliquefaciens* RTI301 puede estar presente en una cantidad de aproximadamente $1,0 \times 10^8$ UFC/g a aproximadamente $1,0 \times 10^{12}$ UFC/g. La composición puede estar en forma de una dispersión en aceite y cada uno de *Bacillus subtilis* RTI477 y *Bacillus amyloliquefaciens* RTI301 puede estar presente a una concentración de aproximadamente $1,0 \times 10^8$ UFC/ml a aproximadamente $1,0 \times 10^{12}$ UFC/ml.

Las composiciones que comprenden los microorganismos pueden comprender adicionalmente uno o una combinación de un portador, un dispersante o un extracto de levadura.

En una realización, se proporciona una semilla de planta que está recubierta con una composición como se define en la presente memoria.

En una realización, se proporciona una semilla de planta recubierta con una composición para beneficiar el crecimiento de la planta y/o la salud de la planta, comprendiendo la composición: esporas de un cultivo biológicamente puro de *Bacillus amyloliquefaciens* RTI301 depositado como ATCC Núm. PTA-121165; y esporas de un cultivo biológicamente puro de *Bacillus subtilis* RTI477 depositado como ATCC Núm. PTA-121167, presentes en una cantidad adecuada para beneficiar el crecimiento de la planta y/o la salud de la planta.

En una realización, el *Bacillus subtilis* RTI477 y el *Bacillus amyloliquefaciens* RTI301 están presentes cada uno en una cantidad que varía de aproximadamente $1,0 \times 10^2$ UFC/semilla a aproximadamente $1,0 \times 10^9$ UFC/semilla.

En una realización, la semilla de la planta comprende adicionalmente uno o una combinación de un insecticida, fungicida, nematocida, bactericida, herbicida, extracto de plantas, regulador de crecimiento de plantas o fertilizante microbiano, biológico o químico presente en una cantidad adecuada para beneficiar el crecimiento de la planta y/o para conferir protección contra una infección patogénica en la planta. En una realización, el insecticida comprende bifentrina.

En una realización, se proporciona una semilla de planta, en donde la semilla de la planta está recubierta con una composición como se define en la presente memoria, y con un insecticida de bifentrina.

En una realización, se proporciona un método para beneficiar el crecimiento de la planta y/o la salud de la planta, comprendiendo el método plantar una semilla de una planta en un medio de crecimiento adecuado, en donde la semilla se ha recubierto con una composición que comprende: esporas de un cultivo biológicamente puro de *Bacillus amyloliquefaciens* RTI301 depositado como ATCC Núm. PTA-121165; y esporas de un cultivo biológicamente puro de *Bacillus subtilis* RTI477 depositado como ATCC Núm. PTA-121167f, en donde el recubrimiento que comprende las esporas de RTI301 y de RTI477 beneficia el crecimiento de la planta y/o la salud de la planta.

La semilla recubierta de la presente invención puede ser una semilla de una amplia variedad de plantas que incluye, por ejemplo, la semilla de monocotiledóneas, dicotiledóneas, Cereales, Maíz, Maíz dulce, Maíz para palomitas, Maíz de semilla, Maíz ensilado, Maíz de campo, Arroz, Cebada, Sorgo, Hortalizas del género Brassica, Brócoli, Col, Coliflor, Coles de Bruselas, Berza, Col rizada, Hojas de mostaza, Colinabo, Hortalizas de Bulbo, Cebolla, Ajo, Chalotas, Hortalizas de fruto, Pimiento, Tomate, Tomate cherry enano, Tomatillo, Okra, Uva, Hierbas/Especias, Hortalizas del género Cucurbitáceas, Pepino, Cantalupo, Melón, Melón almizcleño, Calabacín, Sandía, Calabaza, Berenjena, Hortalizas de hoja, Lechuga, Apio, Espinacas, Perejil, Achicoria, Legumbres/Hortalizas (judías y guisantes suculentos y secos), Judías, Judías verdes, Abichuelas, Habas, Soja, Judías secas, Garbanzos, Alubias de Lima, Guisantes, Judías pintas, Guisantes partidos, Lentejas, Cultivos de semillas oleaginosas, Canola, Ricino, Algodón, Lino, Cacahuete, Colza, Cártamo, Sésamo, Girasol, Soja, Hortalizas de Raíz/Tubérculos y Bulbo, Zanahoria, Patata, Batata, Remolacha, Jengibre, Rábano picante, Rábano, Ginseng, Nabo, caña de azúcar, remolacha azucarera, Hierba y Césped.

La semilla recubierta de la planta puede ser maíz o soja y el beneficio para el crecimiento de la planta puede mostrarse con un mayor rendimiento.

Para las semillas recubiertas de las plantas, las propiedades del segundo microorganismo beneficioso para el crecimiento de las plantas y/o la salud de las plantas incluyen uno o más entre mayor rendimiento, mayor vigor de las plántulas, mejor desarrollo de las raíces, mejor crecimiento de las plantas, mejor salud de las plantas, mejor apariencia, mejor resistencia a patógenos de las plantas, o reducción de la infección patogénica, o una combinación de los mismos. El patógeno de la planta puede incluir uno o una combinación de insectos, nematodos, hongos patógenos de plantas o bacterias patógenas de plantas.

El primer y segundo microorganismos de la composición que recubren la semilla de la planta se definen en la presente

memoria. El crecimiento del segundo microorganismo puede ser más rápido que el del primer microorganismo y el segundo microorganismo puede caracterizarse por un fenotipo de movimiento en enjambre y de alta motilidad. La composición que recubre la semilla de la planta puede incluir una cantidad de esporas de cada uno del primer microorganismo y el segundo microorganismo de aproximadamente $1,0 \times 10^2$ UFC/semilla a aproximadamente $1,0 \times 10^9$ UFC/semilla.

Para la composición y el método que incluyen uno o más agentes químicos activos, las propiedades del microorganismo beneficioso para el crecimiento de las plantas y/o la salud de las plantas pueden incluir un mayor rendimiento, un mejor vigor de las plántulas, un mejor desarrollo de las raíces, un mejor crecimiento de las plantas, una mejor salud de las plantas, una mejor apariencia, una mejor resistencia a patógenos de plantas, una reducción de la infección patológica, o una combinación de los mismos. Los patógenos de las plantas pueden incluir uno o una combinación de insectos, nematodos, hongos patógenos de las plantas o bacterias patógenas de las plantas.

Los uno o más agentes químicos activos para crear el nicho pueden incluir, por ejemplo, pero no se limitan a, estrobilurina, un triazol, flutriafol, tebuconazol, prototiaconazol, expoxiconazol, fluopiram, clorotalonil, tiofanato metilo, un fungicida a base de cobre, fungicida de hidróxido de cobre, un fungicida a base de EDBC, mancozeb, un fungicida de succinasa deshidrogenasa (SDHI), bixafen, iprodiona, dimetomorf o valifenalato. En otro ejemplo, los uno o más agentes químicos activos pueden incluir un fumigante tal como, por ejemplo, cloropicrina, Dazomet, 1,3 dicloropropeno (Telone), disulfuro de dimetilo, metam sodio/potasio, bromuro de metilo.

Las composiciones pueden incluir adicionalmente uno o una combinación de un insecticida, fungicida, nematocida, bactericida, herbicida, extracto de plantas, regulador de crecimiento de plantas o fertilizantes microbianos, biológicos o químicos presentes en una cantidad adecuada para beneficiar el crecimiento de las plantas y/o para conferir protección contra una infección patológica en la planta.

En una realización, el fungicida puede incluir un extracto de *Lupinus albus doce*. En una realización, el fungicida puede incluir un polipéptido BLAD. El polipéptido BLAD puede ser un fragmento de la proteína de almacenamiento de semillas de origen natural de altramuza dulce (*Lupinus albus doce*) que actúa sobre los patógenos fúngicos susceptibles al causar daño a la pared celular fúngica e interrumpir la membrana celular interna. Las composiciones pueden incluir aproximadamente 20% del polipéptido BLAD.

En una realización, el insecticida puede comprender bifentrina. El nematocida puede comprender cadusafos. La composición puede formularse como un líquido, un polvo, un gránulo soluble mojable o como gránulos dispersables. El insecticida puede comprender bifentrina y clotianidina. El insecticida puede comprender bifentrina y clotianidina y la composición puede formularse para su compatibilidad con un fertilizante líquido. El insecticida puede comprender bifentrina o zeta-cipermetrina.

El nematocida puede comprender cadusafos. El insecticida puede comprender bifentrina y clotianidina. La composición puede formularse como un líquido y el insecticida puede comprender bifentrina o zeta-cipermetrina.

En una realización, el método puede incluir adicionalmente aplicar un fertilizante líquido a: suelo o medio de crecimiento que rodea la planta; suelo o medio de crecimiento antes de sembrar semillas de la planta en el suelo o medio de crecimiento; o suelo o medio de crecimiento antes de plantar la planta en el suelo o medio de crecimiento.

En una realización, la composición de bifentrina puede comprender: bifentrina; un silicato de aluminio y magnesio hidratado; y al menos un dispersante seleccionado entre un éster de sacarosa, un lignosulfonato, un alquilpoliglicósido, un producto condensado de ácido naftalenosulfónico y formaldehído y un éster fosfato.

La bifentrina puede estar presente preferiblemente en una concentración de 1,0% en peso a 35% en peso, más particularmente, de 15% en peso a 25% en peso basándose en el peso total de todos los componentes en la composición. La composición insecticida de bifentrina puede estar presente en la formulación líquida a una concentración que varía de 0,1 g/ml a 0,2 g/ml. El insecticida de bifentrina puede estar presente en la formulación líquida a una concentración de aproximadamente 0,1715 g/ml.

El dispersante o dispersantes pueden estar presentes preferiblemente en una concentración total de aproximadamente 0,02% en peso a aproximadamente 20% en peso basándose en el peso total de todos los componentes en la composición.

En algunas realizaciones, el silicato de aluminio y magnesio hidratado puede seleccionarse del grupo que consiste en montmorillonita y atapulgita.

En algunas realizaciones, el éster fosfato puede seleccionarse entre un éster fosfato de nonilfenol y una sal de potasio de fosfato etoxilado de alcohol tridecílico.

Otras realizaciones pueden incluir adicionalmente al menos uno de un agente anticongelante, un agente antiespumante y un biocida.

En una realización, se proporciona una composición para beneficiar el crecimiento de la planta, la composición como

se define en la presente memoria y un insecticida, en donde la composición está en una formulación compatible con un fertilizante líquido. El insecticida puede ser uno o una combinación de piretroides, bifentrina, teflutrina, zeta-cipermetrina, organofosfatos, cloretoxifos, clorpirifos, tebupirimfos, ciflutrina, fiproles, fipronil, nicotinoides o clotianidina. El insecticida puede incluir bifentrina. La composición puede incluir un insecticida de bifentrina y un silicato de aluminio y magnesio hidratado y al menos un dispersante. El insecticida de bifentrina puede estar presente en una concentración que varía de 0,1 g/ml a 0,2 g/ml. El insecticida de bifentrina puede estar presente a una concentración de aproximadamente 0,1715 g/ml.

Además, los insecticidas, herbicidas, fungicidas y nematocidas adecuados de las composiciones y métodos de la presente invención pueden incluir los siguientes:

- 10 Insecticidas: A0) varios insecticidas, que incluyen agrigata, al-fosfuro, amblyseius, aphelinus, aphidius, aphidoletes, artimisinina, NPV de autographa californica, azociclotin, *Bacillus subtilis*, *Bacillus thuringiensis*-spp. *aizawai*, *Bacillus thuringiensis* spp. *Kurstaki*, *Bacillus thuringiensis*, *Beauveria*, *Beauveria bassiana*, betaciflutrina, productos biológicos, bisultap, broflutrinato, bromofos-e, bromopropilato, Bt-Maíz-GM, Bt-Soja-GM, capsaicina, cartap, extracto de celastro, clorantraniliprol, clorbenzuron, cloretoxifos, clorfluaazon, cniadiadin, criolita, cianofos, ciantraniliprol, cihalotrina, cihexatina, cipermetrina, dactusa, DCIP, dicloropropeno, dicofol, diglifus, diglifus + dactusa, dimetacarb, ditioeter, dodecil-acetato, emamectina, encarsia, EPN, etilén-dibromuro, eucaliptol, ácidos grasos/sales, fenazaquin, fenobucarb (BPMC), fenpiroximato, flubrocitrinato, flufenzina, formetanato, formotion, furatiocarb, gamma-cihalotrina, zumo de ajo, granulosis-virus, harmonia, NPV de heliothis armigera, bacteria inactiva, ácido indol-3-ilbutírico, yodometano, hierro, isocarbofos, isofenfos, isofenfos-m, isoprocarb, isotioato, caolín, lindano, liuyangmicina, matrina, mefosfolan, metaldehído, metarhizium-anisopliae, metamidofos, metolcarb (MTMC), aceite mineral, mirex, m-isotiocianato, monosultap, myrothecium verrucaria, naled, neochrysocharis formosa, nicotina, nicotinoides, aceite, ácido oleico, ometoato, orius, oximatrina, paecilomyces, aceite de parafina, paratión-e, pasteuria, aceite de petróleo, feromonas, ácido de fósforo, photorhabdus, foxim, phytoseiulus, pirimifos-e, aceite vegetal, GV de plutella xylostella, virus de poliedrosis, extractos de polifenoles, oleato de potasio, profenofos, prosuler, protiofos, piraclofos, piretrinas, piridafentión, pirimidifen, piriproxifen, extracto de quillay, quinometionato, aceite de colza, rotenona, saponina, saponozit, compuestos de sodio, fluosilicato de sodio, almidón, steinernema, estreptomices, sulfluramida, azufre, tebupirimfos, teflutrina, temefos, tetradifón, tiofanox, thiometon, transgénicos (p. ej., Cry3Bb1), triazamato, trichoderma, trichogramma, triflumuron, verticillium, vertrina, insecticidas isoméricos (p. ej., Kappa-bifentrina, kappa-teflutrina), dicloromezotiaz, broflanilida, pirazifluid; A1) la clase de carbamatos, que incluye aldicarb, alanicarb, benfuracarb, carbarilo, carbofuran, carbosulfan, metiocarb, metomilo, oxamilo, pirimicarb, propoxur y tiodicarb; A2) la clase de organofosforados, que incluye acefato, azinfos-etilo, azinfos-metilo, clorfeninfos, clorpirifos, clorpirifos-metilo, demeton-S-metilo, diazinón, diclorvos/DDVP, dicrotofos, dimetoato, disulfotón, etión, fenitrothion, fentión, isoxatión, malatión, metamidafos, metidatión, mevinfos, monocrotofos, oximetato, oxidemetón-metilo, paratión, paratión-metilo, fentoato, forato, fosalona, fosmet, fosfamidón, pirimifos-metilo, quinalfos, terbufos, tetraclorinfos, triazofos y triclorfón; A3) la clase de compuestos organoclorados de ciclodieno tal como endosulfán; A4) la clase de fiproles, que incluye etiprol, fipronil, pirafiprol y piriprol; A5) la clase de neonicotinoides, que incluye acetamiprid, clotianidina, dinotefuran, imidacloprid, nitenpiram, tiacloprid y tiametoxam; A6) la clase de espinosinas tales como spinosad y spinetoram; A7) activadores de canales de cloruro de la clase de mectinas, que incluyen abamectina, benzoato de emamectina, ivermectina, lepmectina y milbemectina; A8) imitadores de hormonas juveniles tales como hidropreno, kinopreno, metopreno, fenoxycarb y piriproxifen; A9) bloqueadores selectivos de alimentación homoptera tales como pimetrozina, flonicamid y pirifluquinazon; A10) inhibidores del crecimiento de ácaros tales como clofentezina, hexitiazox y etoxazol; A11) inhibidores de la ATP sintasa mitocondrial tales como diafenthiuron, óxido de fenbutatina y propargita; desacopladores de fosforilación oxidativa tales como clorfenapir; A12) bloqueadores de los canales del receptor nicotínico de acetilcolina tales como bensultap, hidrocloreto de cartap, tiociclam y tiosultap sódico; A13) inhibidores de la biosíntesis de quitina tipo 0 de la clase de benzourea, que incluyen bistrifluron, diflufenzuron, flufenoxuron, hexaflumuron, lufenuron, novaluron y teflubenzuron; A14) inhibidores de la biosíntesis de quitina tipo 1 tal como buprofezin; A15) disruptores de muda tales como cromazina; A16) agonistas del receptor de ecdisona tales como metoxifenozida, tebufenozida, halofenozida y cromafenozida; A17) agonistas del receptor de octopamina tales como amitraz; A18) inhibidores del transporte de electrones del complejo mitocondrial piridaben, tebufenpirad, tolfenpirad, flufenimer, cienopirafen, ciflumetofen, hidrametilnon, acequinocilo o fluacipirim; A19) bloqueadores de los canales de sodio dependientes de voltaje como indoxacarb y metaflumizona; A20) inhibidores de la síntesis de lípidos tales como spirotetramat, spiromesifen y spirotetramat; A21) moduladores del receptor de rianodina de la clase de diamidas, que incluyen la flubendiamida, los compuestos de ftalamida (R)-3-Cloro-N1-{2-metil-4-[1,2,2,2-tetrafluor-1-(trifluorometil)etil]fenil}-N2-(1-metil-2-metilsulfonietil)ftalamida y (S)-3-Cloro-N1-{2-metil-4-[1,2,2,2-tetrafluor-1-(trifluorometil)etil]fenil}-N2-(1-metil-2-metilsulfonietil)ftalamida, clorantiraniliprol y ciantraniliprol; A22) compuestos de modo de acción desconocido o incierto tal como azadiractina, amidoflomet, bifenazato, fluensulfona, butóxido de piperonilo, piridialilo, sulfoxaflo; o A23) moduladores de los canales de sodio de la clase de piretroides, que incluyen acrinatrina, aletrina, bifentrina, ciflutrina, lambda-cihalotrina, cipermetrina, alfa-cipermetrina, beta-cipermetrina, zeta-cipermetrina, deltametrina, esfenvalerato, etofenprox, fenpropatrina, fenvalerato, flucitrinato, tau-fluvalinato, permetrina, silafluofeno y tralometrina.

Fungicidas: B0) benzovindiflupir, anitiperonosporic, ametoctradin, amisulbrom, sales de cobre (p. ej., hidróxido de cobre, oxiclouro de cobre, sulfato de cobre, persulfato de cobre), boscalida, tilmazida, flutianil, furalaxilo, tiabendazol, benodanil, mepronilo, isofetamid, fenfuram, bixafen, fluxapiraxad, penflufen, sedaxano, coumoxistrobina,

enoxastrobina, flufenoxistrobina, piraioxistrobina, pirametostrobina, triclopíricarb, fenaminstrobina, metominostrobina, piriencarb, meptildinocap, acetato de fentin, cloruro de fentin, hidróxido de fentin, oxitetraciclina, clozolinato, cloroneb, tecnaceno, etridiazol, yodocarb, protiocarb, *Bacillus subtilis* syn., *Bacillus amyloliquefaciens* (p. ej., cepas QST 713, FZB24, MBI600, D747), extracto de *Melaleuca alternifolia*, pirisoxazol, oxpoconazol, etaconazol, fenpirazamina, naftifina, terbinafina, validamicina, pirimorf, valifenalato, ftalida, probenazol, isotianil, laminarina, extracto de *Reynoutria sachalinensis*, ácido y sales fosfóricas, tecloftalam, triazoxida, piriofenona, aceites orgánicos, bicarbonato de potasio, clorotalonil, fluoroimida; B1) azoles, que incluyen bitertanol, bromuconazol, ciproconazol, difenoconazol, diniconazol, enilconazol, epoxiconazol, fluquinconazol, fenbuconazol, flusilazol, flutriafol, hexaconazol, imibenconazol, ipconazol, metconazol, miclobutanil, penconazol, propiconazol, protioconazol, simeconazol, triadimefon, triadimenol, tebuconazol, tetraconazol, triticonazol, procloraz, pefurazoato, imazalil, triflumizol, ciazofamida, benomilo, carbendazim, tia-bendazol, fuberidazol, etaboxam, etridiazol e himexazol, azaconazol, diniconazol-M, oxpoconazol, paclobutrazol, uniconazol, 1-(4-cloro-fenil)-2-([1,2,4]triazol-1-il)-cicloheptanol e imazalilsulfato; B2) estrobilurinas, que incluyen azoxistrobina, dimoxistrobina, enestrobina, fluoxastrobina, kresoxim-metilo, metominostrobina, orisastrobina, picoxistrobina, piractrostrobina, trifloxistrobina, enestrobina, (2-cloro-5-[1-(3-metilbenciloxiimino)etil]bencil)carbamato de metilo, (2-cloro-5-[1-(6-metilpiridin-2-ilmetoxiimino)etil]bencil)carbamato de metilo y 2-(orto-(2,5-dimetilfeniloximetileno)-fenil)-3-metoxiacrilato de metilo, 2-(2-(6-(3-cloro-2-metil-fenoxi)-5-fluoro-pirimidin-4-iloxi)-fenil)-2-metoxiimino-N-metil-acetamida de metilo y éster metílico de ácido 3-metoxi-2-(2-(N-(4-metoxi-fenil)-ciclopropanocarboximidolsulfanilmetil)-fenil)-acrílico; B3) carboxamidas, que incluyen carboxina, benalaxilo, benalaxil-M, fenhexamida, flutolanil, furametpir, mepronil, metalaxil, mfenoxam, ofurace, oxadixyl, oxicarboxina, pentiopirad, isopirazam, tfluzamida, tiadinil, 3,4-dicloro-N-(2-cianofenil)isotiazol-5-carboxamida, dimetomorf, flumorf, flumetover, fluopicolida (picobenzamid), zoxamida, carpropamid, diclocimet, mandipropamid, N-(2-(4-[3-(4-clorofenil)prop-2-iniloxi]-3-metoxifenil)etil)-2-metanosulfonil-amino-3-metilbutiramida, N-(2-(4-[3-(4-clorofenil)prop-2-iniloxi]-3-metoxi-fenil)etil)-2-etanosulfonil-amino-3-metilbutiramida, 3-(4-clorofenil)-3-(2-isopropoxycarbonil-amino-3-metil-butirilamino)propionato de metilo, N-(4'-bromobifenil-2-il)-4-difluorometil-3-metiltiazol-5-carboxamida, N-(4'-trifluorometil-bifenil-2-il)-4-difluorometil-2-metiltiazol-5-carboxamida, N-(4'-cloro-3'-fluorobifenil-2-il)-4-difluorometil-2-metil-tiazol-5-carboxamida, N-(3',4'-dicloro-4-fluorobifenil-2-il)-3-difluoro-metil-1-metil-pirazol-4-carboxamida, N-(3',4'-dicloro-5-fluorobifenil-2-il)-3-difluorometil-1-metilpirazol-4-carboxamida, N-(2-ciano-fenil)-3,4-dicloroisotiazol-5-carboxamida, 2-amino-4-metil-tiazol-5-carboxanilida, 2-cloro-N-(1,1,3-trimetil-indan-4-il)-nicotinamida, N-(2-(1,3-dimetilbutil)-fenil)-1,3-dimetil-5-fluoro-1H-pirazol-4-carboxamida, N-(4'-cloro-3',5-difluoro-bifenil-2-il)-3-difluorometil-1-metil-1H-pirazol-4-carboxamida, N-(4'-cloro-3',5-difluoro-bifenil-2-il)-3-trifluorometil-1-metil-1H-pirazol-4-carboxamida, N-(3',4'-dicloro-5-fluoro-bifenil-2-il)-3-trifluorometil-1-metil-1H-pirazol-4-carboxamida, N-(3',5-difluoro-4'-metil-bifenil-2-il)-3-difluorometil-1-metil-1H-pirazol-4-carboxamida, N-(3',5-difluoro-4'-metil-bifenil-2-il)-3-trifluorometil-1-metil-1H-pirazol-4-carboxamida, N-(cis-2-biciclopropil-2-il-fenil)-3-difluorometil-1-metil-1H-pirazol-4-carboxamida, N-(trans-2-biciclopropil-2-il-fenil)-3-difluoro-metil-1-metil-1H-pirazol-4-carboxamida, fluopiram, N-(3-etil-3,5,5-trimetil-ciclohexil)-3-formilamino-2-hidroxi-benzamida, oxitetraciclina, siltiofam, N-(6-metoxi-piridin-3-il) ciclopropanocarboxamida, 2-yodo-N-fenil-benzamida, N-(2-biciclo-propil-2-il-fenil)-3-difluorometil-1-metilpirazol-4-ilcarboxamida, N-(3',4',5'-trifluorobifenil-2-il)-1,3-dimetilpirazol-4-ilcarboxamida, N-(3',4',5'-trifluorobifenil-2-il)-1,3-dimetil-5-fluoropirazol-4-ilcarboxamida, N-(3',4',5'-trifluorobifenil-2-il)-5-cloro-1,3-dimetil-pirazol-4-ilcarboxamida, N-(3',4',5'-trifluorobifenil-2-il)-3-fluorometil-1-metilpirazol-4-ilcarboxamida, N-(3',4',5'-trifluorobifenil-2-il)-3-(clorodifluorometil)-1-metilpirazol-4-ilcarboxamida, N-(3',4',5'-trifluorobifenil-2-il)-1-metil-3-trifluorometilpirazol-4-ilcarboxamida, N-(3',4',5'-trifluorobifenil-2-il)-5-fluoro-1-metil-3-trifluorometilpirazol-4-ilcarboxamida, N-(3',4',5'-trifluorobifenil-2-il)-5-cloro-1-metil-3-trifluorometilpirazol-4-ilcarboxamida, N-(2',4',5'-trifluorobifenil-2-il)-1,3-dimetilpirazol-4-ilcarboxamida, N-(2',4',5'-trifluorobifenil-2-il)-1,3-dimetil-5-fluoropirazol-4-ilcarboxamida, N-(2',4',5'-trifluorobifenil-2-il)-5-cloro-1,3-dimetilpirazol-4-ilcarboxamida, N-(2',4',5'-trifluorobifenil-2-il)-3-fluorometil-1-metilpirazol-4-ilcarboxamida, N-(2',4',5'-trifluorobifenil-2-il)-3-(clorodifluorometil)-1-metilpirazol-4-ilcarboxamida, N-(2',4',5'-trifluorobifenil-2-il)-3-difluorometil-1-metilpirazol-4-ilcarboxamida, N-(2',4',5'-trifluorobifenil-2-il)-3-difluorometil-5-fluoro-1-metilpirazol-4-ilcarboxamida, N-(2',4',5'-trifluorobifenil-2-il)-5-cloro-3-difluorometil-1-metilpirazol-4-ilcarboxamida, N-(2',4',5'-trifluorobifenil-2-il)-1-metil-3-trifluorometilpirazol-4-ilcarboxamida, N-(2',4',5'-trifluorobifenil-2-il)-5-fluoro-1-metil-3-trifluorometilpirazol-4-ilcarboxamida, N-(3',4'-dicloro-3-fluorobifenil-2-il)-1-metil-3-trifluorometil-1H-pirazol-4-carboxamida, N-(3',4'-dicloro-3-fluorobifenil-2-il)-1-metil-3-difluorometil-1H-pirazol-4-carboxamida, N-(3',4'-difluoro-3-fluorobifenil-2-il)-1-metil-3-trifluorometil-1H-pirazol-4-carboxamida, N-(3'-cloro-4'-fluoro-3-fluorobifenil-2-il)-1-metil-3-difluorometil-1H-pirazol-4-carboxamida, N-(3',4'-difluoro-4-fluorobifenil-2-il)-1-metil-3-trifluorometil-1H-pirazol-4-carboxamida, N-(3'-cloro-4'-fluoro-4-fluorobifenil-2-il)-1-metil-S-difluorometil-1H-pirazol-4-carboxamida, N-(3',4'-dicloro-5-fluorobifenil-2-il)-1-metil-3-trifluorometil-1H-pirazol-4-carboxamida, N-(3',4'-difluoro-5-fluorobifenil-2-il)-1-metil-3-trifluorometil-1H-pirazol-4-carboxamida, N-(3',4'-difluoro-5-fluorobifenil-2-il)-1-metil-3-difluorometil-1H-pirazol-4-carboxamida, N-(3',4'-dicloro-5-fluorobifenil-2-il)-1-metil-S-difluorometil-1H-pirazol-4-carboxamida, N-(3',4'-difluoro-5-fluorobifenil-2-il)-1,3-dimetil-1H-pirazol-4-carboxamida, N-(3'-cloro-4'-fluoro-5-fluorobifenil-2-il)-1-metil-3-difluorometil-1H-pirazol-4-carboxamida, N-(4'-fluoro-4-fluorobifenil-2-il)-1-metil-3-trifluorometil-1H-pirazol-4-carboxamida, N-(4'-fluoro-5-fluorobifenil-2-il)-1-metil-3-trifluorometil-1H-pirazol-4-carboxamida,

- carboxamida, N-(4'-cloro-5-fluorobifenil-2-il)-1-metil-3-trifluorometil-1H-pirazol-4-carboxamida, N-(4'-metil-5-fluorobifenil-2-il)-1-metil-3-trifluorometil-1H-pirazol-4-carboxamida, N-(4'-fluoro-5-fluorobifenil-2-il)-1,3-dimetil-1H-pirazol-4-carboxamida, N-(4'-cloro-5-fluorobifenil-2-il)-1,3-dimetil-1H-pirazol-4-carboxamida, N-(4'-metil-5-fluorobifenil-2-il)-1,3-dimetil-1H-pirazol-4-carboxamida, N-(4'-fluoro-6-fluorobifenil-2-il)-1-metil-3-trifluorometil-1H-pirazol-4-carboxamida, N-(4'-cloro-6-fluorobifenil-2-il)-1-metil-3-trifluorometil-1H-pirazol-4-carboxamida, N-[2-(1,1,2,3,3,3-hexafluoropropoxi)-fenil]-3-difluorometil-1-metil-1H-pirazol-4-carboxamida, N-[4'-(trifluorometiltio)-bifenil-2-il]-3-difluorometil-1-metil-1H-pirazol-4-carboxamida y N-[4'-(trifluorometiltio)-bifenil-2-il]-1-metil-3-trifluorometil-1-metil-1H-pirazol-4-carboxamida; B4) compuestos heterocíclicos, que incluyen fluazinam, pirifenox, bupirimate, ciprodinil, fenarimol, ferimzone, mepanipirim, nuarimol, pirimetanil, triforina, fenciclonil, fludioxonil, aldimorf, dodemorf, fenpropimorf, tridemorf, fenpropidin, iprodione, procimidona, vinclozolin, famoxadona, fenamidona, octilina, probenazol, 5-cloro-7-(4-metil-piperidin-1-il)-6-(2,4,6-trifluorofenil)-[1,2,4]triazolo[1,5-a] pirimidina, anilazina, diclomezina, piroquilon, proquinazida, tricicazol, 2-butoxi-6-yodo-3-propilcromeno-4-ona, acibenzolar-S-metilo, captafol, captan, dazomet, folpet, fenoxanil, quinoxifen, N,N-dimetil-3-(3-bromo-6-fluoro-2-metilindol-1-sulfonil)-[1,2,4]triazol-1-sulfonamida, 5-etil-6-octil-[1,2,4]triazolo[1,5-a]pirimidin-2,7-diamina, 2,3,5,6-tetracloro-4-metanosulfonil-piridina, 3,4,5-tricloro-piridin-2,6-di-carbonitrilo, N-(1-(5-bromo-3-cloro-piridin-2-il)-etil)-2,4-dicloro-nicotinamida, N-((5-bromo-3-cloropiridin-2-il)-metil)-2,4-dicloro-nicotinamida, diflometorim, nitrapirin, dodemorfacetato, fluoroimida, blasticidin-S, quinometionato, debacarb, difenzoquat, difenzoquat-metilsulfato, ácido oxolínico y piperlina; B5) carbamatos, que incluyen mancozeb, maneb, metam, metasulfocarb, metiram, ferbam, propineb, tiram, zineb, ziram, dietofencarb, iprovalicarb, bentiavalicarb, propamocarb, hidrocloreto de propamocarb, carbamato de N-(1-(1-(4-cianofenil)-etanosulfonil)but-2-il)4-fluorofenilo, propanoato de 3-(4-cloro-fenil)-3-(2-isopropoxycarbonilamin-3-metil-butirilamin)metilo; o B6) otros fungicidas, que incluyen guanidina, dodina, base libre de dodina, iminocadina, guazatina, antibióticos: kasugamicina, oxitetraciclina y sus sales, estreptomicina, polioxina, validamicina A, derivados de nitrofenilo: binapacril, dinocap, dinobuton, compuestos heterocíclicos que contienen azufre: ditionon, isoprotiolo, compuestos organometálicos: sales de fentina, compuestos organofosforados: edifenfos, iprobenfos, fosetilo, fosetil-aluminio, ácido fosforoso y sus sales, pirazofos, tolclufos-metilo, compuestos organoclorados: diclofluanida, flusulfamida, hexaclorobenceno, ftalida, pencicurón, quintoceno, tiofanato, tiofanato-metilo, tolilfluanida, otros: ciflufenamida, cimoxanilo, dimetirimol, etirimol, furalaxil, metrafenona y spiroxamina, guazatina-acetato, triacetato de iminocadina, iminocadina-tris(albesilato), hidrato de hidrocloreto de kasugamicina, diclorofeno, pentaclorofenol y sus sales, N-(4-cloro-2-nitro-fenil)-N-etil-4-metil-bencenosulfonamida, dicloran, nitroal-isopropilo, tecnaceno, bifenilo, bronopol, difenilamina, mildiomicina, oxincobre, prohexadiona de calcio, N-(ciclopropilmetoxiimino-(6-difluorometoxi-2,3-difluoro-fenil)-metil)-2-fenil acetamida, N'-(4-(4-cloro-3-trifluorometil-fenoxi)-2,5-dimetil-fenil)-N-etil-N-metilformamidina, N'-(4-(4-fluoro-3-trifluorometil-fenoxi)-2,5-dimetil-fenil)-N-etil-N-metilformamidina, N'-(2-metil-5-trifluorometil-4-(3-trimetilsilanil-propoxi)-fenil)-N-etil-N-metilformamidina y N'-(5-difluorometil-2-metil-4-(3-trimetilsilanil-propoxi)-fenil)-N-etil-N-metilformamidina.
- Herbicidas: C1) inhibidores de la acetil-CoA carboxilasa (ACC), por ejemplo, éteres de ciclohexenona oxima, tales como aloxidim, cletodim, cloproxiidim, cicloxiidim, setoxidim, tralkoxidim, butroxiidim, clefoxiidim o tepraloxiidim; ésteres fenoxifenoxipropiónicos, tales como clodinafop-propargilo, cihalofop-butilo, diclofop-metilo, fenoxaprop-etilo, fenoxaprop-P-etilo, fentiapropetilo, fluazifop-butilo, fluazifop-P-butilo, haloxiop-etoxietilo, haloxiop-metilo, haloxiop-P-metilo, isoxapirifop, propaquizafop, quizalofop-etilo, quizalofop-P-etilo o quizalofop-tefurilo; o ácidos arilaminopropiónicos, tales como flamprop-metilo o flamprop-isopropilo; C2) Inhibidores de la acetolactato sintasa (ALS), por ejemplo imidazolinonas, tales como imazapir, imazaquin, imazametabenz-metilo (imazamo), imazamox, imazapic o imazetapir; éteres de pirimidilo, tales como piritiobac-ácido, piritiobac-sodio, bispiribac-sodio. KIH-6127 o piribenzoxim; sulfonamidas, tales como florasulam, flumetsulam o metosulam; o sulfonilureas, tales como amidosulfuron, azimsulfuron, bensulfuron-metilo, clorimuron-etilo, clorsulfuron, cinosulfuron, ciclosulfamuron, etametsulfuron-metilo, etoxisulfuron, flazasulfuron, halosulfuron-metilo, imazosulfuron, metsulfuron-metilo, nicosulfuron, primisulfuron-metilo, prosulfuron, pirazosulfuron-etilo, rimsulfuron, sulfometuron-metilo, tifensulfuron-metilo, triasulfuron, tribenuron-metilo, triflusaluron-metilo, tritosulfuron, sulfosulfuron, foramsulfuron o iodosulfuron; C3) amidas, por ejemplo alidoclor (CDAA), benzoilprop-etilo, bromobutida, quortiamida, difenamida, etobenzanidibenzclomet, flutiamida, fosamina o monalida; C4) herbicidas de auxina, por ejemplo, ácidos piridincarboxílicos, tales como clopiralida o picloram; o 2,4-D o benazolina; C5) inhibidores del transporte de auxinas, por ejemplo naptalam o diflufenzopir; C6) inhibidores de la biosíntesis de carotenoides, por ejemplo, benzenafop, clomazona (dimetazona), diflufenican, fluorocloridona, fluridona, pirazolinato, pirazoxifeno, isoxaflutol, isoxaclortol, mesotriona, sulcotriona (clormesulona), ketospiradox, flurtamona, norflurazon o amitrol; C7) inhibidores de enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS), por ejemplo glifosato o sulfosato; C8) inhibidores de la glutamina sintetasa, por ejemplo bilanafos (bialafos) o glufosinato de amonio; C9) inhibidores de la biosíntesis de lípidos, por ejemplo anilidas, tales como anilofos o mefenacet; cloroacetanilidas, tales como dimetenamida, S-dimetenamida, acetoclor, alaclor, butaclor, butenaclor, dietatil-etilo, dimetaclor, metazaclor, metolaclor, S-metolaclor, pretilaclor, propaclor, prinaclor, terbutaclor, tenilclor o xilaclor; tioureas, tales como butilato, cicloato, di-alato, dimepiperato, EPTC, esprocarb, molinato, pebulato, prosulfocarb, tiobencarb (bentocarb), tri-alato o vernolato; o benfuresato o perfludona; C10) inhibidores de la mitosis, por ejemplo carbamatos, tales como asulam, carbetamid, clorprofam, orbenicarb, pronamid (propizamid), profam o tiocarbamil; dinitroanilinas, tales como benefin, butralina, dinitramina, etalfuralina, flucloalrina, orizalina, pendimetalina, prodiamina o trifluralina; piridinas, tales como ditiopir o tiazopir; o butamifos, clortal-dimetilo (DCPA) o hidrazida maleica; C11) inhibidores de protoporfirinógeno oxidasa IX, por ejemplo difenil éteres, tales como acifluorfen, acifluorfen-sodio, aclonifen, bifenox, clomitrofen (CNP), etoxifen, fluorodifen, fluoroglicofen-etilo, fomesafen, furiloxifen, lactofen, nitrofen, nitrofluorfen u oxifluorfen; oxadiazoles, tales como

oxadiargilo u oxadiazón; imidas cíclicas, tales como azafenidina, butafenacilo, carfentrazona-etilo, cinidon-etilo, flumiclorac-pentilo, flumioxazina, flumipropina, flupropacilo, flutiacet-metilo, sulfentrazona o tidiazimina; o pirazoles, tales como ET-751.JV 485 o nipiraclofen; C12) inhibidores de la fotosíntesis, por ejemplo, propanil, piridato o piridafol; benzotiadiazinonas, tales como bentazona; dinitrofenoles, por ejemplo bromofenoxim, dinoseb, dinoseb-acetato, dinoterb o DNOC; dipiridilenos, tales como cloruro de ciperquat, difenzoquat-metilsulfato, diquat o dicloruro de paraquat; ureas, tales como clorbromuron, clorotoluron, difenoxuron, dimefuron, diuron, etidimuron, fenuron, fluometuron, isoproturon, isouron, linuron, metabenzitiazuron, metazol, metobenzuron, metoxuron, monolinuron, neburon, siduron o tebutiuron; fenoles, tales como bromoxinilo o ioxinilo; cloridazon; triazinas, tales como ametrina, atrazina, cianazina, desmein, dimetametrina, hexazinona, prometona, prometrina, propazina, simazina, simetrina, terbutometon, terbutrina, terbutilazina o trietazina; triazinonas, tales como metamitrina o metribuzina; uracilos, tales como bromacilo, lenacilo o terbacilo; o biscarbamatos, tales como desmedifam o fenmedifam; C13) sinergistas, por ejemplo oxiranos, tales como tridifano; C14) inhibidores de la síntesis de la pared celular CIS, por ejemplo isoxaben o diclobenil; C15) varios otros herbicidas, por ejemplo ácidos dicloropropiónicos, tales como dalapon; dihidrobenzofuranos, tales como etofumesato; ácidos fenilacéticos, como clorfenac (fenac); o aziprotrina, barban, bensulida, benzitiazuron, benzofluor, buminafos, butidazol, buturon, cafenstrole, clorbufam, clorfenprop-metilo, cloroxuron, cinmetilin, cumiluron, cicluron, ciprazina, ciprazol, dibenziluron, dipropetrina, dimron, eglinazina-etilo, endotal, etiozina, flucabazona, fluorbentranilo, flupoxam, isocarbamida, isopropalina, carbutilato, mefluidida, monuron, napropamida, napropanilida, nitalina, oxaciclomefona, fenisofam, piperofos, prociazina, profluralina, piributicarb, secbumeton, sulfalato, (CDEC), terbucarb, triaciflam, triazofenamid o trimeturon; o sus sales ambientalmente compatibles.

Nematicidas o bionematicidas: Benomilo, cloetocarb, aldoxicarb, tirpato, diamidafos, fenamifos, cadusafos, diclofention, etoprofos, fensulfotion, fostiazato, heterofos, isamidofos, isazofos, fosfocarb, tionacina, imiciafos, mecarfon, acetoprol, benclofiaz, cloropicrina, dazomet, fluensulfona, 1,3-dicloropropeno (telona), disulfuro de dimetilo, metam sodio, metam potasio, sal de metam (todos los generadores de MITC), bromuro de metilo, enmiendas biológicas del suelo (p. Ej., Semillas de mostaza, extractos de semillas de mostaza), fumigación del suelo con vapor, isotiocianato de alilo (AITC), sulfato de dimetilo, furfural (aldehído).

Los reguladores del crecimiento de plantas adecuados de la presente invención incluyen los siguientes: Reguladores de crecimiento de plantas: D1) Antiauxinas, tales como ácido clofibrico, ácido 2,3,5-tri-yodobenzoico; D2) Auxinas tales como 4-CPA, 2,4-D, 2,4-DB, 2,4-DEP, diclorprop, fenoprop, IAA, IBA, naftaleneacetamida, ácidos α -naftaleneacéticos, 1-naftol, ácidos naftoxiacéticos, naftenato de potasio, naftenato de sodio, 2,4,5-T; D3) citoquininas, tales como 2iP, benciladenina, alcohol 4-hidroxifenético, cinetina, zeatina; D4) defoliantes, tales como cianamida de calcio, dimetipina, endotal, etefón, merfos, metoxurón, pentaclorofenol, tidiazurón, tribufos; D5) inhibidores de etileno, tales como aviglicina, 1-metilciclopropeno; D6) liberadores de etileno, tales como ACC, etacelasil, etefon, glioxima; D7) gametocidas, tales como fenridazón, hidrazida maleica; D8) giberelinas, tales como giberelinas, ácido giberélico; D9) inhibidores del crecimiento, tales como ácido abscísico, ancimidol, butralina, carbarilo, clorfonio, clorprofam, dikegulac, flumetralin, fluoridamida, fosamina, glifosina, isopirimol, ácido jasmónico, hidrazida maleica, mepiquat, piproctanilo, prohidrojasmon, profam, tiaojiean, ácido 2,3,5-triyodobenzoico; D10) morfactinas, tales como clorfluren, clorflurenol, diclorflurenol, flurenol; D11) retardadores del crecimiento, tales como clorquetat, daminozida, flurprimidol, mefluidida, paclobutrazol, tetciclacis, uniconazol; D12) estimuladores del crecimiento, tales como brasinólida, brasinólida-etilo, DCPTA, forclorfenuron, himexazol, prosuler, triacontanol; D13) reguladores de crecimiento de la planta no clasificados, tales como bachmedesh, benzofluor, buminafos, carvona, cloruro de colina, ciobutida, clofencet, cianamida, ciclanilida, cicloheximida, ciprosulfamida, epocoleona, eticlozato, etileno, fufentiourea, furalano, heptopargilo, holosulf, inabenfida, karetazano, arseniato de plomo, metasulfocarb, prohexadiona, pydanon, sintofen, triapentenol, trinexapac.

El fertilizante puede ser un fertilizante líquido. El término "fertilizante líquido" se refiere a un fertilizante en forma fluida o líquida que contiene varias razones de nitrógeno, fósforo y potasio (por ejemplo, pero no limitado a, 10% de nitrógeno, 34% de fósforo y 0% de potasio) y micronutrientes, comúnmente conocidos como fertilizantes iniciadores que tienen un alto contenido de fósforo y promueven el crecimiento rápido y vigoroso de las raíces.

Las formulaciones químicas de la presente invención pueden estar en cualquier forma convencional apropiada, por ejemplo, un producto concentrado en emulsión (EC), un producto concentrado en suspensión (SC), una suspensión emulsión (SE), una suspensión de cápsula (CS), un gránulo dispersable en agua (WG), un gránulo emulsionable (EG), una emulsión de agua en aceite (EO), una emulsión de aceite en agua (EW), una microemulsión (ME), una dispersión en aceite (OD), un fluido miscible en aceite (OF), un líquido miscible en aceite (OL), un producto concentrado soluble (SL), una suspensión de volumen ultra bajo (SU), un líquido de volumen ultra bajo (UL), un producto concentrado dispersable (DC), un polvo mojable (WP) o cualquier formulación técnicamente factible en combinación con coadyuvantes aceptables desde el punto de vista agrícola.

En una realización, se proporciona un producto que comprende: una primera composición que comprende un cultivo biológicamente puro de *Bacillus amyloliquefaciens* RTI301 depositado como ATCC Núm. PTA-121165, y un cultivo biológicamente puro de *Bacillus amyloliquefaciens* RTI477 depositado como ATCC Núm. PTA-121167; una segunda composición que comprende uno o una combinación de un insecticida, fungicida, nematicida, bactericida, herbicida, extracto de plantas, regulador de crecimiento de plantas o fertilizante microbiano, biológico o químico, en donde la primera y segunda composiciones se envasan por separado; e instrucciones para el suministro en una cantidad adecuada para beneficiar el crecimiento de la planta, una combinación de la primera y segunda composiciones a:

follaje de la planta, corteza de la planta, fruto de la planta, flores de la planta, semilla de la planta, raíces de la planta, un esqueje de la planta, un injerto de la planta, tejido calloso de la planta; suelo o medio de crecimiento que rodea la planta; suelo o medio de crecimiento antes de sembrar semillas de la planta en el suelo o medio de crecimiento; o suelo o medio de crecimiento antes de plantar la planta, el esqueje de la planta, el injerto de la planta o el tejido calloso de la planta en el suelo o medio de crecimiento.

En una realización, la primera composición comprende adicionalmente uno o una combinación de un portador, un dispersante o un extracto de levadura.

En el producto, el insecticida puede ser uno o una combinación de piretroides, bifentrina, teflutrina, zeta-cipermetrina, organofosfatos, cloretoxifos, clorpirifos, tebupirimfos, ciflutrina, fiproles, fipronil, nicotinoides o clotianidina. En una realización, el insecticida en la segunda composición del producto comprende bifentrina y está en una formulación compatible con un fertilizante líquido.

Ejemplos

Los siguientes Ejemplos se han incluido para proporcionar orientación a un experto en la técnica para poner en práctica realizaciones representativas del objeto de estudio descrito en la presente.

Ejemplo 1

Identificación de un Producto Aislado Bacteriano como *Bacillus subtilis* a través de Análisis de Secuencia

Se aisló una cepa bacteriana asociada a la planta, designada en la presente memoria como RTI477, de la raíz de *Moringa oleifera* cultivada en Carolina del Norte. Los genes de ARNr de 16S y *rpoB* de la cepa RTI477 se secuenciaron y posteriormente se compararon con otras cepas bacterianas conocidas en las bases de datos NCBI y RDP utilizando BLAST. Se determinó que la secuencia parcial de ARN de 16S de RTI477 (SEQ ID NO: 1) es idéntica a la secuencia del gen de ARNr de 16S parcial de *Bacillus subtilis* cepa BSn5 (CP002468), *Bacillus amyloliquefaciens* cepa NS6 (KF177175), y *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* cepa DSM 10 (NR_027552). Además, se determinó que la secuencia de *rpoB* de RTI477 tiene 99% de identidad de secuencia con cepas conocidas de *Bacillus subtilis* PY79 (CP006881), *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* 6051-HGW (CP003329) (es decir, 99% de identidad de secuencia; diferencia de 9 pb), y *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* BAB-1a (CP004405) (es decir, 99% de identidad de secuencia; diferencia de 10 pb). La cepa RTI477 se identificó como una cepa de *Bacillus subtilis*. Las diferencias en la secuencia para el gen *rpoB* a nivel de ADN indica que RTI477 es una nueva cepa de *Bacillus subtilis*. La cepa de *Bacillus subtilis* RTI477 se depositó el 17 de abril de 2014 bajo los términos del Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos para los Fines del Procedimiento de Patentes en la Colección de Cultivos Tipo Americana (ATCC) en Manassas, Virginia, EE. UU., y tiene el núm. de Acceso de Patente PTA-121167.

Ejemplo 2

Identificación de un Producto Aislado Bacteriano como *Bacillus Amyloliquefaciens* a través de Análisis de Secuencia

Se aisló una cepa bacteriana asociada a la planta, designada en la presente memoria como RTI301, del suelo de la rizosfera de las vides que crecen en un viñedo en Nueva York. Los genes de ARNr de 16S y *rpoB* de la cepa RTI301 se secuenciaron y posteriormente se compararon con otras cepas bacterianas conocidas en las bases de datos NCBI y RDP utilizando BLAST. Se determinó que la secuencia parcial de ARN de 16S de RTI301 (SEQ ID NO: 3) es idéntica a la secuencia del gen de ARNr de 16S de *Bacillus amyloliquefaciens* cepa NS6 (KF177175), *Bacillus amyloliquefaciens* cepa FZB42 (NR_075005), y *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* cepa DSM 10 (NR_027552). También se determinó que la secuencia del gen *rpoB* de RTI301 (SEQ ID NO: 4) tiene similitud de secuencia con el mismo gen en *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* TrigoCor1448 (CP007244) (99% de identidad de secuencia; diferencia de 3 pares de bases); *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* AS43.3 (CP003838) (99% de identidad de secuencia; diferencia de 7 pares de bases); *Bacillus amyloliquefaciens* CC178 (CP006845) (99% de identidad de secuencia; diferencia de 8 pares de bases), y *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 (CP000560) (99% de identidad de secuencia; diferencia de 8 pares de bases). La cepa RTI301 se identificó como un *Bacillus amyloliquefaciens*. Las diferencias en la secuencia para el gen *rpoB* a nivel de ADN indica que RTI301 es una nueva cepa de *Bacillus amyloliquefaciens*. La cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* RTI301 se depositó el 17 de abril de 2014 bajo los términos del Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos para los Fines del Procedimiento de Patentes en la Colección de Cultivos Tipo Americana (ATCC) en Manassas, Virginia, EE. UU. y tiene el núm. de Acceso de Patente PTA-121165.

Ejemplo 3

Genes Relacionados con la Biosíntesis de Compuestos Antimicrobianos en *Bacillus Amyloliquefaciens* RTI301 y *Bacillus subtilis* RTI477

El análisis de la secuencia adicional del genoma de la cepa *Bacillus amyloliquefaciens* RTI301 reveló que esta cepa tiene genes relacionados con una serie de rutas biosintéticas para la producción de moléculas que tienen propiedades

antimicrobianas. Estas incluyen las rutas biosintéticas para subtilosina, surfactina, iturina, fengicinas, amilociclicina, difcidina, bacilisina, bacilomicina y bacileno. Además, se descubrieron genes relacionados con la biosíntesis de lantibióticos en la cepa RTI301, para la cual no hay homólogos en las otras cepas estrechamente relacionadas de *Bacillus amyloliquefaciens*. Esto se ilustra en la Figura 1, que muestra un diagrama esquemático de la organización genómica que rodea e incluye el operón de biosíntesis de lantibióticos encontrado en *Bacillus amyloliquefaciens* RTI301. En la Figura 1, el conjunto superior de flechas representa regiones codificantes de proteínas para la cepa RTI301 con la dirección relativa de transcripción indicada. A modo de comparación, las regiones correspondientes para dos cepas de referencia de *Bacillus amyloliquefaciens*, FZB42 y TrigoCor1448, se muestran debajo de la cepa RTI301. Los genes en el operón de síntesis de lantibióticos en la cepa RTI301 se identificaron inicialmente utilizando RAST y a continuación sus identidades se perfeccionaron utilizando BLASTp. El grado de identidad de aminoácidos de las proteínas codificadas por los genes de la cepa RTI301 en comparación con las dos cepas de referencia se indica tanto por el grado de sombreado de las flechas representativas como por un porcentaje de identidad indicado dentro de la flecha. Se puede observar en la Figura 1 que existe un alto grado de identidad de secuencia en los genes de las 3 cepas diferentes en las regiones que rodean el operón de síntesis de lantibióticos, pero solo un bajo grado de identidad de secuencia dentro del operón de síntesis de lantibióticos (es decir, menos de 40% dentro del operón de síntesis de lantibióticos pero mayor de 99% en las regiones circundantes). El análisis BLASTn de ésta agrupación se realizó frente a una base de datos de nucleótidos no redundantes (nr) en NCBI y el análisis mostró un alto grado de homología en las regiones flanqueantes 5' y 3' con cepas *B. amyloliquefaciens* (análoga al alto % de similitud en la Figura 1). Sin embargo, la agrupación biosintética de lantipéptidos fue única para RTI301, y no se observó una homología significativa con ningún ADN previamente secuenciado en la base de datos NCBI nr. Por lo tanto, este operón de síntesis de lantibióticos es una característica única para la cepa *Bacillus amyloliquefaciens* RTI301.

A diferencia de la cepa RTI301 con su amplia gama de rutas biosintéticas antimicrobianas, el análisis de secuencia adicional de la cepa RTI477 reveló que esta cepa tiene genes relacionados con las rutas biosintéticas para un grupo más limitado de moléculas que tienen propiedades antimicrobianas. La cepa RTI477 tiene rutas biosintéticas para subtilosina, fengicinas, surfactina, difcidina, bacileno, bacilisina y bacilomicina, pero no se observaron rutas biosintéticas completas para iturinas, lantibióticos y amilociclinas.

Ejemplo 4

Propiedades Antimicrobianas de Productos Aislados de *Bacillus subtilis* RTI477 y *Bacillus Amyloliquefaciens* RTI301

La capacidad antagónica de los productos aislados de *Bacillus subtilis* RTI477 y *Bacillus amyloliquefaciens* RTI301 frente a los principales patógenos de las plantas se midió en ensayos en placa. Se realizó un ensayo en placa para evaluar el antagonismo contra los patógenos fúngicos de las plantas haciendo crecer el producto aislado bacteriano y los patógenos fúngicos lado a lado en 869 placas de agar a una distancia de 4 cm. Las placas se incubaron a temperatura ambiente y se verificaron regularmente durante hasta dos semanas para detectar comportamientos de crecimiento, tales como inhibición del crecimiento, ocupación de nicho o ningún efecto. En el caso del escrutinio de propiedades antagónicas contra patógenos bacterianos, el patógeno se extendió primero como un césped en 869 placas de agar. Posteriormente, se colocaron alícuotas de 20 µl de un cultivo de cada uno de los productos aislados sobre la placa. Las placas se incubaron a temperatura ambiente y se comprobaron regularmente durante hasta dos semanas para detectar una zona de inhibición en el césped alrededor de las posiciones en las que se habían aplicado RTI477 y RTI301. Un resumen de la actividad antagónica se muestra en las Tablas I y II a continuación para cada una de las cepas RTI477 y RTI301, respectivamente. La cepa RTI301 mostró propiedades antagónicas superiores contra una amplia gama de microorganismos patógenos de plantas en comparación con la cepa RTI477.

Tabla I. Propiedades antagónicas del producto aislado de *Bacillus subtilis* RTI477 contra los principales patógenos de plantas

Ensayos antimicrobianos	RTI477
<i>Alternaria solani</i>	+++
<i>Aspergillus flavus</i>	+
<i>Aspergillus nomius</i>	+/-
<i>Botrytis cinerea</i>	++
<i>Cercospora sojina</i>	++/+++
<i>Fusarium colmorum</i>	+
<i>Fusarium graminearum</i>	+++
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>Lycopersici</i>	+
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	+
<i>Fusarium virguliforme</i>	++/+++

Ensayos antimicrobianos	RTI477
<i>Glomerella cingulata</i>	++
<i>Magnaporthe grisea</i>	+++
<i>Monilina fructicola</i>	++
<i>Rhizoctonia solani</i>	++
<i>Sclerotinia homeocarpa</i>	++
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	+
<i>Septoria tritici</i>	++
<i>Stagonospora nodorum</i>	++/+++
<i>Phytophthora capsici</i>	++
<i>Pythium sylvaticum</i>	+/-/+
<i>Pythium aphanidermatum</i>	+
<i>Erwinia amylovora</i>	+
<i>Erwinia carotovora</i>	+
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>Tomato</i>	-
<i>Xanthomonas axonopodis</i>	+
<i>Xanthomonas euvesicatoria</i>	+
+++ actividad muy fuerte, ++ actividad fuerte, + actividad, + - actividad débil, - no se observó actividad	

Tabla II. Propiedades antagónicas del producto aislado de *Bacillus amyloliquefaciens* RTI301 contra los principales patógenos de las plantas

Ensayos antimicrobianos	RTI301
<i>Alternaria solani</i>	++
<i>Aspergillus flavus</i>	++
<i>Aspergillus nomius</i>	+++
<i>Botrytis cinerea</i>	+++
<i>Cercospora sojina</i>	+++
<i>Fusarium colmorum</i>	+
<i>Fusarium graminearum</i>	+++
<i>Fusarium oxysporum</i> F. sp. <i>Lycopersici</i>	++
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	++
<i>Fusarium virguliforme</i>	++/+++
<i>Glomerella cingulata</i>	+++
<i>Magnaporthe grisea</i>	++/+++
<i>Monilina fructicola</i>	++/+++
<i>Rhizoctonia solani</i>	++
<i>Sclerotinia homeocarpa</i>	++/+++
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	+++
<i>Septoria tritici</i>	++
<i>Stagonospora nodorum</i>	++/+++
<i>Phytophthora capsici</i>	++

Ensayos antimicrobianos	RTI301
<i>Pythium sylvaticum</i>	+/-/+
<i>Pythium aphanidermatum</i>	+
<i>Erwinia amylovora</i>	+
<i>Erwinia carotovora</i>	+
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>Tomato</i>	-
<i>Ralstonia solanacearum</i>	++
<i>Xanthomonas axonopodis</i>	++
<i>Xanthomonas euvesicatoria</i>	++
+++ actividad muy fuerte, ++ actividad fuerte, + actividad, + - actividad débil, - no se observó actividad	

Ejemplo 5

Rasgos Fenotípicos de los productos aislados de *Bacillus subtilis* RTI477 y *Bacillus Amyloliquefaciens* RTI301

Además de las propiedades antagónicas, también se midieron varios rasgos fenotípicos para las cepas de *Bacillus subtilis* RTI477 y *Bacillus amyloliquefaciens* RTI301 y los datos se muestran a continuación en las Tablas III y IV para cada una de las cepas, respectivamente. Los ensayos se realizaron de acuerdo con los procedimientos descritos en el texto debajo de las Tablas. En particular, RTI477 crece más rápido y tiene un fenotipo de movimiento en enjambre fuerte en comparación con RTI301.

Tabla III. Ensayos fenotípicos: producción de fitohormonas, acetoina y ácido indolacético (IAA) y ciclo de nutrientes del producto aislado de *Bacillus subtilis* RTI477.

Ensayos característicos	RTI477
Producción de ácido (rojo de metilo)	-
Producción de acetoina (MR-VP)	++
Actividad quitinasa	-
Producción de ácido indol-3-acético	-
Actividad proteasa	++
Solubilización de fosfato	+/-
Fenotipo	crema seca, gran crecimiento, fuerte movimiento en enjambre
+++ muy fuerte, ++ fuerte, + algo, + - débil, - ninguno observado	

Tabla IV. Ensayos fenotípicos: producción de fitohormonas, acetoina y ácido indolacético (IAA) y ciclo de nutrientes del producto aislado de *Bacillus amyloliquefaciens* RTI301.

Ensayos característicos	RTI301
Producción de ácido (rojo de metilo)	-
Producción de acetoina (MR-VP)	+++
Actividad quitinasa	+/-
Producción de ácido indol-3-acético	-
Actividad proteasa	+++
Solubilización de fosfato	+/-
Fenotipo	crema viscosa, colonias redondas bien definidas
+++ muy fuerte, ++ fuerte, + algo, + - débil, - ninguno observado	

Prueba de acetoina. Se transfirieron 20 µl de un cultivo iniciador en medio 869 rico a 1 ml de medio Methy Red - Voges Proskauer (Sigma Aldrich 39484). Los cultivos se incubaron durante 2 días a 30°C a 200 rpm. Se transfirieron 0,5 ml de cultivo y se añadieron 50 µl de 0,2 g/l de rojo de metilo. El color rojo indica la producción de ácido. El cultivo

restante de 0,5 ml se mezcló con 0,3 ml de alfa-naftol al 5% (Sigma Aldrich N1000) seguido de 0,1 ml de KOH al 40%. Las muestras fueron interpretadas después de 30 minutos de incubación. El desarrollo de un color rojo indicó la producción de acetoina. Tanto para las pruebas de ácido como de acetoina se utilizó medio no inoculado como control negativo (Sokol et al., 1979, Journal of Clinical Microbiology. 9: 538-540).

- 5 **Ácido Indol-3-acético.** Se transfirieron 20 µl de un cultivo iniciador en medio 869 rico a 1 ml 1/10 de medio 869 con un suplemento de 0,5 g/l de triptófano (Sigma Aldrich T0254). Los cultivos se incubaron durante 4-5 días en la oscuridad a 30°C, a 200 RPM. Las muestras se centrifugaron y se mezclaron 0,1 ml de sobrenadante con 0,2 ml de reactivo Salkowski (ácido perclórico al 35%, FeCl₃ 10 mM). Después de incubar durante 30 minutos en la oscuridad, las muestras que dieron como resultado un color rosa se registraron como positivas para la síntesis de IAA. Las diluciones de IAA (Sigma Aldrich 15148) se utilizaron como una comparación positiva; el medio no inoculado se utilizó como control negativo (Taghavi, et al., 2009, Applied and Environmental Microbiology 75: 748-757).

- 10 **Prueba de solubilización de fosfato.** Las bacterias se cultivaron en placa en un medio de agar Pikovskaya (PVK) que consistía en 10 g de glucosa, 5 g de trifosfato de calcio, 0,2 g de cloruro de potasio, 0,5 g de sulfato de amonio, 0,2 g de cloruro de sodio, 0,1 g de sulfato de magnesio heptahidratado, 0,5 g de extracto de levadura, 2 mg de sulfato de manganeso, 2 mg de sulfato de hierro y 15 g de agar de por litro, pH 7, esterilizado en autoclave. Las zonas de aclaramiento eran indicativas de bacterias solubilizadoras de fosfato (Sharma et al., 2011, Journal of Microbiology and Biotechnology Research 1: 90-95).

- 15 **Actividad quitinasa.** Se añadió quitina coloidal al 10% en peso húmedo al medio de agar PVK modificado (10 g de glucosa, 0,2 g de cloruro de potasio, 0,5 g de sulfato de amonio, 0,2 g de cloruro de sodio, 0,1 g de sulfato de magnesio heptahidratado, 0,5 g de extracto de levadura, 2 mg de sulfato de manganeso, 2 mg de sulfato de hierro y 15 g de agar de por litro, pH 7, esterilizado en autoclave). Las bacterias se cultivaron en placa sobre estas placas de quitina; las zonas de aclaramiento indicaron actividad quitinasa (N. K. S. Murthy & Bleakley., 2012. "Simplified Method of Preparing Colloidal Chitin Used for Screening of Chitinase Producing Microorganisms". The Internet Journal of Microbiology. 10 (2)).

- 20 **Actividad proteasa.** Las bacterias se cultivaron en placa sobre un medio de agar 869 con un suplemento de leche al 10%. Las zonas de aclaramiento indicaron la capacidad de descomponer las proteínas, lo que sugería actividad proteasa (Sokol et al., 1979, Journal of Clinical Microbiology. 9: 538-540).

Ejemplo 6

Efectos de Crecimiento del Producto Aislado de *Bacillus subtilis* RTI477 en Trigo

- 30 Se determinó el efecto de la aplicación del producto aislado bacteriano RTI477 sobre el crecimiento temprano de la planta y el vigor en trigo. El experimento se realizó inoculando semillas de trigo germinadas esterilizadas en superficie durante 2 días en una suspensión de $\sim 2 \times 10^7$ UFC/ml de la bacteria a temperatura ambiente bajo aireación en la oscuridad (también se realizó un control sin bacterias). Posteriormente, las semillas inoculadas y de control se plantaron en macetas de 15,24 cm llenas de arena. Se plantaron 10 semillas por maceta y 1 maceta por tratamiento y se regaron, según fuera necesario, alternando con agua y solución de Hoagland Modificada. Las macetas se incubaron en una ventana de laboratorio a aproximadamente 21°C que proporciona ciclos naturales de luz/oscuridad durante 13 días, momento en el que se recuperaron las plantas y se midieron los parámetros. El peso seco se determinó como el peso total por 9 plantas, dando como resultado un peso la planta seca promedio total igual a 35,41 mg para las plantas inoculadas con la cepa *Bacillus subtilis* RTI477 frente a un peso igual a 33,38 mg para el control no inoculado, que representa un incremento de 6% en peso seco sobre el control no inoculado. Las fotografías de las plantas extraídas después de 13 días de crecimiento se muestran en la Figura 2. La Figura 2A muestra plantas de control y la Figura 2B muestra plantas inoculadas con RTI477.

Ejemplo 7

Compatibilidad de Crecimiento de *Bacillus Amyloliquefaciens* RTI301 y *Bacillus subtilis* RTI477

- 45 La compatibilidad de la cepa *Bacillus amyloliquefaciens* RTI301 con otros productos aislados de *Bacillus* se probó aplicando de manera diseminada la cepa RTI301 sobre el césped de las otras cepas. Los resultados de este experimento se muestran en las Figura 3A-3B. Las Figura 3A-3B son imágenes que muestran la compatibilidad de crecimiento entre cepas de *Bacillus amyloliquefaciens* RTI301 y *Bacillus subtilis* RTI477 y una falta de compatibilidad entre la cepa RTI301 con otra cepa de *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus amyloliquefaciens* RTI472 depositado como PTA-121166 con la Colección de Cultivos Tipo Americana (ATCC). Cuando la cepa RTI301 se aplicó de manera diseminada sobre un césped de la cepa RTI472 (Figura 3A), se observó una clara zona de inhibición para el crecimiento de la cepa RTI472. Por el contrario, cuando la cepa RTI301 se aplicó de manera diseminada sobre un césped de la cepa RTI477 (Figura 3B), solo se observó una inhibición mínima y no se observó aclaramiento del césped de células para la cepa RTI477. Por lo tanto, se concluyó que el crecimiento de RTI301 y RTI477 es compatible.
- 55 Sin limitarse a ningún mecanismo de acción particular, se propone un modo de acción de la siguiente manera para explicar las diferencias observadas en la compatibilidad de las cepas. Basándose en las secuencias del genoma de las tres cepas probadas (es decir, RTI301, RTI472 y RTI477), se predijo que todas estas cepas producirían los

compuestos antagónicos bacilisina, bacileno, difcidina y bacilomicina. Sin embargo, mientras tanto *Bacillus amyloliquefaciens* RTI301 como *Bacillus subtilis* RTI477 poseen el gen para la síntesis de subtilosina, este gen está ausente en el genoma de *Bacillus amyloliquefaciens* RTI472. La subtilosina es una bacteriocina, una clase de toxinas proteínicas producidas por bacterias para inhibir el crecimiento de cepas bacterianas similares o estrechamente relacionadas. Por lo tanto, se postuló que la subtilosina sintetizada por *Bacillus amyloliquefaciens* RTI301 podría ser el inhibidor del crecimiento de *Bacillus amyloliquefaciens* RTI472. En contraste, la cepa de *Bacillus subtilis* RTI477 no es inhibida por RTI301, porque la cepa RTI477 produce su propia subtilosina y, por lo tanto, es resistente al compuesto.

También se analizaron las diferencias en la morfología de la cepa entre las cepas de *Bacillus amyloliquefaciens* RTI301 y *Bacillus subtilis* RTI477. Las imágenes que muestran la morfología de cada una de estas cepas se muestran en la Figura 4: *Bacillus amyloliquefaciens* RTI301 (Figura 4A) y *Bacillus subtilis* RTI477 (Figura 4B). La morfología de la colonia de las cepas de *Bacillus amyloliquefaciens* RTI301 y *Bacillus subtilis* RTI477 mostrada en las Figura 4A-4B indican una diferencia potencial en el comportamiento de la cepa cuando se trata de motilidad. La motilidad es un rasgo clave para la colonización de la rizosfera por bacterias asociadas a plantas. *Bacillus amyloliquefaciens* RTI301 crece como colonias redondas bien definidas. Por el contrario, *Bacillus subtilis* RTI477 crece como una colonia esponjosa, una morfología que es indicativa de movimiento en enjambre y motilidad. La movimiento en enjambre y la motilidad son fenotipos potencialmente importantes para la rápida colonización de la rizosfera y la superficie de la raíz de la planta. Una vez más, sin limitarse a ningún mecanismo de acción particular, se postuló que el fenotipo de fuerte movimiento en enjambre sugerido por la morfología de la cepa *Bacillus subtilis* RTI477 podría hacer que esta cepa fuera un colonizador más eficaz de la rizosfera que *Bacillus amyloliquefaciens* RTI301.

A la luz de la compatibilidad de crecimiento y las diferencias observadas en el fenotipo, se sometió a prueba adicionalmente la combinación de las cepas RTI301 y RTI477 para determinar su actividad para promover el crecimiento y la salud de las plantas.

Ejemplo 8

La Combinación de *Bacillus subtilis* RTI477 y *Bacillus Amyloliquefaciens* RTI301 da como Resultado Propiedades Sinérgicas que Promueven el Crecimiento de las Plantas

Se observó un efecto positivo sobre la germinación de semillas y el desarrollo y la arquitectura de las raíces para una variedad de semillas de plantas inoculadas con células vegetativas o recubiertas con esporas de la cepa *Bacillus subtilis* RTI477. Esto se describe en trigo, por ejemplo, en la presente memoria anteriormente en el EJEMPLO 6. Además, se realizaron experimentos para determinar los efectos de la aplicación de las cepas de *Bacillus subtilis* RTI477 y *Bacillus amyloliquefaciens* RTI301 de semillas de soja en la germinación, el desarrollo de la raíz y la arquitectura y el crecimiento temprano de la planta y/o la salud de la planta. Los experimentos se realizaron como se describe a continuación utilizando esporas de RTI301 y RTI477. Para los experimentos, las cepas se esporularon en 2XSG en un fermentador de 14 L. Después, las esporas se recogieron, pero sin lavar, a una concentración de $1,0 \times 10^8$ UFC/ml. La concentración de esporas se diluyó por un factor de 10 o más en los experimentos. Se colocó un papel de filtro estéril en el fondo de las cámaras de crecimiento de plástico estéril individuales, y se colocaron seis semillas en cada recipiente. Se añadieron tres mL de cada dilución de las esporas de RTI301 o RTI477 a las cámaras de crecimiento, que se cerraron e incubaron a 19°C durante 8 días, después de lo cual se tomaron imágenes de las plántulas. Además, también se probaron combinaciones de esporas de RTI301 y RTI477 añadidas a razones de 1:3, 1:1 y 3:1. Los datos se muestran en la Tabla V a continuación. Ninguna de las dos cepas cuando se aplicó sola inhibió la germinación de la semilla en comparación con los controles no inoculados.

La inoculación de semillas de soja con *Bacillus amyloliquefaciens* RTI301 a concentraciones de 1×10^6 , 1×10^7 y 1×10^8 no tuvo efecto en el desarrollo y la arquitectura de las raíces. La inoculación de semillas de soja con *Bacillus subtilis* RTI477 a las mismas concentraciones proporcionó solo una ligera mejora en la concentración más baja en el desarrollo y la arquitectura de las raíces. Inesperadamente, la inoculación de semillas de soja con la combinación de RTI301 y RTI477 (razón 1:3) dio como resultado, en todas las concentraciones probadas una mejora en el desarrollo de las raíces. La inoculación de semillas de soja con la combinación de RTI301 y RTI477 (razón 1:1) dio como resultado, para las concentraciones de 1×10^6 UFC/ml y 1×10^7 UFC/ml, una mejora en el desarrollo de las raíces, con los resultados más consistentes observados para la concentración de 1×10^6 UFC/ml. Los mejores resultados en el desarrollo de las raíces se observaron cuando RTI301 y RTI477 se aplicaron a una razón de 3:1 a una concentración de 1×10^6 UFC/ml.

Además, las imágenes de los efectos positivos de la inoculación de la semilla con las esporas de RTI301 más RTI477 (razón 3:1) se muestran en las Figura 5A y 5B (A - plantas de control; B - plantas inoculadas con RTI301 más RTI477 (razón 3:1) a 10^6 ufc/ml). Los efectos fueron especialmente positivos con respecto a la formación y la arquitectura de las raíces, como se muestra en las Figura 5A-5B. Los pelos finos de la raíz son importantes en la absorción de agua, nutrientes y la interacción de las plantas con otros microorganismos en la rizosfera. Estos resultados muestran que, si bien la aplicación de cepas individuales tuvo poco o ningún efecto en comparación con las plantas de control, el tratamiento de semillas con la aplicación de una combinación de las cepas de *Bacillus subtilis* RTI477 y *Bacillus amyloliquefaciens* RTI301 pueden tener un beneficio significativo sobre el crecimiento temprano y establecimiento de la soja.

Tabla V. Ensayo de germinación de semillas de soja para el tratamiento con esporas de RTI301 y RTI477

Cepa	ID	Efecto de la concentración de esporas (UFC/ml) sobre la germinación y el desarrollo de la raíz de soja		
		10 ⁸	10 ⁷	10 ⁶
RTI 301	<i>B. amyloliquifaciens</i>	=	=	=
RTI 477	<i>B. subtilis</i>	=	=	+
RTI301 + RTI477	<i>B. amyloliquifaciens</i> + <i>B. subtilis</i> 1:3	+	++	+
RTI301 + RTI477	<i>B. amyloliquifaciens</i> + <i>B. subtilis</i> 1:1	=	+	++
RTI301 + RTI477	<i>B. amyloliquifaciens</i> + <i>B. subtilis</i> 3:1	=	=	+++
+++ beneficio de crecimiento muy pronunciado, ++ beneficio de crecimiento fuerte, + beneficio de crecimiento, + - beneficio de crecimiento débil, = sin efecto observado, - inhibición débil, - - inhibición fuerte, n.d. no determinado				

Se realizaron experimentos adicionales para investigar el efecto sobre el crecimiento y desarrollo de la planta después de la inoculación de la semilla de la planta con una combinación de las cepas RTI301 y RTI477. Específicamente, se estableció un experimento en soja de la siguiente manera: 1) la semilla no se trató; 2) la semilla se trató con una combinación de CRUISERMAXX (insecticida más fungicida, que contiene tiametoxam, fludioxonil más metalaxil-M; SYNGENTA CROP PROTECTION, INC) y el fungicida de tiofanato metilo, que es un tratamiento típico de semillas de soja (la combinación de CRUISERMAXX y tiofanato metilo se conoce como "CHEM CONTROL"); 3) la semilla se trató con CHEM CONTROL más inoculación con 5,0x10⁺⁵ ufc/semilla de la cepa RTI301; 4) la semilla se trató con CHEM CONTROL más inoculación con 5,0x10⁺⁵ ufc/semilla de la cepa RTI477; 5) la semilla se trató con CHEM CONTROL más inoculación con una combinación de ambas cepas a 5,0x10⁺⁵ ufc/semilla. Se realizaron diez estudios con 4 o 5 repeticiones por tratamiento por estudio. Los resultados de rendimiento promedio de soja (kilogramos por hectárea) para diez estudios de campo se presentan en la Tabla VI a continuación, estando localizados los sitios de campo de estudio ubicados en Wisconsin (2), Indiana (2), Illinois (3) e Iowa (3). En cuatro estudios se inoculó *Rhizoctonia solani*, en tres estudios se inoculó *Fusarium graminearum* o *F. virguliforme*, en un estudio se inoculó *Phytophthora sojae* y en dos estudios no se realizó inoculación. Cada patógeno se hizo crecer por separado sobre semillas esterilizadas en autoclave húmedas y a continuación se secaron al aire. El inóculo seco utilizado en un estudio seleccionado se plantó mezclado con la semilla a una tasa prescrita para proporcionar infección cuando la semilla comenzó a crecer.

Los resultados en la Tabla VI muestran que la inoculación con *Bacillus amyloliquefaciens* RTI301 o *Bacillus subtilis* RTI477 solos, no tuvo ningún efecto sobre el rendimiento promedio general de la soja en comparación con las semillas que fueron tratadas con CHEM CONTROL solo. Como se observó en el experimento anterior, la inoculación con la combinación de *Bacillus amyloliquefaciens* RTI301 y *Bacillus subtilis* RTI477 proporcionó un efecto sinérgico y dio como resultado, en un promedio de más de 10 estudios de campo, un aumento de 5% en el rendimiento de la soja (de 3914,01 a 4109,04 kilogramos por hectárea, véase la Tabla VI). Notablemente, se observó un beneficio de rendimiento de 248,83 kilogramos por hectárea con la combinación de RTI 301 y RTI 477 más control químico sobre el control químico para rendimientos en los estudios de campo sin inoculación (N=2 estudios), aumento de 289,18 kilogramos por hectárea para las dos cepas más control químico sobre el control químico para los estudios con inoculación de *Rhizoctonia* (N=4 estudios), aumento de 100,88 kilogramos por hectárea para las dos cepas más control químico sobre el control químico para los estudios de inoculación con *Fusarium* (N=3 estudios), y aumento de 67,25 kilogramos por hectárea para las dos cepas más control químico sobre el control químico para los estudios de inoculación con *Phytophthora* (N=1 estudio), por lo que se produjo una respuesta de rendimiento independientemente de la inoculación de la enfermedad y el tratamiento de la semilla con fungicidas químicos.

Tabla VI. Resultados promedio de la inoculación de semillas de soja con *Bacillus amyloliquefaciens* RTI301, *Bacillus subtilis* RTI477 y la combinación de ambas cepas.

TRATAMIENTO		Rendimiento (kg/ha) n = 10	Aumento del rendimiento sobre CHEM CONTROL	Valor de la prueba T emparejada
1	Semilla no tratada	3739,16	-2,6	0,011
2	CHEM CONTROL	3914,01	~	~
3	CHEM CONTROL + RTI301	3907,29	-0,1	0,468

4	CHEM CONTROL + RTI477	3907,29	-0,1	0,460
5	CHEM CONTROL + RTI301 + RTI477	4109,04	2,9	0,007

Sin limitarse a ningún mecanismo de acción particular, una explicación para los resultados sinérgicos observados de la combinación de las dos cepas sobre el rendimiento de soja es la siguiente. *Bacillus amyloliquefaciens* RTI301 produce una amplia gama de metabolitos antagónicos, tales como subtilosina, que pueden inhibir el crecimiento y el desarrollo de cepas competidoras, tanto de hongos como de bacterias, incluyendo las especies de *Bacillus* íntimamente relacionadas. Al hacerlo, la cepa RTI301 cuando se aplica a una planta sola podría abrir un nicho/espacio para su establecimiento en la rizosfera. Sin embargo, los datos no respaldan fuertes propiedades de promoción del crecimiento de las plantas para *Bacillus amyloliquefaciens* RTI301. Por lo tanto, después de que se haya introducido la cepa RTI301 y se haya abierto un nicho en la rizosfera, podría establecerse pero no promover significativamente el crecimiento de las plantas y/o la salud de las plantas. Esto se confirma por la falta de un aumento de rendimiento observado para la soja después del tratamiento de semillas con *Bacillus amyloliquefaciens* RTI301 solo.

Por el contrario, *Bacillus subtilis* RTI477 parece tener un intervalo más estrecho de antagonismo que *Bacillus amyloliquefaciens* RTI301 y, por lo tanto, podría esperarse que sea menos eficaz en la apertura de un nicho en el que establecerse cuando se aplica solo a la semilla de la planta. Como resultado, la cepa podría dejar de establecerse más fácilmente en la rizosfera de la soja, lo que podría dar como resultado la falta de un efecto beneficioso sobre el crecimiento de las plantas. Esto se confirma por la falta observada de un aumento en el rendimiento de la soja después del tratamiento de semillas con *Bacillus subtilis* RTI477 solo.

Los experimentos han demostrado que el crecimiento de la cepa *Bacillus subtilis* RTI477 es compatible con *Bacillus amyloliquefaciens* RTI301. Además, el fenotipo de RTI477 indica que esta cepa puede ser un fenotipo de movimiento en enjambre fuerte y, por lo tanto, se supone que es un colonizador más eficaz de la rizosfera que *Bacillus amyloliquefaciens* RTI301. Por lo tanto, se puede esperar que la combinación de ambas cepas tenga un efecto beneficioso sobre la soja. Específicamente, una vez que *Bacillus amyloliquefaciens* RTI301 ha abierto un nicho para el establecimiento en la rizosfera de soja, la cepa puede ser superada por *Bacillus subtilis* RTI477 debido a su fenotipo de movimiento en enjambre. La cepa RTI477 puede establecerse a continuación por sí misma en la rizosfera de soja, donde puede proporcionar efectos beneficiosos para su anfitrión vegetal. Esto fue confirmado por el aumento observado en el rendimiento de soja después de la inoculación de la semilla de la planta con una combinación de ambas cepas.

Ejemplo 9

El Tratamiento de Semillas con una Combinación de Esporas de *Bacillus subtilis* RTI477 y *Bacillus Amyloliquefaciens* RTI301 Aumentó el Rendimiento en Maíz

Se realizaron experimentos adicionales para investigar el efecto sobre el crecimiento, desarrollo y rendimiento de la planta después de la inoculación de la semilla de la planta con una combinación de las cepas RTI301 y RTI477.

Específicamente, se estableció un experimento en maíz de la siguiente manera y los datos se resumen en la Tabla IX a continuación: 1) la semilla no se trató ("UTC"); 2) la semilla se trató con una combinación de MAXIM (fungicida de tratamiento de semillas de amplio espectro fludioxonil como su ingrediente activo a 0,0625 mg/semilla; SYNGENTA CROP PROTECTION, INC), APRON XL (ingrediente activo metalaxil-M a 0,0625 mg/semilla); SYNGENTA CROP PROTECTION, INC) y PONCHO (insecticida de Clotianidina a 0,25 mg/semilla; BAYER CROPSCIENCE, INC), que es un tratamiento típico de semillas de maíz (la combinación de MAXIM, APRON XL y PONCHO se conoce como "CHEM CONTROL" o "CC"); y 3) la semilla se trató con CHEM CONTROL más una combinación de 5,0x10⁺⁵ ufc/semilla de cada una de las cepas RTI301 y RTI477 ("CC + RTI 301/477 1:1"). Se realizaron dos estudios con 5 repeticiones por tratamiento por estudio, en condiciones de presión de enfermedad natural o inoculación del suelo con *Rhizoctonia* respectivamente. Para el estudio de inoculación, *Rhizoctonia* se cultivó por separado sobre semillas esterilizadas en autoclave humedecidas y a continuación secadas al aire. El inóculo seco se mezcló con la semilla en el momento de la plantación a una tasa prescrita para proporcionar infección cuando la semilla comenzó a crecer. Los resultados promedio de rendimiento en maíz (kilogramos por hectárea) para los estudios de campo se presentan en la Tabla IX a continuación, estando localizados los sitios de del estudio en Shawneetown, Illinois.

Los resultados en la Tabla VII muestran que la inoculación con CHEM CONTROL más la combinación 1 a 1 de *Bacillus amyloliquefaciens* RTI301 y *Bacillus subtilis* RTI477 aumentó significativamente el rendimiento promedio en maíz en comparación con las semillas que fueron tratadas solo con CHEM CONTROL. En particular, se observó un aumento del rendimiento de 719,59 kilogramos por hectárea y 4021,61 kilogramos por hectárea con la combinación 1:1 de RTI301 y RTI477 más el control químico sobre el control químico solo para la presión natural del patógeno y los estudios de campo con inoculación de *Rhizoctonia*, respectivamente. Estos datos indican que el tratamiento de la semilla con la combinación de estas cepas mejora significativamente el rendimiento de maíz.

Tabla VII. Aumento del rendimiento para semillas de maíz no tratadas (UTC), semillas de maíz tratadas con control

químico (CC) y semillas de maíz tratadas con CC más una combinación de *Bacillus amyloliquefaciens* RTI301 y *Bacilo subtilis* RTI477 bajo presión de enfermedad natural e inoculación artificial con *Rhizoctonia*. La relevancia estadística (en letras) se basa en $P = 0,1$.

		<i>Natural</i>			<i>Rhizoctonia</i>		
		kg/ha		Incremento	kg/ha		Incremento
1	UTC	11479,76	e	-23,8	9549,65	e	-22,0
2	CC	13080,33	bcd	0,0	11029,18	de	0,0
3	CC + RTI 301/477 1:1	13799,92	a-d	10,7	15050,79	ab	59,8

Ejemplo 10

- 5 El Tratamiento de Semillas con una Combinación de *Bacillus subtilis* RTI477 y *Bacillus Amyloliquefaciens* RTI301 Aumentó el Rendimiento en Soja Inoculada Artificialmente con *Rhizoctonia solani*

Se realizaron experimentos para investigar el efecto sobre la emergencia y el rendimiento en soja cuando las semillas se trataron con una combinación de las cepas RTI301 y RTI477 además de agentes químicos activos para el control de patógenos. Específicamente, se estableció un experimento en soja de la siguiente manera: 1) la semilla no se trató (UTC); 2) la semilla se trató con una combinación de CRUISERMAXX (insecticida más fungicida, que contiene tiametoxam, fludioxonil más metalaxil-M; SYNGENTA CROP PROTECTION, INC) y el fungicida de tiofanato metilo, que es un tratamiento típico de semillas de soja (la combinación de CRUISERMAXX y tiofanato metilo se conoce como "CHEM CONTROL"); 3) la semilla se trató con VIBRANCE (ingrediente activo Sedaxane; SYNGENTA CROP PROTECTION, INC; y 4) la semilla se trató con CHEM CONTROL más $5,0 \times 10^{+5}$ ufc/semilla de cada una de las cepas RTI301 y RTI477. Se realizaron dos estudios en Whitewater, WI con 4 repeticiones por tratamiento por estudio. En los estudios se inoculó *Rhizoctonia solani* primero haciendo crecer el patógeno por separado sobre semillas esterilizadas en autoclave humedecidas y a continuación el inóculo seco se mezcló con la semilla en el momento de la plantación a una tasa prescrita para proporcionar infección cuando la semilla comenzó a crecer. Los resultados promedio de emergencia y rendimiento de soja para los estudios se presentan en la Tabla VIII a continuación. Los resultados en la Tabla VIII muestran que el tratamiento con la combinación de *Bacillus amyloliquefaciens* RTI301 y *Bacillus subtilis* RTI477 además de CHEM CONTROL dio como resultado un aumento promedio en el rendimiento de 894,44 kilogramos por hectárea sobre el del agente químico activo solo (de 3994,71 a 4889,15 kilogramos por hectárea). Por lo tanto, el tratamiento de semillas con la combinación de RTI301 y RTI477 puede proporcionar una mejora significativa en los rendimientos en soja, incluso en condiciones de presión severa del patógeno.

- 25 Tabla VIII. Resultados promedio sobre la emergencia y rendimiento de soja en estudios de campo con plantas inoculadas artificialmente con *Rhizoctonia solani* con tratamiento de la semilla de soja con una combinación de *B. amyloliquefaciens* RTI301 y *B. subtilis* RTI477 además del tratamiento con agente químico activo para semillas de soja.

TRATAMIENTO		% De emergencia	Rendimiento (kg/ha)	Aumento del rendimiento sobre CHEM CONTROL (kg/ha)
1	UTC	36	3315,48	-679,24
2	CHEM CONTROL	49	39994,71	-
3	VIBRANZA	56	4088,87	94,15
4	CHEM CONTROL + RTI301 + RTI477	65	4889,15	894,44

Ejemplo 11

- 30 Efectos del Riego por Goteo con Producto Aislado de *Bacillus amyloliquefaciens* RTI301 más Producto Aislado de *Bacillus subtilis* RTI477 sobre frutas y hortalizas

Se realizaron experimentos de estudio de campo para determinar el efecto del riego por goteo con esporas de *Bacillus amyloliquefaciens* RTI301 más *Bacillus subtilis* RTI477 sobre calabacín, tomate y pimiento. La presión de la enfermedad causada por hongos transmitidos por el suelo no se registró en ninguno de los transectos. Los efectos sobre el rendimiento de la planta se determinaron de acuerdo con los experimentos que se describen a continuación.

Se realizó un estudio de campo para plantas de pimiento (pimiento jalapeño) donde se aplicaron esporas a una tasa

de $1,25 \times 10^{12}$ UFC/hectárea por cepa de ambos *Bacillus amyloliquefaciens* RTI301 y *Bacillus subtilis* RTI477 en el momento de la plantación a través de inundación de la zona de la raíz, seguido de dos aplicaciones por goteo de la misma tasa a los 17 y 35 días del trasplante. Se utilizó ACCOMPLISH LM (LOVELAND PRODUCTS) como control comercial y se aplicó de la misma manera que se describe para la combinación RTI301 + RTI477 a una tasa de 2.340 ml/Ha. Este producto contiene una mezcla de *Acidovorax facilis* (1×10^3 ufc/ml), *Bacillus licheniformis* (1×10^3 ufc/ml), *Bacillus subtilis* (1×10^3 ufc/ml), *Bacillus oleronius* (1×10^3 ufc/ml), *Bacillus marinus* (1×10^3 ufc/ml), *Bacillus megaterium* (1×10^3 ufc/ml), y *Rhodococcus rhodochrous* (1×10^3 ufc/ml).

La adición de las esporas RTI301 más RTI477 dio como resultado un aumento en el rendimiento de los pimientos jalapeños en comparación con las plantas de control no tratadas en las que no se aplicaron esporas bacterianas, así como en comparación con las plantas de control comerciales. Específicamente, las plantas tratadas con RTI301 + RTI477 dieron como resultado un total de 4.154 kg/Ha de pimientos comercializables, en comparación con 3.455 kg/Ha y 3.930 kg/Ha para las plantas de control no tratadas y las plantas tratadas con ACCOMPLISH, respectivamente, que representan un incremento en el peso de pimientos comercializables de 20% y 5,7%, respectivamente. El aumento sustancial en el peso de los pimientos comercializables de las plantas tratadas con las esporas de *Bacillus amyloliquefaciens* RTI301 más *Bacillus subtilis* RTI477 en relación con las plantas de control no tratadas y las plantas tratadas con el patrón comercial demuestra el efecto de crecimiento positivo proporcionado por este tratamiento.

Se realizó un estudio de campo similar para plantas de tomate donde se aplicaron esporas a una tasa de $0,625 \times 10^{12}$ UFC/hectárea para *Bacillus amyloliquefaciens* RTI301 y a una tasa de $3,75 \times 10^{12}$ UFC/hectárea para *Bacillus subtilis* RTI477 en el momento de la plantación a través de inundación de la zona de la raíz, seguido de dos aplicaciones por goteo de la misma tasa a los 17 y 35 días del trasplante. Se utilizó ACCOMPLISH LM como control comercial y se aplicó de la misma manera que se describe para la combinación de RTI301 + RTI477 a una tasa de 2.340 ml/Ha.

La adición de las esporas de RTI301 más RTI477 dio como resultado un aumento en el rendimiento total y comercializable de los tomates en comparación con las plantas de control no tratadas en las que las esporas bacterianas no se incluyeron en la inundación y el riego, así como en comparación con las plantas de control comerciales. Específicamente, las plantas tratadas con RTI301 + RTI477 dieron como resultado un total de 21.824 kg/Ha de tomates comercializables, en comparación con 16.765 kg/Ha y 21.420 kg/Ha para las plantas de control no tratadas y las plantas tratadas con ACCOMPLISH, respectivamente, lo que representa un incremento en el peso de los tomates comercializables de 30,2% y 1,9% respectivamente. El aumento sustancial en el peso de los tomates comercializables de las plantas tratadas con las esporas de *Bacillus amyloliquefaciens* RTI301 más *Bacillus subtilis* RTI477, especialmente en comparación con las plantas de control no tratadas, demuestra el efecto de crecimiento positivo proporcionado por este tratamiento.

Se realizó un estudio de campo similar para plantas de calabacín donde se aplicaron esporas de *Bacillus amyloliquefaciens* RTI301 a una tasa de $3,75 \times 10^{12}$ UFC/hectárea y de *Bacillus subtilis* RTI477 a una tasa de $0,625 \times 10^{12}$ UFC/hectárea en el momento de la plantación a través de inundación de la zona de la raíz, sin otra aplicación a través del riego por goteo. Se utilizó ACCOMPLISH LM como control comercial y se aplicó de la misma manera que se describe para la combinación RTI301 + RTI477 a una tasa de 2.340 ml/Ha.

La adición de las esporas de RTI301 más RTI477 dio como resultado un aumento en el rendimiento total y comercializable de calabacín en comparación con las plantas de control no tratadas en las que las esporas bacterianas no se incluyeron en la inundación, así como en comparación con las plantas de control comerciales. Específicamente, las plantas tratadas con RTI301 + RTI477 dieron como resultado un total de 873,4 kg/Ha de calabacín, en comparación con 838,3 kg/Ha y 836,1 kg/Ha para las plantas de control no tratadas y las plantas tratadas con ACCOMPLISH, respectivamente, lo que representa un incremento en el peso total de calabacín de 4,2% y 4,5% respectivamente. El aumento en peso total de calabacín de las plantas tratadas con las esporas de *Bacillus amyloliquefaciens* RTI301 más *Bacillus subtilis* RTI477 en relación con las plantas de control no tratadas y las plantas tratadas con el patrón comercial demuestra el efecto de crecimiento positivo proporcionado por este tratamiento.

Ejemplo 12

Identificación de Nuevos Metabolitos producidos por Productos Aislados de *Bacillus subtilis* RTI477 y *Bacillus Amyloliquefaciens* RTI301

Se ha informado previamente de que cinco clases de metabolitos de tipo Fengicina y metabolitos de tipo Deshidroxifengicina son producidos por especies microbianas que incluyen *Bacillus subtilis* y *Bacillus amyloliquefaciens* (véase, por ejemplo, Li, Xing-Yu, et al., 2013, J. Microbiol. Biotechnol. 23 (3), 313-321; Pecci Y, et al. 2010, Mass Spectrom., 45 (7): 772-77). Estos metabolitos son moléculas de péptidos cíclicos que también contienen un grupo ácido graso. Las cinco clases de metabolitos de tipo Fengicina y Deshidroxifengicina se denominan A, B, C, D y S. La estructura de la cadena principal de estos metabolitos, así como la secuencia de aminoácidos específica para cada una de las cinco clases se muestra en la Figura 6. En *Bacillus subtilis* los compuestos de tipo Fengicina se denominan Plipastatinas. La Plipastatina A y B son similares en peso molecular a Fengicina A y B, y solo difieren en el aspecto de que el residuo de Tirosina en la posición 3 del anillo peptídico es la forma D en las Fengicinas y la forma L en las Plipastatinas, y el residuo de Tirosina en la posición 9 del anillo peptídico es la forma L en las Fengicinas y la

forma D en las Plipastatinas. (Marc Ongena y Philippe Jacques, 2007, Trends in Microbiology Vol.16, Núm.3: 115-125). Para los fines de esta memoria descriptiva y las reivindicaciones, el término "Fengicina" se utilizará para referirse tanto a los metabolitos de Plipastatina como a los metabolitos de Fengicina. De manera similar, para los fines de esta memoria descriptiva y las reivindicaciones, el término "Deshidroxifengicina" se utilizará para referirse tanto a los metabolitos de Deshidroxiplipastatina como a los metabolitos de Deshidroxifengicina.

Los metabolitos de tipo Fengicina y Deshidroxifengicina producidos por *Bacillus subtilis* RTI477 y *Bacillus amyloliquefaciens* RTI301 se analizaron utilizando UHPLC-TOF MS. Los pesos moleculares de estos metabolitos producidos por las cepas después de 6 días de crecimiento en medio 869 o medio 2x SG a 30°C se compararon con los pesos moleculares teóricos esperados para los metabolitos de tipo Fengicina y Deshidroxifengicina. Además, para determinar la composición de aminoácidos de los varios metabolitos de tipo Fengicina producidos por las cepas, se realizó la secuenciación de péptidos utilizando LC-MS-MS en cada uno de los metabolitos de tipo Fengicina previamente identificados a través de UHPLC-TOF MS. De esta manera, se determinó que las cepas producen Fengicina A, B, C, D y S y Deshidroxifengicina A, B, C, D y S. Sorprendentemente, además de estos compuestos conocidos, se determinó que las cepas también producen derivados previamente no identificados de estos compuestos.

Por ejemplo, se determinó que la cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* RTI301 produce compuestos de tipo Fengicina y Deshidroxifengicina donde la L-isoleucina en la posición 8 de la cadena de péptidos cíclicos (denominada X₃ en la Figura 6) se reemplaza por L-metionina. Las nuevas clases de Fengicina y Deshidroxifengicina se denominan en la presente memoria MA, MB y MC, en referencia a los derivados de las clases A, B y C en las que la L-isoleucina en X₃ en la Figura 6 ha sido reemplazada por L-metionina. Las moléculas recientemente identificadas se muestran en la Figura 6 y en la Tabla IX a continuación. Los compuestos de Fengicina MA, MB y MC recientemente identificados también se observaron para la cepa RTI477, sin embargo, no se observaron los correspondientes compuestos de Deshidroxifengicina MA, MB y MC para la cepa RTI477 (Tabla IX).

Se determinó adicionalmente que la cepa RTI301 produce una clase adicional de Fengicina y Deshidroxifengicina que no se ha identificado previamente. En esta clase, la L-isoleucina de Fengicina B y Deshidroxifengicina B (posición X₃ en la Figura 6) se reemplaza por L-homo-cisteína (Hcy). Estos metabolitos de Fengicina y Deshidroxifengicina previamente no identificados se denominan en la presente memoria Fengicina H y Deshidroxifengicina H y se muestran en la Figura 6 y Tabla IX. El compuesto Fengicina H recientemente identificado también se observó para la cepa RTI477, sin embargo, el correspondiente compuesto Deshidroxifengicina H no se observó para la cepa RTI477 (Tabla IX).

Se determinó adicionalmente que la cepa RTI301 produce una clase adicional de metabolitos de Fengicina y Deshidroxifengicina no identificados previamente. En esta clase, el aminoácido en la posición 4 de la estructura de la cadena principal del péptido cíclico (posición X₁ en la Figura 6) se reemplaza por L-isoleucina. Estos metabolitos previamente no identificados se denominan en la presente memoria Fengicina I y Deshidroxifengicina I y se muestran en la Figura 6 y en la Tabla IX. Tanto los compuestos recientemente identificados de Fengicina I como de Deshidroxifengicina I también se observaron para la cepa RTI477 (Tabla IX).

En la Tabla IX a continuación se proporciona un resumen de las secuencias de aminoácidos para los metabolitos de tipo Fengicina y Deshidroxifengicina previamente referidos y los metabolitos recientemente identificados.

Tabla IX. Resumen de la identificación MS/MS de metabolitos de tipo Fengicina en productos aislados de *Bacillus subtilis* RT1477 y *Bacillus amyloliquefaciens* RT1301.

Homólogo	X ₁	X ₂	X ₃	R	Masa del Anillo	Fórmula molecular teórica C16	C16 Teórico [M + H] ⁺	RT1301 observado	RT1477 observado
Fengicina A	Ala	Thr	Ile	OH	1080,6	C ₇₂ H ₁₁₀ N ₁₂ O ₂₀	1463,8	C15, C16, C17	C14, C15, C16, C17
Fengicina B	Val	Thr	Ile	OH	1108,7	C ₇₄ H ₁₁₄ N ₁₂ O ₂₀	1491,8	C14, C15, C16, C17	C14, C15, C16, C17
Fengicina C	Aba	Thr	Ile	OH	1094,6	C ₇₃ H ₁₁₂ N ₁₂ O ₂₀	1477,8	C14, C15, C16, C17	C14, C15, C16, C17
Fengicina D	Val	Thr	Val	OH	1094,6	C ₇₃ H ₁₁₂ N ₁₂ O ₂₀	1477,8	C14, C15, C16, C17	C14, C15, C16, C17
Fengicina S	Val	Ser	Ile	OH	1094,6	C ₇₃ H ₁₁₂ N ₁₂ O ₂₀	1477,8	C14, C15, C16, C17	C14, C15, C16, C17
Fengicina MA	Ala	Thr	Met	OH	1098,7	C ₇₁ H ₁₀₈ N ₁₂ O ₂₀ S	1481,8	C15, C16, C17	C15, C16, C17
Fengicina MB	Val	Thr	Met	OH	1126,8	C ₇₃ H ₁₁₂ N ₁₂ O ₂₀ S	1509,8	C14, C15, C16	C14, C15, C16, C17
Fengicina MC	Aba	Thr	Met	OH	1112,7	C ₇₂ H ₁₁₀ N ₁₂ O ₂₀ S	1495,8	C14, C15, C16, C17	C14, C15, C16, C17
Fengicina H	Val	Thr	Hcy	OH	1112,7	C ₇₂ H ₁₁₀ N ₁₂ O ₂₀ S	1495,8	C14, C15, C16, C17	C14, C15, C16, C17
Fengicina I	Ile	Thr	Ile	OH	1122,8	C ₇₅ H ₁₁₆ N ₁₂ O ₂₀	1505,8	C16, C17	C16
Deshidroxifengicina A	Ala	Thr	Ile	H	1080,6	C ₇₂ H ₁₁₀ N ₁₂ O ₁₉	1447,8	C15, C16, C17	C14, C15, C16, C17
Deshidroxifengicina B	Val	Thr	Ile	H	1108,7	C ₇₄ H ₁₁₄ N ₁₂ O ₁₉	1475,8	C14, C15, C16, C17	C14, C15, C16, C17
Deshidroxifengicina C	Aba	Thr	Ile	H	1094,6	C ₇₃ H ₁₁₂ N ₁₂ O ₁₉	1461,8	C14, C15, C16, C17	C14, C15, C16, C17
Deshidroxifengicina D	Val	Thr	Val	H	1094,6	C ₇₃ H ₁₁₂ N ₁₂ O ₁₉	1461,8	C14, C15, C16, C17	C14, C15, C16, C17
Deshidroxifengicina S	Val	Ser	Ile	H	1094,6	C ₇₃ H ₁₁₂ N ₁₂ O ₁₉	1461,8	C14, C15, C16, C17	C14, C15, C16, C17
Deshidroxifengicina MA	Ala	Thr	Met	H	1098,7	C ₇₁ H ₁₀₈ N ₁₂ O ₁₉ S	1465,7	C14	No observado
Deshidroxifengicina MB	Val	Thr	Met	H	1126,8	C ₇₃ H ₁₁₂ N ₁₂ O ₁₉ S	1493,8	C15	No observado
Deshidroxifengicina MC	Aba	Thr	Met	H	1112,7	C ₇₂ H ₁₁₀ N ₁₂ O ₁₉ S	1479,8	C15	No observado
Deshidroxifengicina H	Val	Thr	Hcy	H	1112,7	C ₇₂ H ₁₁₀ N ₁₂ O ₁₉ S	1479,8	C14, C15, C16	No observado
Deshidroxifengicina I	Ile	Thr	Ile	H	1122,8	C ₇₅ H ₁₁₆ N ₁₂ O ₁₉	1489,9	C14, C15, C16	C14, C15, C16

Listado de secuencias

<110> FMC Corporation

<120> Composiciones microbianas y métodos de uso para beneficiar el crecimiento de las plantas y tratar enfermedades de plantas

5 <130> 115111.00249

<140>

<141>

<150> US 62/097,287

<151> 29-12-2014

10 <170> PatentIn version 3.5

<160> 4

<210> 1

<211> 1556

<212> ADN

15 <213> Bacillus subtilis

<400> 1

atztatcgga gagtttgatc ctggctcagg acgaacgctg gcggcggtgcc taatacatgc	60
aagtcgagcg gacagatggg agcttgctcc ctgatgttag cggcggacgg gtgagtaaca	120
cgtgggtaac ctgcctgtaa gactgggata actccgggaa accggggcta ataccgatg	180
gttgtttgaa ccgcatgggt caaacataaa aggtggcttc ggctaccact tacagatgga	240
cccgcggcgc attagctagt tggtagagta atggctcacc aaggcaacga tgcgtagccg	300
acctgagagg gtgatcgccc aactggggac tgagacacgg ccagactcc tacgggaggg	360
agcagtaggg aatcttccgc aatggacgaa agtctgacgg agcaacgccg cgtgagtgat	420
gaaggttttc ggatcgtaaa gctctgttgt tagggaagaa caagtaccgt tcgaataggg	480
cggtagcttg acggtaccta accagaaagc cacggctaac tacgtgccag cagccgcggt	540
aatacgtagg tggcaagcgt tgtccgggaa ttattgggcg taaagggtc gcaggcggtt	600
tcttaagtct gatgtgaaag ccccggtc aaccggggag ggtcattgga aactggggaa	660
cttgagtgca gaagaggaga gtggaattcc acgtgtagcg gtgaaatgcg tagagatgtg	720
gaggaacacc agtggcgaag gcgactctct ggtctgtaac tgacgctgag gagcgaaagc	780
gtggggagcg aacaggatta gataccctgg tagtccacgc cgtaaaccgat gagtgctaag	840
tgttaggggg tttccgcccc ttagtgctgc agctaacgca ttaagcactc cgcctgggga	900
gtacggtcgc aagactgaaa ctcaaaggaa ttgacggggg cccgcacaag cggtaggagca	960
tgtgggtttaa ttogaagcaa cgcgaagaac cttaccaggt cttgacatcc tctgacaatc	1020

ES 2 759 336 T3

ctagagatag gacgtcccct tccggggcag agtgacaggt ggtgcatggt tgcgtcagc	1080
tgcgtgcgtg agatgttggg ttaagtcccg caacgagcgc aacccttgat cttagttgcc	1140
agcattcagt tgggcactct aagggtgactg ccggtgacaa accggaggaa ggtggggatg	1200
acgtcaaata atcatgcccc ttatgacctg ggctacacac gtgctacaat ggacagaaca	1260
aagggcagcg aaaccgcgag gttaagccaa tcccacaaat ctgttctcag ttcggatcgc	1320
agtctgcaac tgcactgcgt gaagctggaa tgcctagtaa tgcgggatca gcatgccgcg	1380
gtgaatacgt tcccgggctt tgtacacacc gcccgtcaca ccacgagagt ttgtaacacc	1440
cgaagtcggt gaggtaacct tttaggagcc agccgccgaa ggtgggacag atgattgggg	1500
tgaagtcgta acaaggtagc cgtatcgga ggtgcggctg gatcacctcc tttcta	1556

<210> 2
 <211> 3441
 <212> ADN
 <213> Bacillus subtilis

5

<400> 2

atgtttcaag acatatcacc aattgaggat ttcactggta acctctctct tgagttcatt	60
gattatagtt taggtgagcc taaatatcct gtagaggaat caaaagaacg tgatgtgact	120
tactcagctc cgctaagagt gaagggtcgt ttaattaaca aagaaactgg agaggtaaaa	180
gaccaagatg tcttcatggg tgatttccct attatgacag atacaggtac ttttatcatt	240
aacgggtcgg aacgtgttat cgtttcccg cttgttcgggt ctccaagtgt atatttcagt	300
ggtaaagtag acaaaaacgg taaaaaagggt tttaccgcaa ctgtcattcc aaaccgtggc	360
gcatggttag aatacgaaac tgatgcgaaa gatgttggtt atgtccgcat tgatcgacac	420
cgtaagttgc cggttacggt tcttttgctg gctctcggct tccgctccga tcaagagatt	480
cttgatctca taggagaaaa cgaataacct cgaaatacgc ttgataaaga taacacagaa	540
aacagcgaca aagcgttgct ggaaatttac gagcgtctcc gtcctggaga gccgcctaca	600
gtagaaaatg cgaaaagctt gcttgattct cgtttctttg atccgaaacg atacgatctt	660
gccaatgtag gacgctataa aattaataaa aaacttcata ttaagaatcg cctcttcaat	720
cagagacttg ctgaaacgct tgttgatcct gaaacaggag aaatccttgc tgaaaaagggt	780
cagattcttg atagaagaac acttgataaa gtactgccat acttagaaaa cggaatcgggt	840
tttagaaagc tgtatccgaa tggcggcggt gttgaagatg aagtgactct tcaatcaatt	900
aaaatctttg ctccgactga tcaagaagga gaacaggtta ttaatgtaat cggcaatgct	960
tacatcgaag aagagattaa aaacatcacg cctgctgata ttatttcttc aatcagctac	1020
ttcttcaacc tgctgcacgg agtaggcgac acagatgata tcgatcatct tggaaaccgc	1080
cgtttacggt ctgtaggtga gcttctccag aaccaattcc gtatcggttt aagccgatg	1140

ES 2 759 336 T3

gagcgtgtgg	ttcgtgagag	aatgtcaatt	caagatacga	atacaattac	gcctcagcag	1200
ctgatcaata	ttcgtcctgt	tattgocgtcc	attaaagagt	tcttttgaag	ctcacagctt	1260
tctcaattca	tggatcagac	gaaccocgctt	gctgaattaa	cgcacaagcg	tcgtctgtca	1320
gcattaggac	cgggtggatt	gacacgtgag	cgtgccggaa	tggaaagtgcg	tgacgttcac	1380
tactcccact	atggccgtat	gtgtccgatt	gaaacgcctg	agggcccgaa	catcggtttg	1440
atcaactcac	tatcatctta	tgcaaaagta	aaccgttttg	gctttattga	aacgccatat	1500
cgcgcgcttg	accctgaaac	aggggaaggt	acgggcagaa	tcgattactt	aactgctgat	1560
gaagaggata	actatgttgt	cgctcaagcg	aatgctcgtc	ttgatgacga	aggcgccttt	1620
attgatgaca	gcacgttagc	tcgtttccgc	ggggagaaca	ccgttgtttc	cagaaatcgt	1680
gtagactaca	tggatgtatc	gcctaagcag	gttgtatctg	ctgcgacagc	atgtatcccg	1740
ttcttagaaa	acgatgactc	caaccgtgcc	ctcatgggag	cgaacatgca	gcgtcaggct	1800
gtgcctttga	tcagcccgga	agcgccatct	gttggaaactg	gtatggaata	cgtatcagga	1860
aaagactctg	gtgccgctgt	tatttgtaaa	caccctggta	tcgttgaacg	cgtagaagcg	1920
aaaaacgttt	gggttcgccg	ttatgaagaa	gtagacggtc	aaaaagtaaa	aggaaacctg	1980
gataaataca	gcctgctgaa	atttgctccgc	tctaaccaag	gtacgtgcta	caaccagcgt	2040
ccgatcgtaa	gtgtcggcga	tgaagtggta	aaaggagaaa	tccttgctga	cggtccttct	2100
atggagcttg	gtgaacttgc	acttggccgt	aacgtaatgg	tcggcttcat	gacatgggat	2160
ggctacaact	atgaggatgc	catcatcatg	agtgaacgcc	tagtgaagga	tgatgtttat	2220
acatctatcc	acattgaaga	atacgaatca	gaagcacgtg	atacgaaact	tggacctgaa	2280
gaaatcactc	gcgatattcc	aaacgtcggg	gaagatgcgc	ttcgcaatct	tgatgaccgc	2340
ggaatcatcc	gtattggggc	agaagtaaaa	gacggagatc	ttcttggttg	taaagtaacg	2400
cctaaaggcg	taactgaact	gactgcagaa	gaacgccttc	ttcacgccat	ctttggcgag	2460
aaagcccgcg	aggttcgtga	tacttctctt	cgtgtgcctc	atggcggcgg	cgggaattatc	2520
catgacgtta	aagtcttcaa	ccgtgaagac	ggagacgaac	ttcctccagg	tgtaaacag	2580
ttagtacgcg	tatatatcgt	tcagaaacgt	aagatttctg	aaggggataa	aatggccggt	2640
cgtcacggta	acaaagggtg	tatctctaag	attcttcctg	aagaggatat	gccttacctt	2700
cctgacggca	caccaattga	tatcatgctt	aaccgcgtgg	gcgtaccatc	acgtatgaac	2760
atcgggcagg	tattggaact	tcacatgggt	atggccgctc	gttaccttgg	cattcacatt	2820
gcacctcctg	tatttgacgg	agcgcgagaa	gaggatgtct	gggaaacact	tgaagaagcc	2880
ggcatgtctc	gtgacgcaa	aacagtgtt	tacgacggac	gtactggaga	gccgtttgat	2940
aaccgtgtat	ctgtcgggtat	catgtacatg	atcaaactag	ctcacatggg	tgacgataaa	3000

ES 2 759 336 T3

cttcatgcac gctctacagg cccttactca cttgttacgc agcagcctct tggcggtaaa 3060
gcgcaatttg gcggacagcg ttttggtgag atggagggtt gggcacttga agcttacggt 3120
gcggccttaca ctcttcaaga aattctgact gttaagtctg atgacgtggt tggacgtgtg 3180
aaaacatacg aagccatcgt taaaggcgac aatgttcctg aaccagggtgt tccggaatca 3240
ttcaaagtat taatcaaaga acttcaaagc ttaggtatgg atgtcaaaat cttttctggt 3300
gatgaagaag aaatagaaat gagagattta gaagacgaag aagatgcgaa acaagctgac 3360
ggcctggcat tatcagggtga tgaagagccg gaagaaacag catctgcaga cgttgaacgc 3420
gatgtagtaa caaaagaata a 3441

<210> 3

<211> 1554

<212> ADN

5 <213> Bacillus amyloliquefaciens

<400> 3

ctttatcgga gagtttgatc ctggctcagg acgaacgctg gcggcgtgcc taatacatgc 60
aagtcgagcg gacagatggg agcttgctcc ctgatgttag cggcggacgg gtgagtaaca 120
cgtgggtaac ctgcctgtaa gactgggata actccgggaa accggggcta ataccggatg 180
gttgtctgaa ccgcatgggt cagacataaa aggtggcttc ggctaccact tacagatgga 240
cccgcggcgc attagctagt tggtgaggta acggctcacc aaggcaacga tgcgtagccg 300
acctgagagg gtgatcggcc aactggggac tgagacacgg ccagactcc tacgggaggg 360
agcagtaggg aatcttccgc aatggacgaa agtctgacgg agcaacgccg cgtgagtgat 420
gaaggttttc ggatcgtaaa gctctgttgt tagggaagaa caagtgccgt tcaaataggg 480
cggcaccttg acggtaccta accagaaagc cacggctaac tacgtgccag cagccgcggt 540
aatacgtagg tggcaagcgt tgtccggaat tattgggcgt aaagggctcg caggcggttt 600
cttaagtctg atgtgaaagc ccccggtca accggggagg gtcattggaa actggggaac 660
ttgagtgcag aagaggagag tggaattcca cgtgtagcgg tgaaatgcgt agagatgtgg 720
aggaacacca gtggcgaagg cgactctctg gtctgtaact gacgctgagg agcgaaagcg 780
tggggagcga acaggattag ataccctggt agtccacgcc gtaaacgatg agtgctaagt 840
gttaggggggt ttccgcccct tagtgctgca gctaacgcat taagcactcc gcctggggag 900
kacggtcgca agactgaaac tcaaaggaat tgacgggggc ccgcacaagc ggkggagcat 960
gtggtttaat tcgaagcaac gcgaagaacc ttaccaggtc ttgacatcct ctgacaatcc 1020
tagagatagg acgtcccctt cgggggcaga gtgacagggt gtgcatgggt gtcgtcagct 1080
cgtgtcgtga gatgttgggt taagtccgc aacgagcgca acccttgatc ttagttgcca 1140
gcattcagtt gggcactcta aggtgactgc cggtgacaaa ccggaggaag gtggggatga 1200

ES 2 759 336 T3

cgTcaaataca tcatgcccct tatgacctgg gctacacacg tgctacaatg gacagaacaa 1260
 agggcagcga aaccgcgagg ttaagccaat cccacaaatc tgttctcagt tcggatcgca 1320
 gtctgcaact cgactgctg aagctggaat cgctagtaat cgcgatcag catgccgcgg 1380
 tgaatacgtt cccgggcctt gtacacaccg cccgtcacac cagcagagtt tgtaacaccc 1440
 gaagtccgtg aggtaacctt tatggagcca gccgcogaag gtgggacaga tgattgggg 1500
 gaagtcgtaa caaggtagcc gtatcggaag gtgcggtgg atcacctcct ttct 1554

<210> 4

<211> 3246

<212> ADN

5 <213> Bacillus amyloliquefaciens

<400> 4

atgggtgatt tccctattat gacagatacc ggtactttta tcatcaacgg tgcagaacgt 60
 gttatcgtat ctcagcttgt tcggtctcca agtgtatatt tcagtggtaa agtagacaag 120
 aacggtaaaa aagggttttac cgcgactgtc attccaaacc gtggcgcgat gttagaatac 180
 gaaactgatg cgaagatgt tgtgtatgtc cgcattgatc gcacacgtaa gttgccgggt 240
 acggttcttt tgcgtgctct cggcttcggg tccgaccaag agattctcga tctcattggt 300
 gagaacgaat atctccgcaa tacactggat aaggacaaca ctgaaaacag tgacaaagcg 360
 cttcttgaaa tctatgagcg cttcgtccc ggagagccgc ctacagtaga aaacgcaaaa 420
 agcttgctgg attcccgttt cttcgatccg aagcgatacg accttgcgaa tgtaggacgc 480
 tataaaatta ataaaaagct tcatatcaag aaccgcctgt ttaaccagcg cttgcagaa 540
 aactgggtgg atccggaaac cggtgaaatt ctgctgaaa aagggcagat tcttgacaga 600
 agaacacttg ataaagtact gccatactta gaaaatggaa tcggcttcag aaagctttat 660
 cctaacggcg gcgttgctga ggatgaagtg atgcttcaat ccattaaaat ctatgctcct 720
 accgatgcag aaggagagca gacgatcaat gtgatcggca atgcttacat cgaagaggcg 780
 attaaaaaca ttacgcctgc tgatattatt tcttctatca gctacttctt caacctcctg 840
 cacggagtgg gcgacactga tgatatcgac catctcggaa accgccgtct gcgttctgta 900
 ggtgagctcc tgcaaaacca attccgtatc ggtttaagcc ggatggaacg tgcgtacgt 960
 gaaagaatgt ctattcaaga cacgaatata attacgccgc agcagctgat taacatcaga 1020
 cctgttattg cgtctattaa agagttcttc ggaagctcac agctttctca attcatggat 1080
 cagacgaacc cgcttgctga attgacgcac aaacgccgtc tgcagctct cggaccgggc 1140
 ggtttgacac gtgagcgcgc aggtatggaa gtacgtgacg ttactactc tcatatggc 1200
 cgtatgtgtc cgattgaaac gcctgagggc ccgaacatcg gtttgatcaa ctcatgtca 1260
 tcatttgoga aagtaaaccg ctttggtttc attgagacgc cataccgccg cgttgatcct 1320

ES 2 759 336 T3

gaaacaggaa aagtaacgcc tagaatcgac tacctgactg ctgatgaaga ggataactat	1380
gtcgtagccc aagcgaatgc taagctgagc gatgacggtt ctttcttgga tgacagcatc	1440
gtagcgcggtt tcagagggga aaacaccggt gtagcccgca accgcgtgga ttacatggac	1500
gtatctccta aacagggtgt atctgctgcg acagcatgta ttccgttctt ggaaaacgat	1560
gactcgaacc gcgccctcat gggagcgaac atgcagcgtc aggctgtgcc tttgatgcag	1620
ccggaagctc cgatcgtcgg aacgggtatg gaatacgtat ccggtaaaga ctccggtgca	1680
gccgttattt gtaaacaccc tggtatcggt gaacgggtgg aagcgaaaaa cgtatgggtg	1740
cgccgctatg aagaaattga cggccaaaaa gtaaaaggca acctggataa gtacagcttg	1800
ctgaaatttg tccgctccaa ccaaggtagc tgctacaacc agcgtccgat cgtcagtgtc	1860
ggcgatgaag tagtcaaagg agaaatcctt gctgacggac cttcaatgga gcttggtgaa	1920
cttgctctcg gccgcaacgt aatggtcggc ttcattgacat gggatgggta caactatgag	1980
gatgccatca tcatgagtga acgccttggt aaagatgatg tatacacatc tattcacatt	2040
gaagaatatg aatcagaagc acgtgataca aagcttgggc cggaagagat caccgcgat	2100
attccaaacg taggggaaga cgcgcttcgc aatcttgatg accgcggaat tatccgtatc	2160
ggtgcggaag tcaacgacgg agaccttctc gtaggtaaag taacgcctaa aggtgtaact	2220
gagcttacgg ctgaagaacg ccttctgcat gcgatctttg gagaaaaagc gcgtgaagtc	2280
cgtgatactt ctctccgtgt gcctcacggc ggcggcgga ttatccacga cgtaaaagtc	2340
ttcaaccgtg aagacggcga cgaacttcct ccgggagtga accagcttgt acgcgtatat	2400
atcgttcaga aacgtaagat ttctgaaggt gataaaatgg ccggacgtca cggaacaaaa	2460
ggggttatct cgaagattct tctgaagaa gatatgcctt accttctga cggcacgccg	2520
atcgatatca tgcttaaccc gctgggtgta ccatcacgta tgaatatcgg tcaggtatta	2580
gaacttcaca tgggtatggc tgcccgtac ctcggcattc acatcgcgtc acctgtattt	2640
gacggcgcgc gtgaagaaga tgtgtgggaa acacttgaag aagcaggcat gtcaagagac	2700
gctaaaacag ttctttatga cggcgtacg ggtgaaccgt ttgacaaccg tgtatctgtc	2760
ggaatcatgt acatgatcaa actggcacac atggttgatg ataaacttca tgcccgttct	2820
acaggctcctt actcacttgt tacgcagcag cctctcggcg gtaaagccca attcggcgga	2880
cagcgtttcg gtgagatgga gggttgggcg cttgaagctt acggcgcgag ttacacgctt	2940
caagaaatcc tgactgtgaa gtccgatgac gtggtcggac gtgtgaaaac atatgaagcc	3000
atcgtcaaag gcgacaatgt tccagagcct ggtgttccgg aatcattcaa agtattgatc	3060
aaagagcttc aaagcttagg tatggacgtg aaaatccttt caggcgatga agaagaaata	3120
gaaatgagag atctagaaga cgaggaagat gcgaaacaag ctgacggcct tgcattatca	3180
ggtgatgaag cgccggaaga aacagcatct ccagacgttg aacgtgacgc agtaacgaaa	3240
gaatag	3246

REIVINDICACIONES

1. Una composición para beneficiar el crecimiento de las plantas y/o la salud de las plantas, comprendiendo la composición:
un cultivo biológicamente puro de *Bacillus amyloliquefaciens* RTI301 depositado como ATCC Núm. PTA-121165; y
5 un cultivo biológicamente puro de *Bacillus subtilis* RTI477 depositado como ATCC Núm. PTA-121167,
en donde la aplicación de la composición a la semilla de la planta, las raíces de la planta o al suelo que rodea la planta beneficia el crecimiento de las plantas y/o la salud de las plantas.
2. La composición de la reivindicación 1, en donde la composición está en forma de un líquido y cada uno de los *Bacillus subtilis* RTI477 y el *Bacillus amyloliquefaciens* RTI301 está presente a una concentración de $1,0 \times 10^8$ UFC/ml a $1,0 \times 10^{12}$ UFC/ml.
10 3. La composición de la reivindicación 1, en donde la composición está en forma de un espolvoreable, un polvo mojable seco, un gránulo dispersable o un gránulo mojable seco y cada uno de *Bacillus subtilis* RTI477 y *Bacillus amyloliquefaciens* RTI301 está presente en una cantidad de $1,0 \times 10^8$ UFC/g a $1,0 \times 10^{12}$ UFC/g.
4. La composición de la reivindicación 1, en donde la composición está en forma de una dispersión en aceite y cada uno de *Bacillus subtilis* RTI477 y *Bacillus amyloliquefaciens* RTI301 está presente a una concentración de $1,0 \times 10^8$ UFC/ml a $1,0 \times 10^{12}$ UFC/ml.
15 5. La composición de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente uno o una combinación de un insecticida, fungicida, nematocida, bactericida, herbicida, extracto de plantas, regulador de crecimiento de plantas o fertilizantes microbianos, biológicos o químicos presentes en una cantidad adecuada para beneficiar el crecimiento de las plantas y/o para conferir protección contra una infección patogénica en la planta.
20 6. Una semilla de planta recubierta con la composición según la reivindicación 1.
7. Un método para beneficiar el crecimiento de las plantas y/o la salud de las plantas, comprendiendo el método: suministrar a la semilla de una planta, raíces de una planta o al suelo que rodea una planta una composición que comprende:
25 un cultivo biológicamente puro de *Bacillus amyloliquefaciens* RTI301 depositado como ATCC Núm. PTA-121165; y
un cultivo biológicamente puro de *Bacillus subtilis* RTI477 depositado como ATCC Núm. PTA-121167,
en donde el suministro de la composición beneficia el crecimiento de las plantas y/o la salud de las plantas.
8. Un método para beneficiar el crecimiento de las plantas y/o la salud de las plantas, comprendiendo el método:
plantar una semilla de una planta en un medio de crecimiento adecuado, en donde la semilla se ha recubierto con una
30 composición que comprende:
esporas de un cultivo biológicamente puro de *Bacillus amyloliquefaciens* RTI301 depositado como ATCC Núm. PTA-121165; y
esporas de un cultivo biológicamente puro de *Bacillus subtilis* RTI477 depositado como ATCC Núm. PTA-121167,
en donde *Bacillus amyloliquefaciens* RTI301 y *Bacillus subtilis* RTI477 están presentes en una cantidad adecuada
35 para beneficiar el crecimiento de las plantas y/o la salud de las plantas.
9. Un producto que comprende:
una primera composición que es la composición de la reivindicación 1;
una segunda composición que comprende uno o una combinación de un insecticida, fungicida, nematocida, bactericida, herbicida, extracto de plantas, regulador de crecimiento de plantas o fertilizante microbiano, biológico o químico, en
40 donde la primera y segunda composiciones se envasan por separado; e
instrucciones para suministrar en una cantidad adecuada para beneficiar el crecimiento de la planta, una combinación de la primera y segunda composiciones al: follaje de la planta, corteza de la planta, fruto de la planta, flores de la planta, semilla de la planta, raíces de la planta, un esqueje de la planta, un injerto de la planta, tejido calloso de la planta; suelo o medio de crecimiento que rodea la planta; suelo o medio de crecimiento antes de la siembra de la
45 semilla de la planta en el suelo o medio de crecimiento; o suelo o medio de crecimiento antes de plantar la planta, el esqueje de la planta, el injerto de la planta o el tejido calloso de la planta en el suelo o medio de crecimiento.
10. El producto de la reivindicación 9, en donde el insecticida es uno o una combinación de piretroides, bifentrina,

teflutrina, zeta-cipermetrina, organofosfatos, cloretoxifos, clorpirifos, tebupirimfos, ciflutrina, fiproles, fipronil, nicotinoides, o clotianidina.

- 5 11. El producto de la reivindicación 9, en donde la primera composición está en forma de un líquido y cada uno de *Bacillus amyloliquefaciens* RTI301 y *Bacillus subtilis* RTI477 está presente a una concentración de $1,0 \times 10^8$ UFC/ml a $1,0 \times 10^{12}$ UFC/ml.
12. El producto de la reivindicación 9, en donde la primera composición está en forma de un espolvoreable, un polvo mojable seco, un gránulo dispersable o un gránulo mojable seco y cada uno de *Bacillus amyloliquefaciens* RTI301 y *Bacillus subtilis* RTI477 está presente en una cantidad de $1,0 \times 10^8$ UFC/g a $1,0 \times 10^{12}$ UFC/g.
- 10 13. El producto de la reivindicación 9, en donde la primera composición está en forma de una dispersión en aceite y cada uno de *Bacillus amyloliquefaciens* RTI301 y *Bacillus subtilis* RTI477 está presente a una concentración de $1,0 \times 10^8$ UFC/ml a $1,0 \times 10^{12}$ UFC/ml.

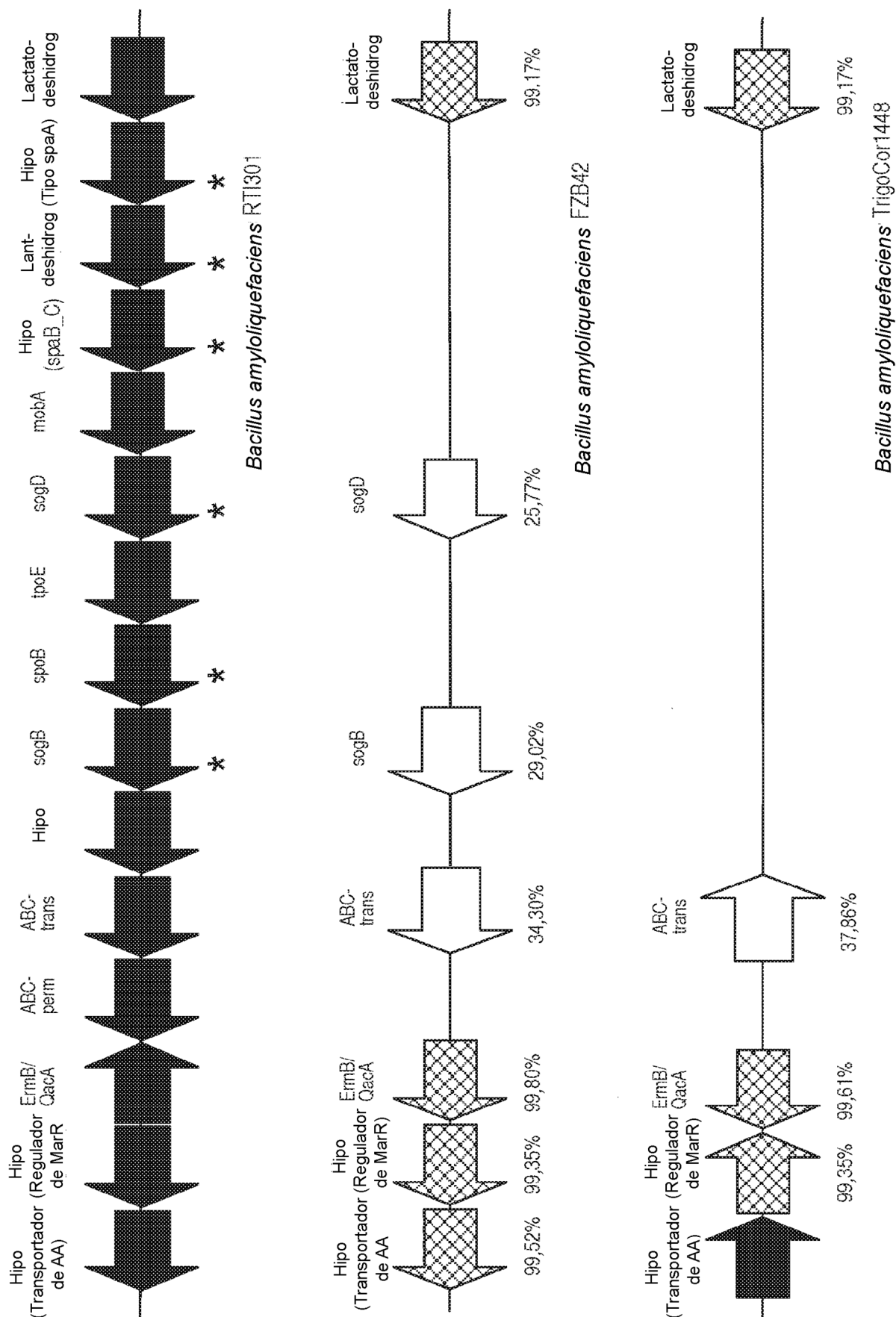


FIG. 1

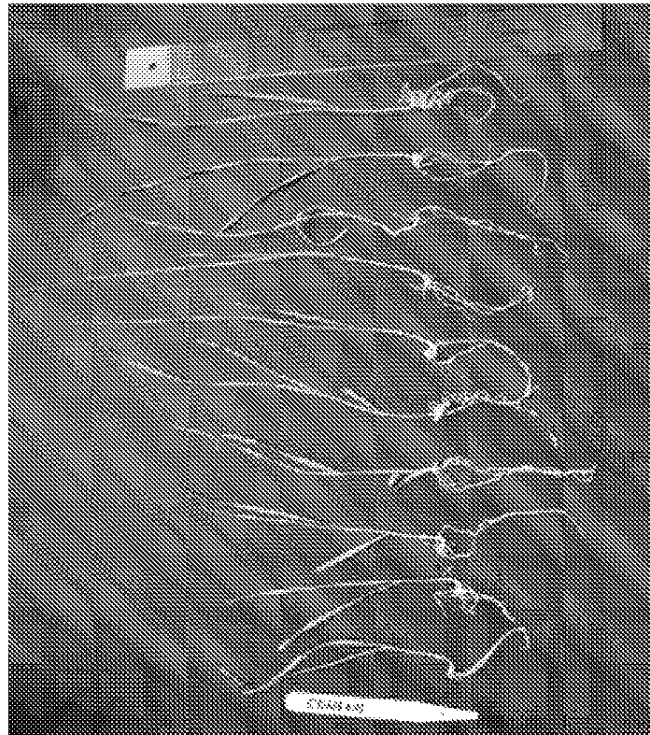


FIG. 2A

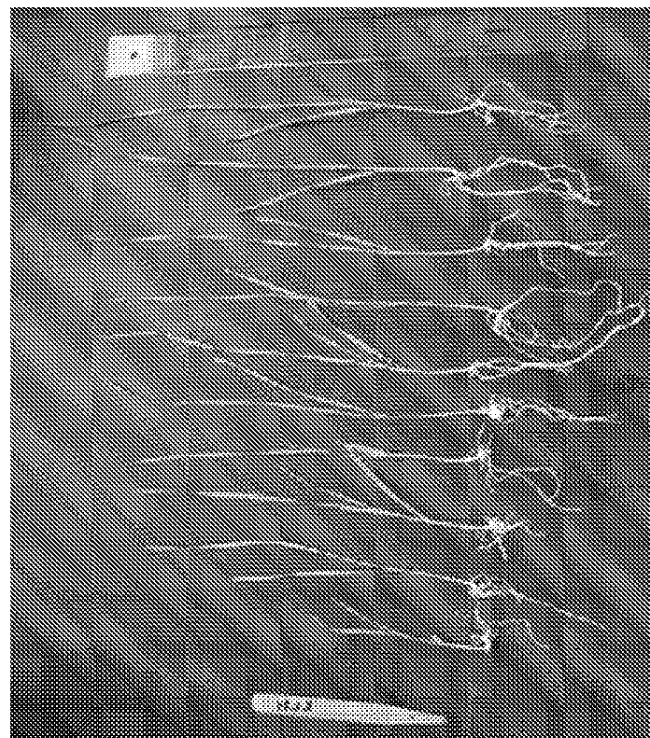


FIG. 2B

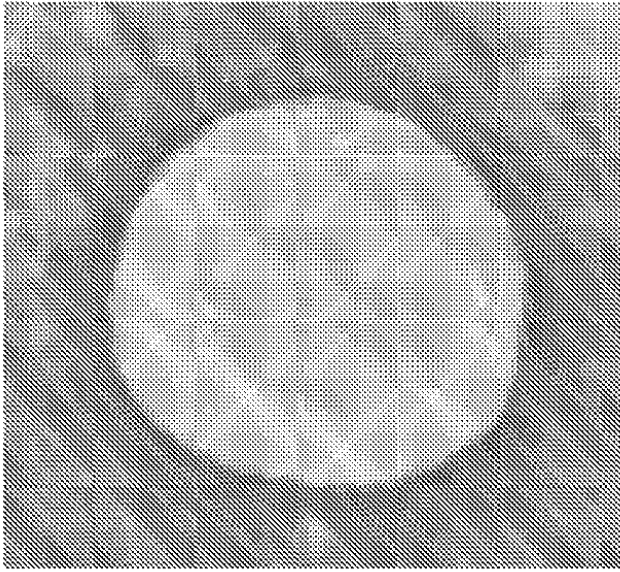


FIG. 3A

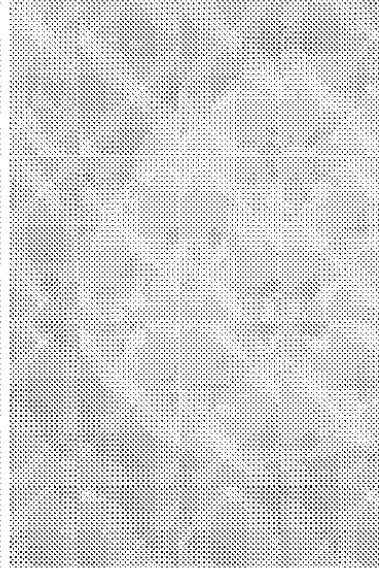


FIG. 3B

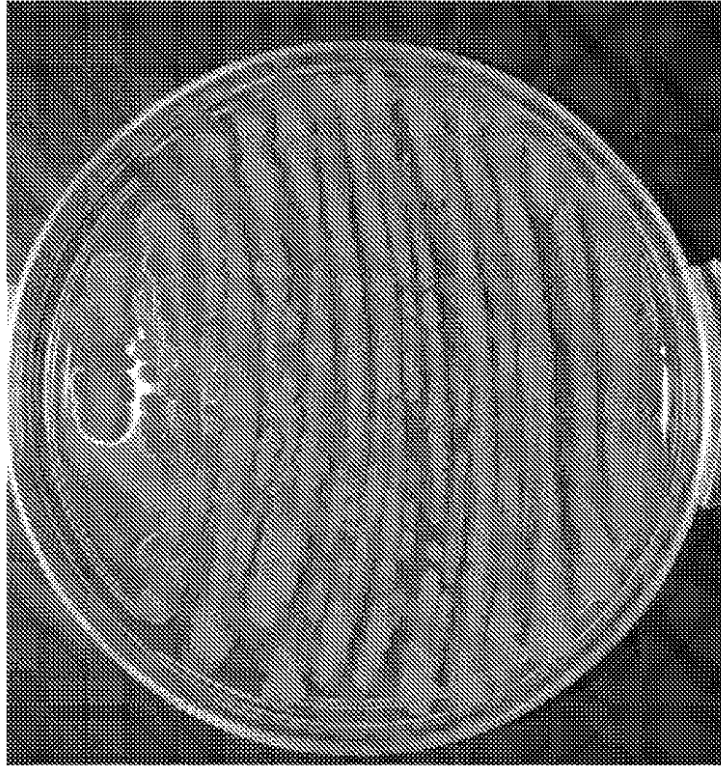


FIG. 4B

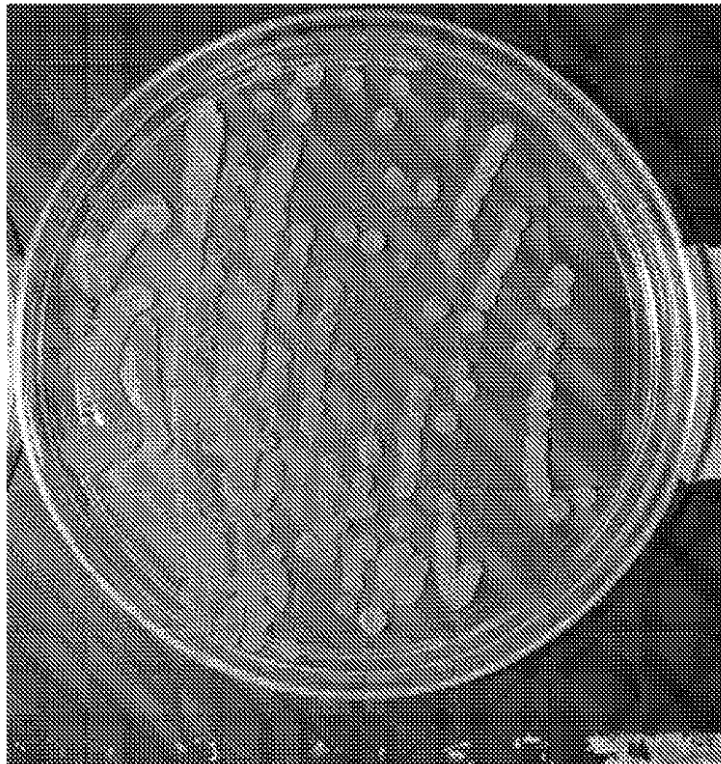
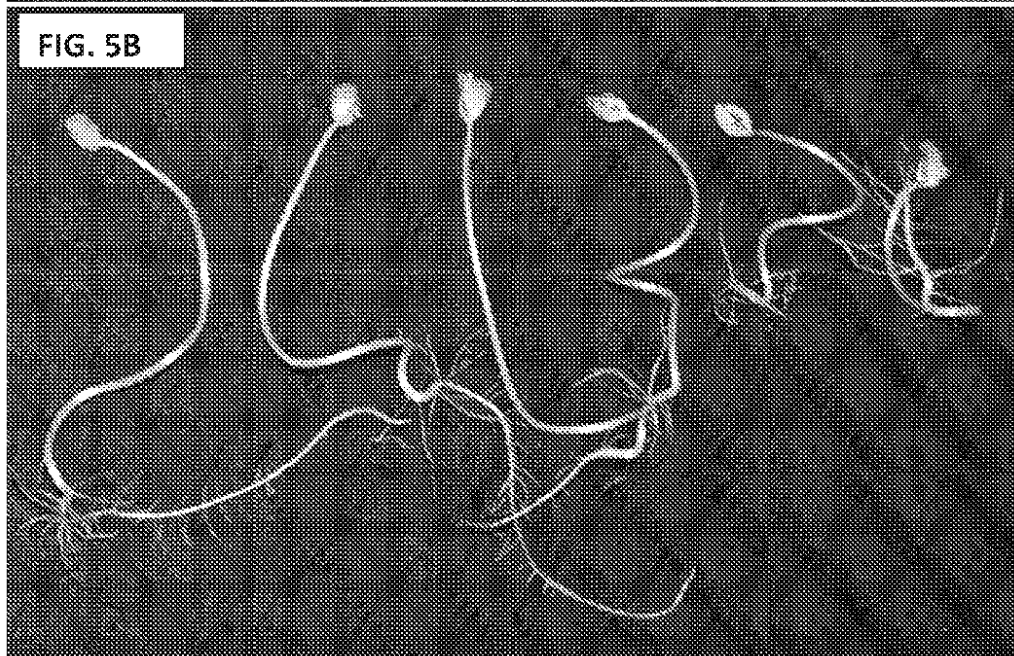
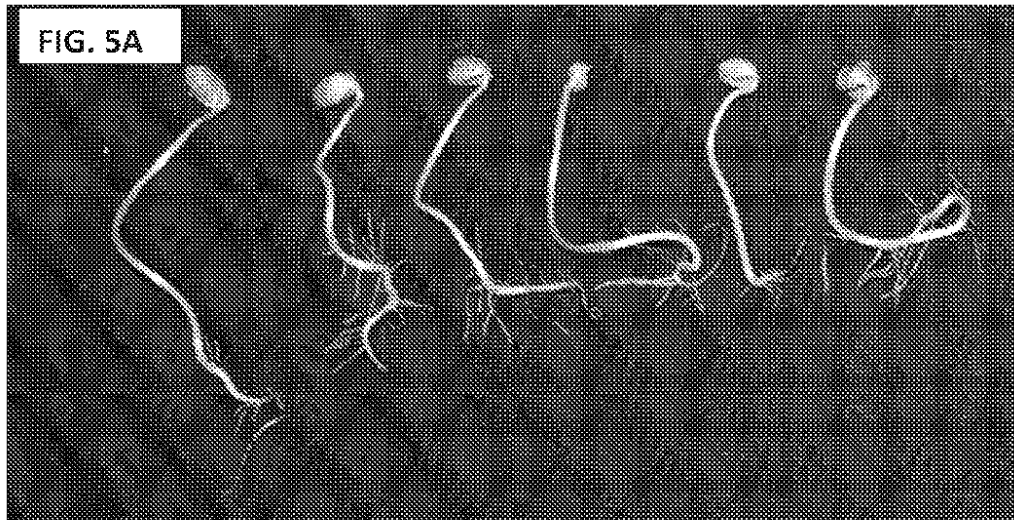
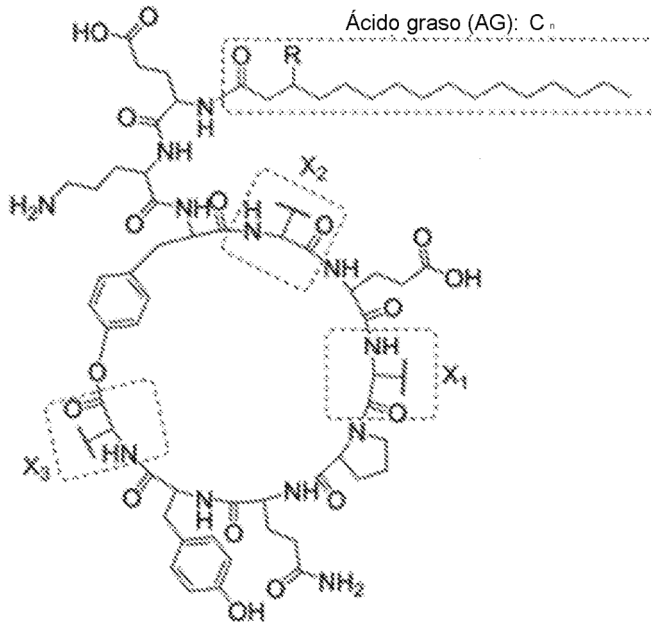


FIG. 4A





Ácido graso (AG): C_n

	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	R	Ácido Graso Observado para RTI301	Ácido Graso Observado para RTI477	C16 Teórico [M+H] ⁺
Fengicina A	Ala	Thr	Ile	Tyr	OH	C15, C16, C17	C14, C15, C16, C17	1463,8
Fengicina B	Val	Thr	Ile	Tyr	OH	C14, C15, C16, C17	C14, C15, C16, C17	1491,8
Fengicina C	Aba	Thr	Ile	Tyr	OH	C14, C15, C16, C17	C14, C15, C16, C17	1477,8
Fengicina D	Val	Thr	Val	Tyr	OH	C14, C15, C16, C17	C14, C15, C16, C17	1477,8
Fengicina S	Val	Ser	Ile	Tyr	OH	C14, C15, C16, C17	C14, C15, C16, C17	1477,8
Fengicina I	Ile	Thr	Ile	Tyr	OH	C16, C17	C16	1505,8
Fengicina MA	Ala	Thr	Met	Tyr	OH	C15, C16, C17	C15, C16, C17	1481,8
Fengicina MB	Val	Thr	Met	Tyr	OH	C14, C15, C16	C14, C15, C16, C17	1509,8
Fengicina MC	Aba	Thr	Met	Tyr	OH	C14, C15, C16, C17	C14, C15, C16, C17	1495,8
Fengicina H	Val	Thr	Hcy	Tyr	OH	C14, C15, C16, C17	C14, C15, C16, C17	1495,8
Deshidrofengicina A	Ala	Thr	Ile	Tyr	H	C15, C16, C17	C14, C15, C16, C17	1447,8
Deshidrofengicina B	Val	Thr	Ile	Tyr	H	C14, C15, C16, C17	C14, C15, C16, C17	1475,8
Deshidrofengicina C	Aba	Thr	Ile	Tyr	H	C14, C15, C16, C17	C14, C15, C16, C17	1461,8
Deshidrofengicina D	Val	Thr	Val	Tyr	H	C14, C15, C16, C17	C14, C15, C16, C17	1461,8
Deshidrofengicina S	Val	Ser	Ile	Tyr	H	C14, C15, C16, C17	C14, C15, C16, C17	1461,8
Deshidrofengicina I	Ile	Thr	Ile	Tyr	H	C15, C16, C17	C15, C16, C17	1489,9
Deshidrofengicina MA	Ala	Thr	Met	Tyr	H	C14	No observado	1465,8
Deshidrofengicina MB	Val	Thr	Met	Tyr	H	C15	No observado	1493,8
Deshidrofengicina MC	Aba	Thr	Met	Tyr	H	C15	No observado	1479,8
Deshidrofengicina H	Val	Thr	Hcy	Tyr	H	C14, C15, C16	No observado	1479,8

FIG. 6