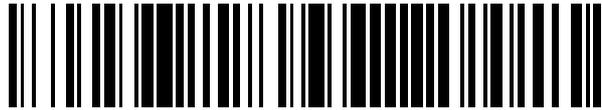


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 773 957**

51 Int. Cl.:

C12N 1/20	(2006.01)
A01N 63/02	(2006.01)
A01P 5/00	(2006.01)
A01P 19/00	(2006.01)
A01N 37/10	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.08.2013 PCT/US2013/054774**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.02.2014 WO14028520**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.08.2013 E 13829973 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.12.2019 EP 2885399**

54 Título: **Composiciones bioactivas y metabolitos de *Bacillus megaterium***

30 Prioridad:

14.08.2012 US 201261683154 P
15.03.2013 US 201313832407

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
15.07.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

ASOLKAR, RATNAKAR;
CORDOVA-KREYLOS, ANA, LUCIA;
RODRIGUEZ, MARGARITA;
TODD, CARLY;
WILK, DEBORA y
MARRONE, PAMELA

74 Agente/Representante:

INGENIAS CREACIONES, SIGNOS E
INVENCIONES, SLP

ES 2 773 957 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 bioactivas y metabolitos de *Bacillus megaterium*

5 Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

Esta solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos N.º 61/683.154, presentada el martes 14 de agosto de 2012 y la Solicitud de Patente de Estados Unidos N.º 13.832.407, presentada el viernes 15 de marzo de 2013.

10

Campo técnico

La presente divulgación está en el campo de las composiciones bioactivas que tienen actividad plaguicida y métodos para su uso en el control de plagas de plantas. En particular, dichas composiciones comprenden una cepa de *Bacillus* y/o sus metabolitos, más particularmente, cepas de *Bacillus megaterium* y sus metabolitos.

15

Antecedentes

Los productos naturales son sustancias producidas por microbios, plantas y otros organismos. Los productos microbianos naturales ofrecen una fuente abundante de diversidad química y existe un largo historial de uso de productos naturales con fines farmacéuticos. A pesar del énfasis en los productos naturales para agentes terapéuticos en seres humanos, donde más del 50 % proceden de productos naturales, solo el 11 % de los plaguicidas proceden de fuentes naturales. No obstante, los plaguicidas de productos naturales tienen el potencial de desempeñar un papel importante para controlar plagas en granjas tanto convencionales como orgánicas. Los metabolitos secundarios producidos por microbios (bacterias, actinomicetos y hongos) proporcionan nuevos compuestos químicos que pueden usarse solos o en combinación con compuestos conocidos para controlar de manera eficaz plagas de insectos y para reducir el riesgo de desarrollo de resistencia. Existen varios ejemplos bien conocidos de productos microbianos naturales que son exitosos como insecticidas agrícolas (Thompson et al., 2000; Arena et al., 1995; Krieg et al. 1983).

20

25

30

El desarrollo de un plaguicida microbiano comienza con el aislamiento de un microbio en un cultivo puro. Luego se procede a la detección de eficacia y espectro utilizando ensayos a escala *in vitro*, *in vivo* o piloto en un invernadero y en el campo. Al mismo tiempo, se aíslan e identifican los compuestos activos producidos por el microbio. Para la comercialización de un plaguicida microbiano, el microbio ha de producirse de manera económica mediante fermentación a escala industrial y se formula con un vehículo biocompatible y aditivos aprobados para aumentar la eficacia y maximizar la facilidad de aplicación.

35

Usos de *Bacillus Megaterium* y productos producidos a partir de él

Bacillus megaterium es una bacteria grampositiva que crece en medios simples y en más de 62 de 95 fuentes de carbono, como los intermedios del ciclo del ácido tricarbóxico (por ejemplo, formiato y acetato), y forma esporas principalmente en condiciones aerobias (véase, por ejemplo, Vary, 2007). Se ha encontrado en una variedad de hábitats, tales como suelo, agua de mar, sedimento, arrozales, miel, pescado y alimentos secos.

40

Se ha descubierto que *Bacillus megaterium* tiene varios usos diferentes. Específicamente, produce una variedad de enzimas industriales tales como la penicilina acilasa, varias amilasas y glucosa deshidrogenasa (revisado en, Vary, 2007). Además, se encontró que una fermentación de *B. megaterium* ATCC 19213 cultivada hasta la fase estacionaria produce N-desoxi-esquisoquineno, un sideróforo, que se identificó como 4-[(3(acetilhidroxiamino) propil) amino]-2-[2-ácido (3-(acetilamino) propil) amino]-2-oxoetil]-2-hidroxi-4-oxo-butanoico (Hu X y Boyer G. L., 1995). Esquisoquineno, un dihidroxamato que contiene citrato, un sideróforo que se ha producido por *B. megaterium* y *Anabaena* sp (Plowman J. E. et al 1984). La participación de la fracción citrato α -hidroxycarboxilato en la quelación de hierro se investigó mediante la comparación del comportamiento de unión al hierro de esquisoquineno con el de acetil-esquisoquineno, un derivado en el que el grupo citrato hidroxilo se modificó mediante acetilación.

45

50

Otro conjunto de usos para productos procedentes de *Bacillus megaterium* ha sido el uso medicinal. BMG 59-R2, un antibiótico peptídico, se ha informado a partir de *B. megaterium* (FERM-p 6177). El compuesto también inhibe la fosfatasa alcalina y el crecimiento tumoral (Japón. Patente, 83 164 561. (1983)). El cultivo de fermentación de *B. megaterium* en presencia de ansatrienina produce T23V y T23VI (Damberg, M. et al 1982). Estos compuestos pertenecen a la clase de antibióticos macrólidos, que también exhiben actividad antitumoral. Se aisló un nucleósido llamado oxetanocina a partir de *B. megaterium* NK84-0218 y se determinó que la estructura era 9-[(2R,3R,4S)-3,4-bis(hidroximetil)-2-oxetanyl]adenina mediante análisis de cristalografía de rayos X (Shimada N. et al., 1986). La oxetanocina mostró actividad contra el virus del herpes simple II (ADN del virus) a 5,8 pg/pocillo (inhibición al 50 % del efecto citopático), mientras que la citotoxicidad contra las células Vero fue de 132,6 μ g/pocillo (inhibición al 50 % del crecimiento celular). Posteriormente, los derivados de oxetanocina como las oxetanocinas H, X, G y 2-aminoxetanocina A (Shimada N. et al., 1987) se aíslan de la misma cepa que mostró actividades antivíricas contra el virus del herpes simple tipo II (HSV-II, por sus siglas en inglés) y actividades antivíricas contra el virus de la inmunodeficiencia humana. *B. megaterium* IFO 12108 (Nakahama, K. et al., 1981) se utilizó para la transformación

60

65

microbiana de la ansamitocina, un antibiótico antitumoral producido por *Nocardia* sp. C-15003 (N-1). La ansamitocina P-3 se convirtió en 15-hidroxiansamitocina P-3 (PHO-3) y 15-epi-15-hidroxi-ansamitocina P-3 (epi-PHO-3), utilizando *B. megaterium* (Izawa M. et al., 1981). El producto de conversión microbiana de P3, tiene mayores actividades antitumorales contra P 388 y L 1210 que el sustrato P-3.

5 Se han utilizado diversos aislados de *Bacillus megaterium* como insecticidas, bactericidas, fungicidas y nematocidas (véase, por ejemplo, Aksoy, H.M. 2008; Patentes de Estados Unidos 6.599.503, 7.906.131 y 7.935.360). Algunos de estos aislados de *B. megaterium* se han utilizado en combinación con otras bacterias para tratar lodos y desechos, tales como residuos de *Artemisia annua*, polvo de chimenea, polvo de salvado, heces de ganado y aves de corral, turba y paja de cultivo (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N.º 7.279.104).

El documento WO 2011/124554 A2 describe el uso de ácido 4-fenilbutírico y/o sales del mismo para mejorar la tolerancia al estrés de las plantas.

15 El documento US 6.245.717 B1 divulga la supresión de auxina en plantas superiores.

El documento WO 2014/009402 A1 divulga el uso de ácido 4-fenilbutírico para mejorar la tolerancia de las plantas a organismos biológicos dañinos. Este documento pertenece a la técnica anterior de acuerdo con el artículo 54(3) EPC.

20 Changsong Zou et al. describen la cepa XTBG34 de *Bacillus megaterium* que promueve el crecimiento de las plantas mediante la producción de 2-pentilfurano (Changsong Zou et al. The Journal of Microbiology, vol. 48, n.º 4, 1 de agosto de 2010, págs. 460-466).

La base de datos WPI divulga *Bacillus megaterium* (Week 201049; AN 2010-J13789 XP002750959).

25 La base de datos CA Chemical Abstracts Service, (XP002750960) y Amborabe, Benigne-Ernest et al (Plant Physiology and Biochemistry, 40(12), 1051-1060) divulgan los efectos antifúngicos del ácido salicílico y otros derivados del ácido benzoico hacia *Eutypa lata* y la relación estructura-actividad.

30 La base de datos WPI divulga una cepa de *Bacillus megaterium* (Week 200966, AN 2009-L87431 XP002750961)).

El documento WO 2004/002227 A1 describe medios para controlar biológicamente la enfermedad criptogámica de las plantas.

35 Malanicheva et al. divulga la actividad antimicrobiana de cepas de *Bacillus megaterium* (Microbiology, Nauka/Interperiodica, MO, vol. 81, n.º 2, 18 de abril de 2012, págs. 178-185).

El documento US 2002/0119124 A1 divulga el biocontrol de enfermedades de plantas causadas por especies de fusarium con nuevos aislados de *Bacillus Megaterium* y *Pantoea Agglomerans*.

40 El documento US 2010/0261694 A1 describe chaperonas químicas y métodos de uso de las mismas para inhibir la proliferación del hongo fitopatógeno fusarium Ssp.

45 El documento US 5.403.583 A divulga *Bacillus Megaterium* ATCC 55000 y un método de uso de los mismos para controlar R. Solani.

El documento WO 94/21795 A1 describe nuevas proteínas y cepas plaguicidas.

Sumario

50 La invención se refiere a una composición que comprende

- a) un sobrenadante, filtrado, extracto o caldo celular completo recogido del cultivo de *Bacillus megaterium* H491 (n.º de registro NRRL B-50769), en donde dicho sobrenadante, filtrado, extracto o caldo celular completo tiene actividad de promoción de crecimiento de plantas o plaguicida; y
- b) al menos uno de un vehículo, diluyente, tensioactivo o adyuvante.

También se divulga un *B. megaterium* que tiene las siguientes características:

- 60 (A) actividad plaguicida;
- (B) produce un compuesto plaguicida que tiene las siguientes propiedades: (1) tiene un peso molecular de aproximadamente 140-185 determinado mediante cromatografía líquida/espectroscopía de masas (LC/MS, por sus siglas en inglés); (2) tiene valores RMN de ¹H de δ 7,28 (2H), 7,19 (2H), 7,17, 2,67, 2,31, 1,92 y tiene valores RMN de ¹³C de 177,5, 142,9, 129,5, 129,5, 129,4, 129,4, 126,9, 36,1, 34,4, 28,1 (3) tiene un tiempo de retención de cromatografía líquida de alta presión (HPLC, por sus siglas en inglés) de aproximadamente 8-18 minutos, en una columna de HPLC de fase inversa C-18 (Phenomenex, Luna 5 µ C18 (2) 100 A, 100 x 4,60 mm) usando un sistema

de disolventes en gradiente de agua:acetonitrilo (CH₃CN) (0-20 minutos; 90-0 % de CH₃CN acuoso, 20-24 min; 100 % de CH₃CN, 24-27 min; 0-90 % de CH₃CN acuoso, 27-30 min; 90 % de CH₃CN acuoso) a un caudal de 0,5 ml/min y detección UV a 210 nm;

(C) no es patogénico para los animales vertebrados; y

5 (D) es susceptible a tetraciclina, eritromicina, estreptomina, penicilina, ampicilina, oxitetraciclina, cloranfenicol, ciprofloxacino, gentamicina, piperacilina, Imipenem y Sulfametoxazol-Trimetoprima.

También se proporciona un sobrenadante, fracción celular, filtrado, extracto, compuesto o metabolito procedente de un cultivo de *B. megaterium*.

10 Además, el *Bacillus megaterium* sp. puede tener una secuencia génica del ARNr 16S que comprende al menos una de:

15 (A) una secuencia directa que tiene al menos un 99 % de identidad y más particularmente al menos un 99,5 % de identidad con la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 1, una secuencia inversa que tiene al menos un 99 % de identidad con la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 2 y al menos un 99 % de identidad con la secuencia consenso establecida en la SEQ ID NO: 3;

20 (B) una secuencia directa que tiene al menos un 99 % de identidad y más particularmente al menos un 99,5 % de identidad con la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 4, una secuencia inversa que tiene al menos un 99 % de identidad con la secuencia establecida en SEQ ID NO: 5 y al menos un 99 % de identidad con la secuencia consenso establecida en la SEQ ID NO: 6;

25 (C) una secuencia directa que tiene al menos un 99 % de identidad y más particularmente al menos un 99,5 % de identidad con la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 7, una secuencia inversa que tiene al menos un 99 % de identidad con la secuencia establecida en SEQ ID NO: 8 y al menos un 99 % de identidad con la secuencia consenso establecida en la SEQ ID NO: 9.

Además, el *Bacillus megaterium* sp. puede tener una secuencia génica *recA* que comprende al menos una de:

30 (A) una secuencia directa que tiene al menos un 99 % de identidad y más particularmente al menos un 99,5 % de identidad con la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 14, una secuencia inversa que tiene al menos un 99 % de identidad y, más particularmente, al menos un 99,5 % de identidad con la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 15 y al menos un 99 % de identidad y, más particularmente, al menos un 99,5 % de identidad con la secuencia consenso establecida en la SEQ ID NO: 16;

35 (B) una secuencia directa que tiene al menos un 99 % de identidad y más particularmente al menos un 99,5 % de identidad con la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 17, una secuencia inversa que tiene al menos un 99 % de identidad y, más particularmente, al menos un 99,5 % de identidad con la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 18 y al menos un 99 % de identidad y, más particularmente, al menos un 99,5 % de identidad con la secuencia consenso establecida en la SEQ ID NO: 19;

40 (C) una secuencia directa que tiene al menos un 99 % de identidad y más particularmente al menos un 99,5 % de identidad con la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 20, una secuencia inversa que tiene al menos un 99 % de identidad con la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 21 y al menos un 99 % de identidad y, más particularmente, al menos un 99,5 % de identidad con la secuencia consenso establecida en la SEQ ID NO: 22.

45 En particular, el *Bacillus* es una cepa de *B. megaterium* que tiene las características de identificación de la cepa H491 de *B. megaterium* (n.º de registro NRRL B-50769), cepa M018 de *Bacillus megaterium* (n.º de registro NRRL B-50770) y cepa J142 de *Bacillus megaterium* (n.º de registro NRRL B-50771) o una cepa procedente de una de dichas cepas (por ejemplo, una cepa mutante). Por lo tanto, en un aspecto relacionado, se proporciona dicho *B. megaterium*. También se proporciona un cultivo sustancialmente puro, o caldo celular completo que comprende dicho microorganismo o fracción celular, sobrenadante, filtrado, extracto, compuesto o metabolito procedente del mismo.

50 El compuesto usado en los métodos y composiciones y combinaciones puede ser un compuesto que

(A) tiene actividad plaguicida;

55 (B) tiene un peso molecular de aproximadamente 140-185 determinado por cromatografía líquida/espectroscopía de masas (LC/MS) y

(C) tiene un tiempo de retención de cromatografía líquida de alta presión (HPLC) de aproximadamente 8-18 minutos en una columna HPLC C-18 de fase inversa usando un sistema de disolventes en gradiente de agua:acetonitrilo (CH₃CN) (0-20 min; 90 - 0 % de CH₃CN acuoso, 20-24 min; 100 % de CH₃CN, 24-27 min; 0-90 % de CH₃CN acuoso, 27-30 min; 90 % de CH₃CN acuoso) a un caudal de 0,5 ml/min y detección UV a 210 nm y

60 (D) se puede obtener opcionalmente de un *B. megaterium*. El compuesto en una realización puede ser un policétido.

65 En una realización particular, el compuesto puede proceder de *B. megaterium* y tiene una estructura de policétido aromático monosustituido que comprende al menos una fracción ácida, al menos un anillo aromático de 6 miembros y al menos tres grupos metileno; un peso molecular de 140 a aproximadamente 185 en la estructura central; al menos 8 carbonos y al menos 2 oxígenos.

Como también se divulga en el presente documento, el compuesto

(A) se obtiene de un *B. megaterium*;

(B) es tóxico para una plaga;

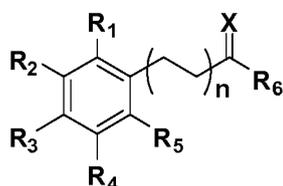
(C) tiene un peso molecular de aproximadamente 140-185 y, más particularmente, 164 según se determina por cromatografía líquida/espectrometría de masas (LC/MS);

(D) tiene valores RMN de ^1H de δ 7,28 (2H), 7,19 (2H), 7,17, 2,67, 2,31, 1,92 y tiene valores RMN de ^{13}C de 177,5, 142,9, 129,5, 129,5, 129,4, 129,4, 126,9, 36,1, 34,4, 28,1

(E) tiene un tiempo de retención de cromatografía líquida de alta presión (HPLC) de aproximadamente 8-18 minutos, más específicamente, de aproximadamente 12 minutos e incluso, más específicamente, de aproximadamente 12,16 minutos en una columna de HPLC de fase inversa C-18 (Phenomenex, Luna 5 μ C18 (2) 100 A, 100 x 4,60 mm) usando un sistema de disolventes en gradiente de agua:acetonitrilo (CH_3CN) (0-20 minutos; 90-0 % de CH_3CN acuoso, 20-24 min; 100 % de CH_3CN , 24-27 min; 0-90 % de CH_3CN acuoso, 27-30 min; 90 % de CH_3CN acuoso) a un caudal de 0,5 ml/min y detección UV a 210 nm.

Tal como se desvela en el presente documento, se proporcionan compuestos que incluyen, pero sin limitación:

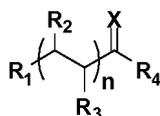
(A) un compuesto que tiene la estructura ##STR001##



##STR001##

o una sal plaguicidamente aceptable o estereoisómeros del mismo, en donde n es 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9; X es O, NH, NR o S; R es cadena de alquilo inferior que contiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 restos alquilo, resto arilalquilo o arilo, alquilo inferior sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterocíclico, heterocíclico sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, tioalquilo, tioalquilo sustituido, hidroxilo, halógeno, amino, amido o carboxilo; R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆ son cada uno independientemente H, hidroxilo, alquilo, alquilo sustituido, alqueno, alqueno sustituido, alquino, alquino sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterocíclico, heterocíclico sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, tioalquilo, tioalquilo sustituido, hidroxilo, halógeno, amino, amido, carboxilo, -C(O)H, acilo, oxiacilo, carbamato, sulfonilo, sulfonamida o sulfurilo;

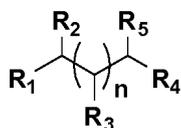
(B) un compuesto que tiene la estructura ##STR001a##



##STR001a##

o una sal plaguicidamente aceptable o estereoisómeros del mismo, en donde X es O, NH, NR o S; R es cadena de alquilo inferior que contiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 restos alquilo, resto arilalquilo o arilo, alquilo inferior sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterocíclico, heterocíclico sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, tioalquilo, tioalquilo sustituido, hidroxilo, halógeno, amino, amido o carboxilo; n es 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9; R₁, R₂, R₃, R₄ son cada uno independientemente H, hidroxilo, alquilo, alquilo sustituido, alqueno, alqueno sustituido, alquino, alquino sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterocíclico, heterocíclico sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, tioalquilo, tioalquilo sustituido, hidroxilo, halógeno, amino, amido, carboxilo, -C(O)H, acilo, oxiacilo, carbamato, sulfonilo, sulfonamida o sulfurilo;

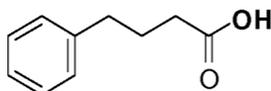
(C) un compuesto que tiene la estructura ##STR001M#



##STR001b##

o una sal plaguicidamente aceptable o estereoisómeros del mismo, en donde n es 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9; R₁, R₂, R₃, R₄, R₅ son cada uno independientemente H, hidroxilo, alquilo, alquilo sustituido, alquenoilo, alquenoilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterocíclico, heterocíclico sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, tioalquilo, tioalquilo sustituido, hidroxilo, halógeno, amino, amido, carboxilo, -C(O)H, acilo, oxiacilo, carbamato, sulfonilo, sulfonamida o sulfurilo;

En un aspecto, la cepa H491 de *B. megaterium* produce el policétido aromático, ácido 4-fenilbutanoico (1).



Ácido 4-fenilbutanoico (1)

Estos compuestos pueden obtenerse mediante

- (A) el cultivo de un *B. megaterium* en un medio de cultivo, para obtener un caldo celular completo de *B. megaterium*, en condiciones suficientes para producir dicho compuesto(s), y
 (B) el aislamiento de dicho compuesto(s) producido en (A) a partir del caldo celular completo de (A).

En particular, el compuesto de la etapa (B) puede aislarse (i) aplicando el caldo celular completo a al menos una de una columna de intercambio iónico, una columna de exclusión por tamaño o una columna de HPLC de fase inversa para obtener fracciones de columna; (ii) analizando las fracciones de la columna para determinar la actividad plaguicida y (iii) concentrando las fracciones de la columna de (ii) para obtener el compuesto aislado. Como alternativa, dicho compuesto(s) se pueden producir mediante síntesis química y el producto(s) se puede usar como un compuesto puro o como un producto bruto.

En realizaciones adicionales, se proporcionan composiciones y métodos para modular el crecimiento de las plantas y, en particular, promover el crecimiento de las plantas y/o modular la germinación de semillas y, particularmente, promover la germinación de semillas. Por ejemplo, el medio de cultivo obtenido después del crecimiento de las cepas de *B. megaterium* divulgadas en el presente documento, también denominado caldo celular completo (WCB, por sus siglas en inglés), se puede aplicar a plantas, semillas y/o su sustrato de crecimiento (por ejemplo, suelo) para promover el crecimiento de las semillas y plantas o la germinación de las semillas de la planta. Como alternativa, las plantas, semillas y/o sustrato de crecimiento de las mismas (por ejemplo, suelo) se pueden inocular con una cualquiera o con una combinación de las cepas de *B. megaterium* divulgadas en el presente documento con el fin de promover el crecimiento de la planta. Como se divulga también en el presente documento, un cultivo o caldo celular sustancialmente puro que comprende *B. megaterium* o un sobrenadante, fracción celular, filtrado, extracto, compuesto y/o metabolito procedente del mismo se puede usar en métodos para la promoción del crecimiento de las plantas o la germinación de semillas.

La divulgación también divulga que cualquiera de los compuestos divulgados en el presente documento se puede usar en métodos para promover el crecimiento de plantas; por ejemplo, un compuesto que:

- (a) tiene un peso molecular de aproximadamente 140-185 y más particularmente, 164 según se determina por cromatografía líquida/espectrometría de masas (LC/MS);
 (b) tiene valores RMN de ¹H de δ 7,28 (2H), 7,19 (2H), 7,17, 2,67, 2,31, 1,92 y tiene valores RMN de ¹³C de 177,5, 142,9, 129,5, 129,5, 129,4, 129,4, 126,9, 36,1, 34,4, 28,1; y
 (c) tiene un tiempo de retención de cromatografía líquida de alta presión (HPLC) de aproximadamente 8-18 minutos, más específicamente, de aproximadamente 12 minutos e incluso, más específicamente, de aproximadamente 12,16 minutos en una columna de HPLC de fase inversa C-18 (Phenomenex, Luna 5 μ C18 (2) 100 A, 100 x 4,60 mm) usando un sistema de disolventes en gradiente de agua:acetonitrilo (CH₃CN) (0-20 minutos; 90-0 % de CH₃CN acuoso, 20-24 min; 100 % de CH₃CN, 24-27 min; 0-90 % de CH₃CN acuoso, 27-30 min; 90 % de CH₃CN acuoso) a un caudal de 0,5 ml/min y detección UV a 210 nm.

Los compuestos adicionales útiles en los métodos y composiciones desvelados para promover el crecimiento de las plantas incluyen los identificados anteriormente como STR001, STR001a, STR001b y ácido 4-fenilbutanoico (Compuesto 1).

Se divulga adicionalmente una combinación plaguicida que puede ser sinérgica con al menos una plaga que comprende como componentes activos: (a) un cultivo o caldo celular sustancialmente puro que comprende *B. megaterium* o un sobrenadante, fracción celular, filtrado, extracto, compuesto y/o metabolito procedente del mismo y (b) otra sustancia plaguicida, en donde (a) y (b) pueden estar presentes en cantidades sinérgicas. La plaga, como se desvela en el presente documento, puede ser una plaga de insectos, pero también puede incluir, pero sin limitarse a,

un nematodo, hongo vegetal, virus de planta y bacterias de planta y maleza. Además, la combinación puede ser una composición. La sustancia plaguicida puede (a) proceder de un microorganismo; (b) un producto natural y/o (c) un plaguicida químico y, en particular, un nematocida químico.

- 5 En particular, la combinación puede comprender un microorganismo completo, sobrenadante, filtrado y/o extracto de *B. megaterium* y una sustancia plaguicida procedente de un microorganismo que incluye, pero sin limitación, *Bacillus sp.* (por ejemplo, *Bacillus thuringiensis* o *Bacillus thuringiensis kurstaki*) y spinosad. Como alternativa, la combinación puede comprender un sobrenadante, filtrado y/o extracto de *B. megaterium* y una sustancia plaguicida procedente de un producto natural tal como piretro. Como alternativa, la combinación puede comprender un sobrenadante, filtrado y/o extracto de *B. megaterium* y una sustancia plaguicida que es un plaguicida químico, particularmente, un insecticida, donde el insecticida incluye pero sin limitación piretrinas, espirotetramato y organoclorados.

15 En un aspecto relacionado, en el presente documento se proporciona un método para modular, en particular, modular sinérgicamente la infestación de al menos una plaga o especies de plaga en o alrededor de una planta, que comprende aplicar a una planta y/o semillas de la misma y/o sustrato para cultivar dicha planta las combinaciones establecidas anteriormente con una cantidad de la combinación eficaz para modular la infestación de dicha plaga o especies de plaga. También se proporcionan en el presente documento compuestos aislados obtenibles o procedentes de *B. megaterium* o alternativamente, organismos capaces de producir estos compuestos que se pueden usar para controlar diversas plagas, y/o también, particularmente, plagas de nematodos.

20 Se proporciona además el uso de

(a) un compuesto que:

25 (1) tiene un peso molecular de aproximadamente 140-185 determinado mediante cromatografía líquida/espectroscopía de masas (LC/MS);

30 (2) tiene valores RMN de ^1H de δ 7,28 (2H), 7,19 (2H), 7,17, 2,67, 2,31, 1,92 y tiene valores RMN de ^{13}C de 177,5, 142,9, 129,5, 129,5, 129,4, 129,4, 126,9, 36,1, 34,4, 28,1;

35 (3) tiene un tiempo de retención de cromatografía líquida de alta presión (HPLC) de aproximadamente 8-18 minutos, en una columna de HPLC de fase inversa C-18 (Phenomenex, Luna 5 μ C18 (2) 100 A, 100 x 4,60 mm) usando un sistema de disolventes en gradiente de agua:acetonitrilo (CH_3CN) (0-20 minutos; 90-0 % de CH_3CN acuoso, 20-24 min; 100 % de CH_3CN , 24-27 min; 0-90 % de CH_3CN acuoso, 27-30 min; 90% de CH_3CN acuoso) a un caudal de 0,5 ml/min y detección UV de 210 nm;

(4) tiene propiedades plaguicidas; y

40 (b) opcionalmente otra sustancia, en donde dicha sustancia es un plaguicida, eficaz para modular la infestación de plagas; para formular una composición plaguicida y/o modular la infestación de una o más plagas.

Breve descripción de las figuras

45 La Figura 1 es una representación esquemática del esquema de purificación para obtener los compuestos de la invención a partir de caldo de cultivo.

La Figura 2 representa los datos (-) ESI-LCMS para el ácido 4-fenilbutanoico (1).

La Figura 3 representa la RMN de ^1H para el ácido 4-fenilbutanoico (1) en $\text{CD}_3\text{OD-d}_4$ a 600 MHz.

La Figura 4 representa la RMN de ^{13}C para ácido 4-fenilbutanoico (1) en $\text{CD}_3\text{OD-d}_4$ a 150 MHz.

50 La Figura 5 representa la actividad nematocida promedio de cada lote para cada fermentación numerada del 1-19 en orden cronológico.

La Figura 6 muestra la eficacia del sobrenadante H491 en el control de *M. hapla* a diferentes velocidades de dilución.

55 La Figura 7 muestra los resultados de dos bioensayos de extracto en placa de 96 pocillos diferentes de las fracciones de H491 1-6 y extracto bruto. Se incluyen tres controles en cada ensayo; 1 positivo (Avid al 1 %) y 2 negativos (DMSO y agua). El ensayo 1 (T1) se llevó a cabo utilizando nematodos de *M. hapla* y las fracciones se disolvieron en DMSO al 100 %; y el ensayo 2 (T2) se llevó a cabo utilizando nematodos de *M. incognita* y las fracciones se disolvieron en DMSO. El % de inmotilidad se representa gráficamente en su forma corregida, donde la inmotilidad informada del blanco DMSO se resta de cada una de las muestras analizadas.

60 La Figura 8 muestra los resultados de tres bioensayos de extracto en placa de 96 pocillos diferentes de máximos de H491 H1-H38 purificados. Se incluyen tres controles en cada ensayo; un control positivo (Avid al 1 %) y 2 controles negativos (DMSO y agua). La carga de la columna (inicial) y el flujo continuo (lavado) también se analizaron. El ensayo 1 (T1) se llevó a cabo con nematodos de *M. hapla*, los ensayos 2 y 3 (T2 y T3) se llevaron a cabo con nematodos de *M. incognita*. Los resultados para cada muestra (fracción o control) se presentan como un conjunto de tres barras: la barra de la izquierda muestra los resultados del ensayo 1 (*M. hapla*), la barra central muestra los resultados del ensayo 2 (*M. incognita*) y la barra de la derecha muestra los resultados del ensayo 3 (*M. incognita*).

La Figura 9 muestra los efectos del sobrenadante H491 sobre *M. incognita* en pepino en un ensayo de agar agua. La Figura 10 muestra la respuesta nematocida a la dosis para WCB H491 en plantas de pepino probadas en un mini tubo en ensayo de planta. WCB H491 (identificado como MBI303 en la Figura) se usó a plena potencia (1X) y a diluciones de 0,7X y 0,5X. El peso de la parte superior fresco (FTW (por sus siglas en inglés), barra del extremo izquierdo en cada conjunto de tres), el peso de la raíz fresca (FRW (por sus siglas en inglés), barra central en cada grupo de tres) y el índice de agallas (barra del extremo derecho en cada conjunto de tres) se midieron para los tres concentraciones de WCB H491 y para plantas tratadas con agua (control negativo) y con Avid (control positivo). La Figura 11 muestra los resultados de los ensayos de motilidad (expresados como porcentaje de nematodos inmóviles) realizados con WCB obtenido de cuatro lotes de fermentación diferentes de H491 de *B. megaterium*. También se muestran los resultados para nematodos tratados con agua (control negativo) y Avid (control positivo). La Figura 12 muestra el efecto del ácido 4-fenilbutanoico (Compuesto 1), a diferentes concentraciones (indicadas en la abscisa) sobre la motilidad del nematodo juvenil (J2). También se muestran los resultados para controles negativos (DMSO y agua) y un control positivo (Avid). La Figura 13 muestra los efectos de tres cepas diferentes de *B. megaterium* (H491, M018 y J142) sobre la motilidad de J2 de *M. incognita*. Avid se usó como control positivo y el agua como control negativo.

Descripción detallada

Aunque las composiciones y los métodos hasta ahora son susceptibles de diversas modificaciones y formas alternativas, se describirán en el presente documento en detalle realizaciones ejemplares. Debería entenderse, sin embargo, que no hay intención de limitar la invención a las formas particulares divulgadas, pero al contrario, la intención es cubrir todas las modificaciones cubiertas por las reivindicaciones.

Cuando se proporciona un intervalo de valores, se entiende que cada valor intermedio, al décimo de la unidad del límite inferior, a menos que el contexto indique claramente lo contrario, entre el límite superior e inferior de ese intervalo y cualquier otro valor declarado o intermedio en el intervalo indicado, se incluye en el mismo. También se incluyen intervalos más pequeños. Los límites superior e inferior de estos intervalos más pequeños también se incluyen allí, sujetos a cualquier límite específicamente excluido en el intervalo indicado.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que el comprendido habitualmente por un experto en la materia a la que pertenece la presente invención. Aunque también pueden usarse en la puesta en práctica o el ensayo de la presente invención cualesquier métodos y materiales similares o equivalentes a los que se describen en el presente documento, ahora se describen los métodos y materiales preferidos.

Cabe destacar que tal como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "uno/a" y "el/la" incluyen las referencias en plural salvo que el contexto indique claramente otra cosa.

Como se define en el presente documento, "procedente de" significa aislado u obtenido directamente de una fuente particular o, como alternativa, que tiene características identificativas de una sustancia u organismo aislado u obtenido de una fuente particular. En caso de que la "fuente" sea un organismo, "procedente de" significa que puede aislarse u obtenerse del propio organismo o a partir del medio utilizado para cultivar o hacer crecer dicho organismo.

Como se define en el presente documento, "cultivo de caldo completo" se refiere a un cultivo líquido que contiene células y medios. Si las bacterias crecen en una placa, las células pueden cosecharse en agua u otro cultivo completo líquido.

El término "sobrenadante" se refiere al líquido restante cuando las células que se dejan crecer en caldo o se cosechan en otro líquido de una placa de agar se eliminan mediante centrifugación, filtración, sedimentación, u otros medios bien conocidos en la técnica.

Como se define en el presente documento, "filtrado" se refiere al líquido de un cultivo de caldo completo que ha pasado a través de una membrana.

Como se define en el presente documento, "extracto" se refiere a la sustancia líquida eliminada de las células por un disolvente (agua, detergente, tampón) y separada de las células mediante centrifugación, filtración u otro método.

Como se define en el presente documento, "metabolito" se refiere a un compuesto, sustancia o subproducto de una fermentación de un microorganismo o sobrenadante, filtrado o extracto obtenido de un microorganismo que tiene actividad plaguicida y, particularmente, insecticida.

Como se define en el presente documento, un "compuesto aislado" está esencialmente libre de otros compuestos o sustancias, por ejemplo, al menos aproximadamente 20 % puro, preferentemente al menos aproximadamente 40 % puro, más preferentemente aproximadamente 60 % puro, incluso más preferentemente aproximadamente 80 % puro, más preferentemente aproximadamente 90 % puro, e incluso lo más preferentemente aproximadamente 95 % puro, según se determina por métodos analíticos, incluidos, pero sin limitación, métodos cromatográficos y métodos

electroforéticos.

5 Un "vehículo" como se define en el presente documento es un material inerte, orgánico o inorgánico, con el que se mezcla o formula el principio activo para facilitar su aplicación a una planta u otro objeto que se vaya a tratar o su almacenamiento, transporte y/o manipulación.

El término "modular", como se define en el presente documento, se usa para indicar alterar la cantidad de infestación de plagas o la tasa de propagación de la infestación de plagas.

10 El término "infestación de plagas", como se define en el presente documento, es la presencia de una plaga en una cantidad que causa un efecto nocivo que incluye una enfermedad o infección en una población hospedadora o la aparición de una maleza no deseada en un sistema de cultivo.

15 Un "pesticida", como se define en el presente documento, es una sustancia procedente de un producto biológico o sustancia química que aumenta la mortalidad o inhibe la tasa de crecimiento de las plagas de plantas e incluye, pero sin limitación, nematicidas, insecticidas, fungicidas para plantas, bactericidas para plantas y viricidas para plantas.

20 Como se usa en el presente documento, el término "alquilo" se refiere a un grupo hidrocarburo monovalente de cadena lineal o ramificada que tiene de uno a aproximadamente 12 átomos de carbono, incluyendo metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, *terc*-butilo, n-hexilo, y similares.

25 Como se usa en el presente documento, "alquilo sustituido" se refiere a grupos alquilo que llevan además uno o más sustituyentes seleccionados de hidroxilo, alcoxi, mercapto, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, heterocíclico, heterocíclico sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, ariloxi, ariloxi sustituido, halógeno, ciano, nitro, amino, amido, -C(O)H, acilo, oxiacilo, carboxilo, sulfonilo, sulfonamida, sulfurilo, y similares.

30 Como se usa en el presente documento, "alquenilo" se refiere a grupos hidrocarbilo de cadena lineal o ramificada que tienen uno o más dobles enlaces carbono-carbono y que tienen en el intervalo de aproximadamente 2 a 12 átomos de carbono, y "alquenilo sustituido" se refiere a grupos alquenilo que llevan además uno o más sustituyentes como se estableció anteriormente.

35 Como se usa en el presente documento, "alquinilo" se refiere a grupos hidrocarbilo de cadena lineal o ramificada que tienen al menos un triple enlace carbono-carbono, y que tienen en el intervalo de aproximadamente 2 a 12 átomos de carbono, y "alquinilo sustituido" se refiere a grupos alquinilo que llevan además uno o más sustituyentes como se estableció anteriormente.

40 Como se usa en el presente documento, "arilo" se refiere a grupos aromáticos que tienen en el intervalo de 6 a 14 átomos de carbono y "arilo sustituido" se refiere a grupos arilo que llevan además uno o más sustituyentes como se estableció anteriormente.

45 Como se usa en el presente documento, "heteroarilo" se refiere a anillos aromáticos que contienen uno o más heteroátomos (por ejemplo, N, O, S, o similar) como parte de la estructura del anillo, y que tienen en el intervalo de 3 hasta 14 átomos de carbono y "heteroarilo sustituido" se refiere a grupos heteroarilo que llevan además uno o más sustituyentes como se estableció anteriormente.

50 Como se usa en el presente documento, "alcoxi" se refiere al resto -O-alquil-, en donde alquilo es como se definió anteriormente, y "alcoxi sustituido" se refiere a grupos alcoxi que llevan además uno o más sustituyentes como se estableció anteriormente.

55 Como se usa en el presente documento, "tioalquilo" se refiere al resto -S-alquil-, en donde alquilo es como se definió anteriormente, y "tioalquilo sustituido" se refiere a grupos tioalquilo que llevan además uno o más sustituyentes como se estableció anteriormente.

60 Como se usa en el presente documento, "cicloalquilo" se refiere a grupos alquilo que contienen anillos que contienen en el intervalo de aproximadamente 3 a 8 átomos de carbono, y "cicloalquilo sustituido" se refiere a grupos cicloalquilo que llevan además uno o más sustituyentes como se estableció anteriormente.

65 Como se usa en el presente documento, "heterocíclico", se refiere a grupos cíclicos (es decir, que contienen anillos) que contienen uno o más heteroátomos (por ejemplo, N, O, S, o similar) como parte de la estructura del anillo, y que tiene en el intervalo de 3 hasta 14 átomos de carbono y "heterocíclico sustituido" se refiere a grupos heterocíclicos que llevan además uno o más sustituyentes como se estableció anteriormente.

"Porcentaje de identidad" significa el valor determinado al comparar dos secuencias alineadas de manera óptima a lo largo de una ventana de comparación, en donde la parte de la secuencia polinucleotídica en la ventana de comparación puede comprender adiciones o supresiones (es decir, huecos) en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o supresiones) para la alineación óptima de las dos secuencias. El porcentaje se calcula

mediante la determinación del número de posiciones en las cuales se encuentra la base de aminoácido idéntica en ambas secuencias para producir el número de posiciones emparejadas, dividiendo el número de posiciones coincidentes entre el número total de posiciones en la ventana de comparación y multiplicando el resultado por 100 para producir el porcentaje de identidad de secuencia.

5 La alineación óptima de secuencias para comparación puede usar cualquier medio para analizar la identidad de secuencia (homología) conocida en la técnica, por ejemplo, mediante el método de alineación progresivo denominado "PILEUP" (Morrison, 1997), como un ejemplo del uso de PILEUP); mediante el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, (1981); mediante el algoritmo de alineación de homología de Needleman y Wunsch (1970); mediante el método de búsqueda de similitud de Pearson (1988); mediante implementaciones informatizadas de estos algoritmos (por ejemplo, GAP, BEST FIT, FASTA y TFASTA en el Paquete de Software Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.); ClustalW (CLUSTAL en el programa PC/Gene de Intelligenetics, Mountain View, Calif., descrito por, por ejemplo, Higgins (1988); Corpet (1988); Huang (1992); y Pearson (1994); Pfamand Sonnhammer (1998); TreeAlign (Hein (1994)); programas informáticos de alineación de secuencias MEG-ALIGN y SAM; o, mediante inspección visual manual.

Otro ejemplo de un algoritmo que es adecuado para determinar la similitud de secuencia es el algoritmo BLAST, que se describe en Altschul et al., (1990). Los programas BLAST (Herramienta de búsqueda de alineación local básica) de Altschul, S. F., et al., (1993) buscan bajo parámetros predeterminados la identidad de las secuencias contenidas en la base de datos BLAST "GENEMBL". Se puede analizar la identidad de una secuencia para todas las secuencias de ADN disponibles públicamente contenidas en la base de datos GENEMBL utilizando el algoritmo BLASTN bajo los parámetros predeterminados. El programa informático para realizar análisis BLAST está disponible públicamente a través del Centro Nacional de Información Biotecnológica www.ncbi.nlm.nih.gov/; véase también Zhang (1997) para la variación "PowerBLAST". Este algoritmo implica primero identificar pares de secuencias de alta puntuación (HSP, por sus siglas en inglés) mediante la identificación de palabras cortas de longitud W en la secuencia de consulta que coinciden o satisfacen alguna puntuación de umbral de valor positivo T cuando se alinean con una palabra de la misma longitud en una secuencia de base de datos. T se conoce como el umbral de puntuación de palabra adyacente (Altschul et al.,(1990)). Estos aciertos de palabra adyacente iniciales actúan como semillas para iniciar búsquedas para encontrar HSP más largos que los contengan. Los aciertos de palabra se prolongan en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia todo el tiempo que pueda aumentarse la puntuación de alineación acumulativa. La prolongación de los aciertos de palabra en cada dirección se detiene cuando: la puntuación de alineación acumulativa queda fuera por una cantidad X de su valor conseguido máximo; la puntuación acumulativa llega a cero o por debajo, debido a la acumulación de una o más alineaciones de restos de puntuación negativa; o se alcanza el final de cualquier secuencia. Los parámetros del algoritmo BLAST W , T y X determinan la sensibilidad y la velocidad del alineación. El programa BLASTP usa por defecto una longitud de palabra (W) de 11, la matriz de puntuación BLOSUM62 (véase Henikoff (1992)) alineaciones (B) de 50, expectativa (E) de 10, $M = 5$, $N = -4$ y una comparación de ambas cadenas. El término BLAST se refiere al algoritmo BLAST que realiza un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias; véase, por ejemplo, Karlin (1993).

40 Métodos de producción

Como se ha indicado anteriormente, pueden obtenerse compuestos o metabolitos, obtenidos o procedentes de un organismo que tiene las características de identificación de un *B. megaterium* o, alternativamente, de cualquier otro microorganismo. Los métodos comprenden cultivar estos organismos (por ejemplo, en un cultivo) y obtener los compuestos y/o composiciones de la presente invención mediante el aislamiento de estos compuestos a partir del cultivo de estos organismos.

En particular, los organismos se cultivan en medio nutriente usando métodos conocidos en la técnica. Los organismos pueden cultivarse mediante cultivo en matraces de agitación, fermentación a pequeña o gran escala (incluidas, pero sin limitación, fermentaciones continuas, discontinuas, de flujo discontinuo o de estado sólido) en fermentadores de laboratorio o industriales realizados en un medio adecuado y en condiciones que permitan el crecimiento celular. El cultivo puede producirse en medio nutriente adecuado que comprende fuentes de carbono y nitrógeno y sales inorgánicas, usando procedimientos conocidos en la técnica. Los medios adecuados están disponibles en fuentes comerciales o se pueden preparar de acuerdo con las composiciones publicadas.

Después del cultivo, se puede usar un sobrenadante, filtrado y/o extracto de o derivado de *B. megaterium* para formular una composición plaguicida.

Alternativamente, tras el cultivo, los compuestos y/o metabolitos pueden extraerse del caldo de cultivo.

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

65 Composiciones

Las composiciones pueden comprender cultivos enteros de caldo, cultivos líquidos, o suspensiones de una cepa de *B. megaterium*, así como sobrenadantes, filtrados o extractos obtenidos de una cepa de *B. megaterium*, o el sobrenadante, filtrado y/o extracto o uno o más metabolitos o compuestos aislados procedentes de una cepa de *B. megaterium* o combinaciones de los anteriores que en particular tienen actividad nematocida contra cualquiera de los siguientes: nematodos de agallas de semillas (*Afrina wevelli*), nematodos de Bentgrass (*Anguina agrostis*), nematodos de agallas de brotes (*Anguina* spp.), nematodos de agallas de semillas (*Anguina* spp., *A. amsinckiae*, *A. balsamophila*; *A. tritici*), nematodos de agallas de la hoja de festuca (*A. graminis*), nematodos de la espiga enrollada (o agallas de trigo) (*Anguina tritici*), nematodos de brotes y hojas (o foliares) (*Aphelenchoides* spp., *A. subtenuis*), nematodos de hoja de begonia (o helecho, o engarce de primavera, o foliar de fresa, o nematodos de fresa, o enano de verano) (*A. fragariae*), nematodos del helecho (*A. olesistus*), nematodos del arroz (*A. oryzae*), nematodos de grosella (*A. ribes*), nematodos de grosella negra (o crisantemo) (*A. ritzemabosi*), nematodos foliares o de hojas de crisantemo (*A. ritzemabosi*), nematodos de punta blanca de arroz (o enano de primavera o brote de fresa) (*A. besseyi*), nematodos que se alimentan de hongos (setas) (*Aphelenchoides composticola*), *Atalodera* spp. (*Atalodera loniceriae*, *Atalodera ucri*), nematodos de espina (*Bakernema variabile*), nematodos de aguijón (*Belonolaimus* spp., *B. gracilis*, *B. longicaudatus*), nematodos de madera de pino (*Bursaphelenchus* spp., *B. xylophilus*, *B. mucronatus*), nematodos sésiles (*Cacopaurus* spp., *C. epacris*, *C. pestis*), nematodos de quiste de amaranto (*Cactodera amaranthi*), nematodos de quiste de abedul (*C. betulae*), nematodos de quiste de cactus (*C. cacti*), nematodos de quiste de Estonia (*C. estonica*), nematodos de quiste de Thorne (*C. thornei*), nematodos de quiste de zarzas (*C. weissii*), nematodos de anillo (*Criconema* spp.), nematodos de espina (*Criconema* spp., *C. civellae*, *C. decalineatum*, *C. spinalineatum*), nematodos de anillo (*Criconemella axeste*, *C. curvata*, *C. macrodora*, *C. parva*), nematodos de anillo (*Criconemoides* spp.), *C. citri*, *C. simile*), nematodos de espina (*Crossonema fimbriatum*), nematodos cistoides de eucalipto (*Cryphodera eucalypti*), nematodos de yema, tallo y bulbo (*Ditylenchus* spp., *D. angustus*, *D. dipsaci*, *D. destructor*, *D. intermedius*), Nematodos de engendro de champiñón (*D. myceliophagus*), nematodos de punzón (*Dolichodorus* spp., *D. heterocephalus*, *D. heterocephalous*), nematodos de lanza (*Dorylaimus* spp.), nematodos de atrofia (*Geocenamus superbus*), nematodos de quiste (*Globodera* spp.), nematodos de quiste de aquilea (*G. achilleae*), nematodos de quiste de milenrama (*G. achilleae*), nematodos de quiste de manzana (*G. mali*), nematodos de quiste de patata blanca (*G. pallida*), nematodos dorados (*G. rostochiensis*), nematodos de quiste de la planta de tabaco (*G. tabacum*), nematodos de quiste de Osborne (*G. tabacum solanacearum*), nematodos de quiste de la equina (*G. tabacum virginiae*), nematodos de aguja (*Gracilacus* spp., *G. idalimus*), nematodos en espiral (*Helicotylenchus* spp., *H. africanus*, *H. digonicus*, *H. dihystra*, *H. erythrinae*, *H. multicinctus*, *H. paragirus*, *H. pseudorobustus*, *H. solani*, *H. spicaudatus*), nematodos de vaina (*Hemicriconemoides* spp., *H. biformis*, *H. californianus*, *H. chitwoodi*, *H. floridensis*, *H. wessonii*), nematodos de vaina (*Hemicyclophora* spp., *H. arenaria*, *H. biosphaera*, *H. megalodiscus*, *H. parvana*, *H. poranga*, *H. sheri*, *H. similis*, *H. striatula*), nematodos de quiste (*Heterodera* spp.), nematodos de quiste de almendra (*H. amygdali*), nematodos de quiste de avena (o cereal) (*H. avenae*), nematodos de quiste de Cajanus (o guisante) (*H. cajani*), nematodos de quiste de hierba Bermuda (o en forma de corazón o de San Valentín) (*H. cardiolata*), nematodos de quiste de zanahoria (*H. carotae*), nematodos de quiste de col o gusano de la raíz de Brassica (*H. cruciferae*), nematodos de quiste de cebollín (o junco) (*H. cyperi*), nematodos de quiste japoneses (*H. elachista*), nematodos de quiste de higo (o ficus, o caucho) (*H. fici*), nematodos de quiste de Galeopsis (*H. galeopsidis*), nematodos de quiste de soja (*H. glycines*), nematodos de raíz de alfalfa (o quiste de guisante) (*H. goettingiana*), nematodos de quiste de trigo sarraceno (*H. graduni*), nematodos de quiste de cebada (*H. hordecalis*), nematodos de quiste de lúpulo (*H. humuli*), nematodos de quiste del cereal mediterráneo (o trigo) (*H. latipons*), nematodos de quiste de Lespedeza (*H. lespedezae*), nematodos de quiste de Kansas (*H. longicollis*), nematodos de quiste de avena o gusano de la raíz de cereales (*H. major*), nematodos de quiste de hierba (*H. mani*), nematodos de quiste de alfalfa (*H. medicaginis*), nematodos de quiste de Cyperus (o madre) (*Heterodera mothi*), nematodos de quiste de arroz (*H. oryzae*), Nematodos de Amu-Darya (o quiste de espina de camello) (*H. oxiana*), nematodos de quiste de muelle (*H. rosii*), nematodos de quiste de Rumex (*H. rumicis*), nematodos de quiste de la remolacha azucarera (*H. schachtii*), nematodos de quiste de sauce (*H. salixophila*), nematodos de quiste de Knawel (*H. scleranthii*), nematodos de quiste de cicerbita (*H. sonchophila*), nematodos de quiste tadzhikistanos (*H. tadzhikistanica*), nematodos de quiste turcomanos (*H. turcomanica*), nematodos de quiste de trébol (*H. trifolii*), nematodos de quiste de ortiga (*H. urticae*), nematodos de quiste Ustinov (*H. ustinovii*), nematodos de quiste de caupí (*H. vigni*), nematodos de quiste de maíz (*H. zea*), nematodos de raíz de arroz (*Hirschmanniella* spp., *H. belli*, *H. caudacrena*, *H. gracilis*, *H. oryzae*), nematodos de lanza (*Hoplolaimus* spp.), nematodos de Columbia (*H. columbus*), nematodos de lanza de Cobb (*H. galeatus*), nematodos de lanza con cabeza de corona (*H. tylenchiformis*), pseudonematodos del nudo de la raíz (*Hypsoperine graminis*), nematodos de aguja (*Longidorus* spp., *L. africanus*, *L. sylphus*), nematodos de anillo (*Macroposthonia* (= *Mesocriconema*) *xenoplax*), nematodos cistoides (*Meloidodera* spp.), nematodos cistoides de pino (*M. floridensis*), nematodos cistoides tadzhikistanos (*M. tadzhikistanica*), nematodos de cuerpo cistoide (*Meloidoderita* spp.), nematodos de atrofia (*Merlinius* spp., *M. brevidens*, *M. conicus*, *M. grandis*, *M. microdorus*), nematodos de nudo de la raíz (*Meloidogyne* spp., *M. acronea*, *M. arenaria*, *M. artiellia*, *M. brevicauda*, *M. camelliae*, *M. carolinensis*, *M. chitwoodi*, *M. exigua*, *M. graminicola*, *M. hapla*, *M. hispanica*, *M. incognita*, *M. incognita acrita*, *M. indica*, *M. inornata*, *M. javanica*, *M. kikuyuensis*, *M. konaensis*, *M. mali*, *M. microtyla*, *M. naasi*, *M. ovalis*, *M. platani*, *M. querciana*, *M. sasseri*, *M. tadzhikistanica*, *M. thamesi*), nematodos de la centaurea (*Mesoanguina picridis*), nematodos del abeto Douglas (*Nacobdodera chitwoodi*), falsos nematodos del nudo de la raíz (*Nacobbus aberrans*, *N. batatififormis*, *N. dorsalis*), nematodos de pasta agria (*Panagrellus redivivus*), nematodos de cerveza (*P. silusiae*), nematodos de aguja (*Paralongidorus microlaimus*), nematodos en espiral (*Paratrylenchus* spp.), nematodos de raíz gruesa (*Paratrichodorus allius*, *P. minor*, *P. porosus*, *P. renifer*), nematodos de aguja (*Paratylenchus* spp., *P. baldaccii*, *P. bukowinensis*, *P. curvatus*, *P. dianthus*, *P.*

5 *elachistus*, *P. hamatus*, *P. holdemani*, *P. italiensis*, *P. lepidus*, *P. nanus*, *P. neoamplycephalus*, *P. similis*), nematodos de lesión (o pradera) (*Pratylenchus* spp., *P. alleni*, *P. brachyurus*, *P. coffeae*, *P. convallariae*, *P. crenatus*, *P. flakkensis*, *P. goodeyi*, *P. hexincisus*, *P. leiocephalus*, *P. minyus*, *P. musicola*, *P. neglectus*, *P. penetrans*, *P. pratensis*, *P. scribneri*, *P. thornei*, *P. vulnus*, *P. zaeae*), nematodos de agalla de tallo (*Pterotylenchus cecidogenus*), nematodos de quiste de hierba (*Punctodera punctate*), nematodos de atrofia (*Quinisulcius acutus*, *Q. capitatus*), nematodos excavadores (*Radopholus* spp.), nematodos de raíz de plátano (*R. similis*), nematodos de raíz de arroz (*R. oryzae*), nematodos de anillo rojo (o coco o palma de coco) (*Rhadinaphelenchus cocophilus*), nematodos reniformes (*Rotylenchulus* spp., *R. reniformis*, *R. parvus*), nematodos en espiral (*Rotylenchus* spp., *R. buxophilus*, *R. christiei*, *R. robustus*), nematodos de lanza de Thorne (*R. uniformis*), *Sarisodera hydrophylla*, nematodos en espiral (*Scutellonema* spp., *S. blaberum*, *S. brachyurum*, *S. bradys*, *S. clathricaudatum*, *S. christiei*, *S. conicephalum*), nematodos de raíz-agalla de la hierba (*Subanguina radicicola*), nematodos cistoides redondos (*Thecavermiculatus andinus*), nematodos de raíz gruesa (*Trichodorus* spp., *T. christiei*, *T. kurumeensis*, *T. pachydermis*, *T. primitivus*), anguilas de vinagre (o nematodos) (*Turbatrix acetii*), nematodos de atrofia (o de estilete) (*Tylenchorhynchus* spp., *T. agri*, *T. annulatus*, *T. aspericutis*, *T. claytoni*, *T. ebriensis*, *T. elegans*, *T. golden*, *T. gracilliformis*, *T. martini*, *T. mashhoodi*, *T. microconus*, *T. nudus*, *T. oleraceae*, *T. penniseti*, *T. punensis*), nematodos de cítricos (*Tylenchulus semipenetrans*), nematodos daga (*Xiphinema* spp., *X. americanum*, *X. bakeri*, *X. brasiliense*, *X. brevicolle*, *X. chambersi*, *X. coxi*, *X. diversicaudatum*, *X. index*, *X. insigne*, *X. nigeriense*, *X. radicicola*, *X. setariae*, *X. vulgarae*, *X. vuittenezi*).

20 Las composiciones expuestas anteriormente pueden formularse de cualquier manera. Los ejemplos de formulación no limitantes incluyen, pero sin limitación, concentrados emulsionables (EC, por sus siglas en inglés), polvos humectables (WP, por sus siglas en inglés), líquidos solubles (SL, por sus siglas en inglés), aerosoles, soluciones concentradas de volumen ultra-bajo (ULV, por sus siglas en inglés), polvos solubles (SP, por sus siglas en inglés), microencapsulación, gránulos dispersos en agua, fluidos (FL), microemulsiones (ME), nanoemulsiones (NE), etc. En cualquier formulación descrita en el presente documento, el porcentaje del principio activo está dentro de un intervalo de 0,01 % a 99,99 %.

25 Las composiciones pueden estar en forma de un líquido, gel o sólido. Puede prepararse una composición sólida mediante la suspensión de un vehículo sólido en una solución de principio(s) activo(s) y el secado de la suspensión en condiciones suaves, tal como evaporación a temperatura ambiente o evaporación al vacío a 65 °C o menos.

30 Una composición puede comprender principio(s) activo(s) encapsulado(s) en gel. Dichos materiales encapsulados en gel pueden prepararse mediante la mezcla de un agente formador de gel (por ejemplo, gelatina, celulosa o lignina) con un cultivo o suspensión de *B. megaterium* vivo o inactivado, o un filtrado libre de células o fracción celular de un cultivo o suspensión de *B. megaterium*, o un cultivo, célula o fracción celular liofilizada o pulverizada o en una solución de compuestos plaguicidas usados en el método de la invención; y la inducción de la formación de gel del agente.

35 La composición puede comprender adicionalmente un tensioactivo para usarlo con el fin de emulsificación, dispersión, humectantes, propagación, integración, control de la disgregación, estabilización de principios activos y mejora de la fluidez o inhibición del óxido. En una realización particular, el tensioactivo es un tensioactivo no iónico no fitotóxico que preferentemente pertenece a la Lista 4B de la EPA. En otra realización particular, el tensioactivo no iónico es monolaurato de polioxietileno (20). La concentración de tensioactivos puede variar entre 0,1-35 % de la formulación total, el intervalo preferente es 5-25 %. La elección de agentes dispersantes y emulgentes, tales como dispersantes y agentes emulgentes no iónicos, aniónicos, anfóteros y catiónicos, y la cantidad empleada están determinadas por la naturaleza de la composición y la capacidad del agente para facilitar la dispersión de las composiciones de la presente invención.

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

60 Alternativamente, el agente puede ser un aceite natural o un producto oleoso que tiene actividad nematicida, fungicida y/o insecticida (por ejemplo, aceite parafínico, aceite del árbol del té, aceite de hierba de limón, aceite de clavo, aceite de canela, aceite de cítrico que incluye, pero sin limitación, naranja amarga, naranja, limón; aceite de romero, piretro, pimienta inglesa, bergamota, eucalipto común, camomila, citronela, jazmín común, enebro común, lavanda común, mirra común, menta de campo, fresa, santolina gris, hierba de hisopo, albahaca santa, árbol de incienso, jazmín, lavanda, caléndula, menta, menta, caléndula cultivada, hierbabuena, árbol de ylang-ylang, saponinas). Asimismo, el plaguicida puede ser un agente antifúngico de un solo sitio que puede incluir, pero sin limitación, bencimidazol, un inhibidor de la desmetilación (DMI, por sus siglas en inglés) (por ejemplo, imidazol, piperazina, pirimidina, triazol), morfolina, hidroxipirimidina, anilino pirimidina, fosforotiolato, inhibidor fuera de quinona, quinolina, dicarboximida, carboximida, fenilamida, anilino pirimidina, fenilpirrol, hidrocarburo aromático, ácido cinámico, hidroxianilida, antibiótico,

polioxina, acilamina, ftalimida, bencenoide (xililalanina), un inhibidor de la desmetilación seleccionado entre el grupo que consiste en imidazol, piperazina, pirimidina y triazol (por ejemplo, bitertanol, miclobutanilo, penconazol, propiconazol, triadimefón, bromuconazol, ciproconazol, diniconazol, fenbuconazol, hexaconazol, tebuconazol, tetraconazol), miclobutanilo y un inhibidor externo de quinona (por ejemplo, estrobilurina). La estrobilurina puede incluir, pero sin limitación, azoxiestrobina, kresoxima-metoilo o trofloxiestrobina. En otra realización particular más, el agente antifúngico es una quinona, por ejemplo, quinoxifeno (4-fluorofenil éter de 5,7-dicloro-4-quinolilo). El agente antifúngico también puede proceder de un extracto de *Reynoutria*.

El fungicida también puede ser un fungicida químico no inorgánico de múltiples sitios seleccionado del grupo que consiste en cloronitrilo, quinoxalina, sulfamida, fosfonato, fosfito, ditiocarbamato, cloralquiltios, fenilpiridinamina, cianoacetamida oxima.

Como se ha indicado anteriormente, la composición puede comprender además un nematicida. Este nematicida puede incluir, pero sin limitación, productos químicos tales como organofosforados, carbamatos y fumigantes, y productos microbianos tales como avermectina, *Myrothecium* sp. Biome (*Bacillus firmus*), *Pasteuria* spp., *Paecilomyces*, y productos orgánicos tales como saponinas y aceites vegetales.

Las composiciones pueden aplicarse usando métodos conocidos en la técnica. Específicamente, estas composiciones pueden aplicarse a y alrededor de plantas o partes de plantas. Debe entenderse que plantas significa en el presente contexto todas las plantas y poblaciones de plantas tales como plantas silvestres o plantas de cultivo deseadas y no deseadas (incluidas las plantas de cultivo de origen natural). Las plantas de cultivo pueden ser plantas que se pueden obtener mediante métodos convencionales de mejoramiento y optimización de plantas o mediante métodos de ingeniería genética y biotecnología, o combinaciones de estos métodos, incluidas plantas transgénicas y las variedades de cultivo de plantas protegibles o no protegibles por los derechos de los productores. Debe entenderse que partes de las plantas significa todas las partes y órganos de las plantas que se encuentran encima y debajo del suelo, tales como el brote, hoja, la flor y la raíz, los ejemplos que se pueden mencionar son hojas, espiculas, tallos, vástagos, flores, cuerpos fructíferos, frutas, semillas, raíces, tubérculos y rizomas. Las partes de plantas también incluyen material cosechado y material de propagación vegetativo y generativo, por ejemplo, esquejes, tubérculos, rizomas, ramificaciones y semillas.

El tratamiento de las plantas y partes de plantas con las composiciones expuestas anteriormente puede realizarse directamente o permitiendo que las composiciones actúen sobre su entorno, hábitat o espacio de almacenamiento mediante, por ejemplo, inmersión, pulverización, evaporación, nebulizando, dispersión, pintando, inyección. En el caso de que la composición se aplique a una semilla, la composición puede aplicarse a la semilla como una o más capas antes de plantar la semilla, o puede aplicarse como una suspensión o polvo al plantar, usando una o más capas usando métodos conocidos en la técnica. La semilla en una realización particular puede ser una semilla genéticamente modificada.

Las plantas que pueden tratarse incluyen, pero sin limitación: (A) Cultivos alimenticios comestibles principales, que incluyen, pero sin limitación, (1) Cereales (por ejemplo, arroz africano, cebada, trigo duro, trigo escaña cultivada, trigo almidonero, mijo africano, mijo común, pasto blanco, mijo de corral indio, mijo de corral japonés, maíz, nance, avena, mijo perla, mijo común, arroz, centeno, sorgo, *Sorghum* spp., centeno, trigo espelta); (2) Frutas (por ejemplo, aguái, acerola, achachairú, mangostán africano, grosella alpina, ambarella, grosella espinosa americana, caqui americano, manzana, albaricoque, arazá, palma palmira asiática, pera asiática, atemoya, pasas del desierto australianas, aguacate, espino rojo, babaco, membrillo de Bengala, plátano, grosella espinosa de Barbados, bergamota, nuez de areca, bignay, arándano, grosella china, binjai, biriba, naranja amarga, aronia negra, mora negra, zapote negro, mora, madre selva de bayas azules, borojó, árbol del pan, uva birmana, botón mangostán, cacao, calamondina, canistel, melón cantalupo, uchuva, anacardo, calabaza melona, jaca de la India, charichuelo, chirimoya, cereza, cereza de Río Grande, ciruelo de jardín, espino chino, pera blanca china, aronia, toronja, cocona, coco, cocoplum, café, café Arabica, café Robusta, pitahaya de Costa Rica, grosella, manzana de azúcar, dátil, dátil-ciruela, rosa canina, fruta del dragón, durián, sauco, manzana del elefante, berenjena etíope, latonero, manzana salvaje europea, guayabo, higo, gac, genipapo, granadilla gigante, grosella espinosa, gumi, uva, pomelo, fruta del paraíso, ciruela claudia, guayaba, kiwiño, Jobo, melón kiwano, mango, higo indio, ciruela india, jaboticaba, jackberry, panapén, caqui japonés, frambuesa japonesa, ciruela de huesito, jujuba, lima kafir, caranda, manzana kei, manzana kepel, lima kei, ketembilla, kiwi, korlan, vid de Kubal, kiwini, kwai muk, lanzón, arándano rojo grande, limón, café de Liberia, longuán, níspero japonés, lichi, manzana malaya, mamey zapote, mamey amarillo, mango, mangostán, gandaria, marang, níspero europeo, melón, cacabeles, fruta milagrosa, yaca monkey, palma de moriche, papayuela, guanábano de loma, morera, naranjilla, ciruela de natal, arándano azul, oliva, grosella estrellada, kumquat, papaya, paraguayo, fruta de la pasión, chirimoyo de la Florida, melocotón, pijuayo, pera, pepino, piña, pitomba de Bahía, pitomba talisia esculenta, plátano macho, ciruela, granada, pomelo, pulasan, aronia morada, membrillo, rambután, ramontchi, frambuesa, aronia roja, grosella roja, mora roja, guayabo peruano rojo, ruibarbo, pomarrosa, hibiscus, pera africana, salak, frambuesa grande amarilla, santol, sapodilla, satsuma, uva de playa, soncoya, guindo, guanábano, lima española, tamarindo español, caimito, fruta de la estrella, fresa, guayabo peruano, madroño, manzana de azúcar, cereza de cayena, rosa mosqueta, granadilla dulce, lima dulce, tamarillo, tamarindo, mandarina, tomatillo, tucumá, *Vaccinium* spp., mabolo, wampee, sandía, manzana de agua, manzana de Java, grosella blanca, mora blanca, zapote blanco, caimito blanco, baya de goji (*Lyceum barbarum*, *L. chinense*), surinam, pitaya amarilla, fresa amarilla, guayaba, (3) Vegetales (por ejemplo, achee, margarita azul, patata de aire, *Amaranthus* spp., maní americano, berenjena africana, pepino armenio, apio

criollo, oreja de elefante, arrurruz, alcachofa, calabaza china, espárrago, aguacate, soja roja, maní de bambara, bambú, plátano, grosella espinosa de Barbados, remolacha, raíz de remolacha, melón amargo, lenteja bastarda, vernonia, mostaza negra, rábano negro, salsifi negro, apio blanqueado, árbol del pan, haba, brécol, coles de Bruselas, hierba estrella, calabaza botón de oro, calabaza moscada, repollo, caigua, calabaza de peregrino, comino de prado, 5 algarroba, zanahoria, calabaza melona, mandioca, catjang, coliflor, apio con raíz de nabo, apio, lechuga china, acelga, chayote, garbanzo, achicoria, chilacayote, chile (*Capsicum annuum*, *C. baccatum*, *C. chinense*, *C. frutescens*, *C. pubescens*), repollo chino, castaña de agua china, ñame chino, cebollinos, chufa, cultivos de col, judía común, verdolaga común, canónigo, frijol, berro, pepino, calabaza pipián, moringa aleifera, eddoe, berenjena, ñame de Telinga, ajo elefante, endivia, bananero de Etiopía, berenjena etíope, hinojo de Florencia, calabaza costillada, gac, 10 rúcula, ajo, frijol molido, espárrago de los pobres, almorta, maní, goma guar, frijol de Kulthy, rábano picante, frijol de Egipto, planta de hielo, higo indio, espinaca de Malabar, calabaza hiedra, pataca, nabo mejicano, yute, col común, colinabo, konjac, kurrat, puerro, lenteja, lechuga, alubia de Lima, lotus, luffa, maca, maíz, remolacha de campo, papa amarga, bambú de invierno, frijol mate, soja verde, repollo chino, nim, oca, oca, bambú gigante, oliva, cebolla, chirivía, guisante, guandú, plátano macho, calabaza puntiaguda, patata, calabazas redondas, calabazas, quinoa, rábano, 15 colza, amaranto rojo, ruibarbo, drinji de la India, frijol arroz, raíz de perejil, judía escarlada, colinabo, falsa palmera, salsifi, cebolla de primavera, col marina, ascalonia, calabaza de serpiente, guisante de nieve, lengua de vaca, semillas de soja, hierba de los dientes, espinaca, acelga común, batata, taro, altramuz, calabaza espinosa, frijol tépari, tinda, tomate, guisante tuberoso, nabo, perifollo bulboso, frijol negro, castaña de agua, castaña de agua, cancon, berro de agua, cebolleta, oca africana, pepino silvestre, berza perruna, ñame de agua, frijol alada, verdolaga de Cuba, yacón, ñame, frijol espárrago, calabacines); (4) Cultivos alimenticios (por ejemplo, aguái, acerola, achachairú, achee, mangostán africano, arroz africano, margarita azul, patata de aire, grosella alpina, *Amaranthus* spp., manzana de oro, grosella espinosa americana, maní americano, caqui americano, berenjena africana, manzana, albaricoque, arazá, pepino armenio, apio criollo, oreja de elefante, arrurruz, alcachofa, calabaza china, palma palmira asiática, pera asiática, espárrago, atemoya, pasas del desierto australianas, aguacate, espino rojo, soja roja, babaco, membrillo de 25 Bengala, maní de bambara, bambú, plátano, grosella espinosa de Barbados, cebada, remolacha, remolacha roja, bergamota, nuez de areca, bignay, arándano, grosella china, binjai, biriba, melón amargo, naranja amarga, lenteja bastarda, vernonia, aronia negra, grosella negra, mora negra, mostaza negra, rábano negro, salsifi negro, zapote negro, mora, apio blanqueado, madre selva de bayas azules, borojó, árbol del pan, haba, brécol, coles de Bruselas, hierba estrella, trigo sarraceno, uva birmana, calabaza botón de oro, calabaza moscada, botón mangostán, repollo, cacao, caigua, calabaza de peregrino, calamondina, canistel, melón cantalupo, uchuva, comino de prado, algarroba, zanahoria, anacardo, mandioca, catjang, coliflor, apio con raíz de nabo, apio, lechuga china, jaca de la India, acelga, charichuelo, chayote, chirimoya, cereza, cereza de Río Grande, ciruelo de jardín, garbanzo, achicoria, chilacayote, chile (*Capsicum annuum*, *C. baccatum*, *C. chinense*, *C. frutescens*, *C. pubescens*), repollo chino, espino chino, castaña de agua china, pera blanca china, ñame chino, cebollinos, aronia, chufa, toronja, cocona, coco, cocoplum, café, café (tipo Arábica y Robusta), cultivos de col, judía común, verdolaga común, canónigo, pitahaya de Costa Rica, frijol, berro, pepino, grosella, calabaza pipián, manzana de azúcar, dátil, dátil-ciruella, rosa canina, fruta del dragón, moringa aleifera, durián, trigo duro, eddoe, berenjena, trigo escaña cultivada, sauco, manzana del elefante, ñame de Telinga, ajo elefante, trigo almidonero, endivia, bananero de Etiopía, berenjena etíope, latonero, manzana salvaje europea, guayabo, higo, mijo africano, hinojo de Florencia, calabaza costillada, mijo común, gac, rúcula, ajo, genipapo, frijol 40 molido, granadilla gigante, espárrago de los pobres, grosella espinosa, gumi, uva, pomelo, almorta, fruta del paraíso, ciruela claudia, cacahuete, cereza de Brasil, goma guar, guayaba, pasto blanco, kiwiño, Jobo, melón kiwano, frijol de Kulthy, mango, rábano picante, frijol de Egipto, planta de hielo, mijo de corral indio, higo indio, ciruela india, espinaca de Malabar, calabaza hiedra, jaboticaba, ébano africano, panapén, jambul, mijo de corral japonés, caqui japonés, frambuesa japonesa, pataca, ciruela de huesito, jujuba, yute, lima kafir, col común, caranda, manzana kei, manzana kepel, lima kei, ketembilla, kiwi, colinabo, konjac, korlan, vid de Kubal, kurrat, kiwini, kwai muk, lanzón, arándano rojo grande, puerro, limón, lenteja, lechuga, café de Liberia, alubia de Lima, longuián, níspero japonés, lotus, luffa, lichí, maca, maíz, manzana malaya, mamey zapote, mamey amarillo, remolacha de campo, mango, mangostán, gandaria, marang, papa amarga, níspero europeo, melón, cacabeles, fruta milagrosa, fruta monk, yaca monkey, palma de moriche, bambú de invierno, frijol mate, papayuela, guanábano de loma, morera, soja verde, champiñones, nance, 50 repollo chino, naranjilla, ciruela de natal, nim, arándano azul, avena, oca, palma oleaginosa, oca, bambú gigante, oliva, cebolla, naranja, grosella estrellada, kumquat, papaya, paraguayana, chirivía, fruta de la pasión, chirimoyo de la Florida, guisante, melocotón, pijuayo, pera, mijo perla, pepino, guandú, piña, Pitomba (*Eugenia luschnathiana*, *Talisia esculenta*), plátano macho, ciruela, calabaza puntiaguda, granada, pomelo, patata, mijo común, pulasan, calabazas redondas y calabazas, aronia morada, membrillo, quinoa, rábano, rambután, ramontchi, colza, frambuesa, amaranto rojo, aronia roja, grosella roja, mora roja, guayabo peruano rojo, ruibarbo, drinji de la India, arroz, frijol arroz, raíz de perejil, pomarroja, hibiscus, judía escarlada, colinabo, centeno, pera africana, falsa palmera, salak, frambuesa grande amarilla, salsifi, santol, sapodilla, satsuma, cebolla de primavera, col marina, uva de playa, ascalonia, calabaza de serpiente, guisante de nieve, soncoya, sorgo, *Sorghum* spp., lengua de vaca, cereza ácida, guanábano, semillas de soja, lima española, tamarindo español, trigo espelta, hierba de los dientes, espinaca, acelga común, caimito, fruta de la estrella, fresa, guayabo peruano, madroño, manzana de azúcar, remolacha azucarera, caña de azúcar, cereza de cayena, rosa mosqueta, granadilla dulce, lima dulce, batata, tamarillo, tamarindo, mandarina, taro, altramuz, calabaza espinosa, tef, frijol tépari, tinda, tomatillo, tomate, guisante tuberoso, tucumá, nabo, perifollo bulboso, frijol negro, *Vaccinium* spp., mabolo, wampee, castaña de agua (*Trapa bicornis*, *T. natans*), cancon, berro de agua, sandía, manzana de agua, manzana de Java, cebolleta, oca africana, pepino silvestre, trigo, grosella blanca, berza perruna, 65 mora blanca, zapote blanco, caimito blanco, ñame de agua, frijol alada, verdolaga de Cuba, baya de goji (*Lycium barbarum*, *L. chinense*), yacón, ñame, arrayán chino, frijol espárrago, surinam, pitaya amarilla, guayavo peruano

amarillo, calabacín; (B) Otros cultivos comestibles, que incluyen, pero sin limitación, (1) Hierbas (por ejemplo, artemisa amarga, alexander, albahaca, laurel, nuez de areca, camomila, perfollo, chile (*Capsicum annuum*, *C. baccatum*, *C. chinense*, *C. frutescens*, *C. pubescens*), chiles, cebollinos, mirra, ruda, tomillo, cilantro, berro, culantro, perejil de hoja rizada, eneldo, epazote, hinojo, perejil de hoja plana, ginseng, santolina gris, hierba de hisopo, albahaca santa, lúpulu, jazmín, lima kafir, lavanda, melisa, albahaca de limón, citronela, apio de monte, mejorana, menta, orégano, perejil, menta, perilla, caléndula cultivada, rooibos, romero, salvia, espino cerval de hoja brillante, lengua de vaca, hierbabuena, ajedrea de verano, estragón, albahaca tailandesa, valeriana, berro de agua, betel silvestre, ajedrea de invierno, hierba mate); (2) Especies (por ejemplo, alcaravea de ajowan, pimienta inglesa, anís, laurel, cardamomo negro, mostaza negra, pimienta negra, alcaparra, comino de prado, cardamomo, chile (*Capsicum annuum*, *C. baccatum*, *C. chinense*, *C. frutescens*, *C. pubescens*), chiles, canela, clavo, enebro común, cilantro, comino, hinojo, fenogreco, ajo, jengibre, lima kafir, regaliz, nuez moscada, orégano, pandano, perejil, azafrán, anís estrellado, cúrcuma, vainilla, mostaza blanca); (2) Plantas medicinales (por ejemplo, artemisa amarga, alfalfa, áloe vera, anís, alcachofa, albahaca, laurel, hoja de betel, nuez de areca, arándano, cardamomo negro, mostaza negra, pimienta negra, eucalipto común, borjój, manzanilla, alcaparra, cardamomo, semilla de ricino, chiles, ñame chino, cebollinos, nuez de cola, jazmín común, lavanda común, mirra común, ruda, cilantro, comino, eneldo, rosa canina, epazote, hinojo, fenogreco, gac, ajo, jengibre, santolina gris, goma arábica, hierba de hisopo, albahaca santa, rábano picante, árbol de incienso, lavanda, citronela, regaliz, apio de monte, marihuana, mejorana, fruta monk, nim, opio, orégano, menta, caléndula cultivada, quinina, acacia roja, grosella roja, rooibos, cártamo, salvia, espino cerval de hoja brillante, lengua de vaca, hierba de los dientes, anís estrellado, estragón, té, cúrcuma, valeriana, frijol terciopelo, berro de agua, mostaza blanca, zapote blanco, betel silvestre, baya de goji (*Lycium barbarum*, *L. chinense*), hierba mate); (3) Estimulantes (por ejemplo, hoja de betel, nuez de areca, cacao, chile (*Capsicum annuum*, *C. baccatum*, *C. chinense*, *C. frutescens*, *C. pubescens*), chiles, café, café (Arabica, Robusta), nuez de cola, khat, café de Liberia, té, tabaco, betel silvestre, hierba mate); (4) Frutos secos (por ejemplo, almendra, nuez de areca, nuez de Brasil, anacardo, castaña, castaña de agua china, coco, nuez de cola, nuez de Castilla, cacahuete, avellana, bellota japonesa, macadamia, nuez moscada, nuez del paraíso, nuez pecan, pistacho, bellota); (5) Semillas comestibles (por ejemplo, pimienta negra, nuez de Brasil, chilacayote, nuez de cola, calabaza costillada, lotus, opio, quinoa, sésamo, girasol, castaña de agua (*Trapa bicornis*, *T. natans*); (6) Aceites vegetales (por ejemplo, mostaza negra, camelina, semilla de ricino, coco, algodón, linaza, maíz, nim, semilla de niger, palma oleaginosa, oliva, opio, colza, cártamo, sésamo, semillas de soja, girasol, árbol de tung, nabo); (7) Cultivos de azúcar (por ejemplo, palma palmira asiática, palma datilera de plata, sorgo, remolacha azucarera, caña de azúcar); (8) Pseudocereales (por ejemplo, *Amaranthus* spp., trigo sarraceno, quinoa amaranto rojo); (9) Afrodisiacos (por ejemplo, borjój, apio, durián, rúcula, ginseng, maca, acacia roja, frijol terciopelo); (C) Categorías no alimentarias, que incluyen, pero sin limitación, (1) cultivos forrajeros y de forraje (por ejemplo, margarita azul, alfalfa, remolacha, haba, camelina, catjang, almorta, goma guar, frijol de Kulthy, mijo de corral indio, mijo de corral japonés, trébol japonés, altramuz, maíz, remolacha de campo, morera, semilla de niger, colza, frijol arroz, centeno); (2) Cultivos de fibra (por ejemplo, coco, algodón, ágave, cáñamo, henequen de Cuba, yute, kapok, kenaf, linaza, cáñamo de Manila, lino de Nueva Zelanda, ramio, hibiscus, sisal, mora blanca); (3) Cultivos energéticos (por ejemplo, eucalipto común, camelina, mandioca, maíz, colza, sorgo, semillas de soja, pasto del Sudán, remolacha azucarera, caña de azúcar, trigo); (4) Producción de alcohol, (por ejemplo, cebada, ciruela, patata, caña de azúcar, trigo, sorgo); (5) Cultivos de tinte (por ejemplo, raíz de chaya, alheña, índigo, palo amarillo, cártamo, azafrán, cúrcuma); (6) Aceites esenciales (por ejemplo, pimienta inglesa, bergamota, naranja amarga, eucalipto común, camomila, citronela, clavo, jazmín común, enebro común, lavanda común, mirra común, menta de campo, fresia, santolina gris, hierba de hisopo, albahaca santa, árbol de incienso, jazmín, lavanda, limón, caléndula, menta, naranja, menta, caléndula cultivada, hierbabuena, árbol ylang-ylang); (6) Abonos verdes (por ejemplo, alfalfa, trébol, lacy Phacelia, cáñamo marrón, trébol, frijol terciopelo, arveja); (7) Prevención de la erosión (por ejemplo, bambú, cocoplum); (8) Mejora del suelo (por ejemplo, altramuz y arveja); (9) Cultivos de cobertura (por ejemplo, alfalfa, lacy Phacelia, rábano); (10) Plaguicidas botánicos (por ejemplo, nabo mejicano, caléndula, nim, piretro); (11) Flores cortadas (por ejemplo, clavel, crisantemo, narciso, dalia, fresia, gerbera, caléndula, rosa, girasol, tulipán); (12) Plantas ornamentales (por ejemplo, mangostán africano, áloe vera, grosella alpina, aster, aronia negra, árbol del pan, calamondina, clavel, calabaza melona, semilla de ricino, ciruelo de jardín, aronia, crisantemo, cocoplum, lavanda común, crocus, narciso, dalia, fresia, gerbera, jacinto, bellota japonesa, jazmín, lacy Phacelia, lotus, altramuz, caléndula, lino de Nueva Zelanda, opio, aronia morada, ramio, aronia roja, rosa, girasol, tulipán, mora blanca); (D) Árboles que incluyen, pero sin limitación, abelia, almendro, manzano, albaricoquero, tuya negra americana, tuya, fresno, álamo temblón, azalea, ciprés clavo, beautybush, haya, abedul, tupelo negro, mora, arándano, boj, falso castaño, arbusto de las mariposas, nogal blanco americano, camelio, catalpa, cedro, cerezo, castaño, árbol del café, manzano silvestre, manzano silvestre, árbol de Júpiter, ciprés, cornejo, abeto de Douglas, ébano, arce negundo, olmo, abeto, forsitia, ginkgo, jabonero de china, almez americano, espino, avellano, cicuta, carya, acebo, acacia de tres espinas, castaño de Indias, hortensias, enebro, lilo, tilo, magnolio, arce, filadelfo, fresno de las montañas, roble, olivo, melocotonero, peral, pecano, pino, pistacho, plátano de sombra, ciruelo, álamo, abeto, frambuesa, ciclamor del Canadá, cedro rojo, secuoya, rododendro, rosa de Sarón, sasafrás, secoya, guillomo, árbol del humo, jaboncillo, árbol de madera agria, abeto, madroño, calicanto, sicomoro, tulípero, árbol caminante, nogal, veigela, sauce, acebo nativo, avellano de bruja, zelvka); (E) Césped que incluye, pero sin limitación, pasto azul de Kentucky, festuca alta, grama, hierba zoysia, hierba de centeno perenne, festuca fina (por ejemplo; rastrera roja, festuca masticable, dura u ovina).

Las composiciones también pueden aplicarse al suelo usando métodos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Chitwood, "Nematicides", disponible en naldc.nal.usda.gov/download/43874/PDF). Dichos métodos incluyen, pero sin limitación, fumigación, riego por goteo o quimigación, incorporación de suelo, empapado de suelo, tratamiento y

vendaje de semillas, inmersión de raíz desnuda.

Usos plaguicidas

- 5 Las composiciones, cultivos, sobrenadantes, metabolitos y compuestos plaguicidas expuestos anteriormente pueden usarse como plaguicidas. En particular, las composiciones, cultivos, sobrenadantes, metabolitos y compuestos plaguicidas como se expone anteriormente pueden usarse como insecticidas y nematocidas, solos o en combinación con una o más sustancias plaguicidas establecidas anteriormente.
- 10 Específicamente, los nematodos que pueden controlarse usando el método expuesto anteriormente incluyen, pero sin limitación, nematodos de vida libre, nematodos parásitos como nudos de raíz, quiste, y nematodos de lesión, incluidos, pero sin limitación, nematodos de agallas de semillas (*Afrina wevelli*), nematodos de Bentgrass (*Anguina agrostis*), nematodos de agallas de brotes (*Anguina* spp.), nematodos de agallas de semillas (*Anguina* spp., *A. amsinckiae*, *A. balsamophila*; *A. tritici*), nematodos de agallas de la hoja de festuca (*A. graminis*), nematodos de la espiga enrollada (o agallas de trigo) (*Anguina tritici*), nematodos de yemas y hojas (o foliares) (*Aphelenchoides* spp., *A. subtenuis*),
- 15 nematodos de hoja de begonia (o helecho, o engarce de primavera, o foliar de fresa, o nematodos de fresa, o enano de verano) (*A. fragariae*), nematodos del helecho (*A. olesistus*), nematodos del arroz (*A. oryzae*), nematodos de grosella (*A. ribes*), nematodos de grosella negra (o crisantemo) (*A. ritzemabosi*), nematodos foliares o de hojas de crisantemo (*A. ritzemabosi*), nematodos de punta blanca de arroz (o enano de primavera o brote de fresa) (*A. besseyi*), nematodos que se alimentan de hongos (setas) (*Aphelenchoides composticola*), *Atalodera* spp. (*Atalodera loniceriae*, *Atalodera ucri*), nematodos de espina (*Bakernema variable*), nematodos de aguijón (*Belonolaimus* spp., *B. gracilis*, *B. longicaudatus*), nematodos de madera de pino (*Bursaphelenchus* spp., *B. xylophilus*, *B. mucronatus*), nematodos sésiles (*Cacopaurus* spp., *C. epacris*, *C. pestis*), nematodos de quiste de amaranto (*Cactodera amaranthi*), nematodos de quiste de abedul (*C. betulae*), nematodos de quiste de cactus (*C. cacti*), nematodos de quiste de Estonia (*C. estonica*), nematodos de quiste de Thorne (*C. thornei*), nematodos de quiste de zarzas (*C. weissii*), nematodos de anillo (*Criconema* spp.), nematodos de espina (*Criconema* spp., *C. civellae*, *C. decalineatum*, *C. spinalineatum*),
- 25 nematodos de anillo (*Criconemella axeste*, *C. curvata*, *C. macrodora*, *C. parva*), nematodos de anillo (*Criconemoides* spp.), *C. citri*, *C. simile*), nematodos de espina (*Crossonema fimbriatum*), nematodos cistoides de eucalipto (*Cryphodera eucalypti*), nematodos de yema, tallo y bulbo (*Ditylenchus* spp., *D. angustus*, *D. dipsaci*, *D. destructor*, *D. intermedius*), Nematodos de engendro de champiñón (*D. myceliophagus*), nematodos de punzón (*Dolichodorus* spp., *D. heterocephalus*, *D. heterocephalous*), nematodos de lanza (*Dorylaimus* spp.), nematodos de atrofia (*Geocenamus superbus*), nematodos de quiste (*Globodera* spp.), nematodos de quiste de aquilea (*G. achilleae*), nematodos de quiste de milenrama (*G. achilleae*), nematodos de quiste de manzana (*G. mali*), nematodos de quiste de patata blanca (*G. pallida*), nematodos dorados (*G. rostochiensis*), nematodos de quiste de la planta de tabaco (*G. tabacum*), nematodos de quiste de Osborne (*G. tabacum solanacearum*), nematodos de quiste de la equina (*G. tabacum virginiae*),
- 35 nematodos de aguja (*Gracilacus* spp., *G. idalimus*), nematodos en espiral (*Helicotylenchus* spp., *H. africanus*, *H. digonicus*, *H. dihystra*, *H. erythrinae*, *H. multincinctus*, *H. paragirus*, *H. pseudorobustus*, *H. solani*, *H. spicaudatus*), nematodos de vaina (*Hemicriconemoides* spp., *H. biformis*, *H. californianus*, *H. chitwoodi*, *H. floridensis*, *H. wessonii*), nematodos de vaina (*Hemicyclophora* spp., *H. arenaria*, *H. biosphaera*, *H. megalodiscus*, *H. parvana*, *H. poranga*, *H. sheri*, *H. similis*, *H. striatula*), nematodos de quiste (*Heterodera* spp.), nematodos de quiste de almendra (*H. amygdali*),
- 40 nematodos de quiste de avena (o cereal) (*H. avenae*), nematodos de quiste de Cajanus (o guisante) (*H. cajani*), nematodos de quiste de hierba Bermuda (o en forma de corazón o de San Valentín) (*H. cardiolata*), nematodos de quiste de zanahoria (*H. carotae*), nematodos de quiste de col o gusano de la raíz de Brassica (*H. cruciferae*), nematodos de quiste de cebollín (o junco) (*H. cyperi*), nematodos de quiste japoneses (*H. elachista*), nematodos de quiste de higo (o ficus, o caucho) (*H. fici*), nematodos de quiste de Galeopsis (*H. galeopsidis*), nematodos de quiste de soja (*H. glycines*), nematodos de raíz de alfalfa (o quiste de guisante) (*H. goettingiana*), nematodos de quiste de trigo sarraceno (*H. graduni*), nematodos de quiste de cebada (*H. hordecalis*), nematodos de quiste de lúpulo (*H. humuli*), nematodos de quiste del cereal mediterráneo (o trigo) (*H. latipons*), nematodos de quiste de Lespedeza (*H. lespedezae*), nematodos de quiste de Kansas (*H. longicolla*), nematodos de quiste de avena o gusano de la raíz de cereales (*H. major*), nematodos de quiste de hierba (*H. mani*), nematodos de quiste de alfalfa (*H. medicaginis*), nematodos de quiste de Cyperus (o madre) (*Heterodera mothi*), nematodos de quiste de arroz (*H. oryzae*), Nematodos de Amu-Darya (o quiste de espina de camello) (*H. oxiana*), nematodos de quiste de muelle (*H. rosii*), nematodos de quiste de Rumex (*H. rumicis*), nematodos de quiste de la remolacha azucarera (*H. schachtii*), nematodos de quiste de sauce (*H. salixophila*), nematodos de quiste de Knawel (*H. scleranthii*), nematodos de quiste de cicorbata (*H. sonchophila*), nematodos de quiste tadjikistanos (*H. tadjikistanica*), nematodos de quiste turcomanos (*H. turcomanica*),
- 55 nematodos de quiste de trébol (*H. trifolii*), nematodos de quiste de ortiga (*H. urticae*), nematodos de quiste Ustinov (*H. ustinovii*), nematodos de quiste de caupí (*H. vigni*), nematodos de quiste de maíz (*H. zea*), nematodos de raíz de arroz (*Hirschmanniella* spp., *H. belli*, *H. caudacrena*, *H. gracilis*, *Horyzae*), nematodos de lanza (*Hoplolaimus* spp.), nematodos de Columbia (*H. columbus*), nematodos de lanza de Cobb (*H. galeatus*), nematodos de lanza con cabeza de corona (*H. tylenchiformis*), pseudonematodos del nudo de la raíz (*Hypsoperine graminis*), nematodos de aguja (*Longidorus* spp., *L. africanus*, *L. sylphus*), nematodos de anillo (*Macroposthonia* (= *Mesocriconema*) *xenoplax*), nematodos cistoides (*Meloidodera* spp.), nematodos cistoides de pino (*M. floridensis*), nematodos cistoides tadjikistanos (*M. tadjikistanica*), nematodos de cuerpo cistoide (*Meloidoderita* spp.), nematodos de atrofia (*Merlinius* spp., *M. brevidens*, *M. conicus*, *M. grandis*, *M. microdorus*), nematodos de nudo de la raíz (*Meloidogyne* spp., *M. acronea*, *M. arenaria*, *M. artiellia*, *M. brevicauda*, *M. camelliae*, *M. carolinensis*, *M. chitwoodi*, *M. exigua*, *M. graminicola*, *M. hapla*, *M. hispanica*, *M. incognita*, *M. incognita acrita*, *M. indica*, *M. inornata*, *M. javanica*, *M. kikuyuensis*, *M. konaensis*, *M. mali*, *M. microtyla*, *M. naasi*, *M. ovalis*, *M. platani*, *M. querciana*, *M. sasseri*, *M. tadjikistanica*, *M.*

thamesi), nematodos de la centaurea (*Mesoanguina picridis*), nematodos del abeto Douglas (*Nacobdodera chitwoodi*), falsos nematodos del nudo de la raíz (*Nacobbus aberrans*, *N. batatiformis*, *N. dorsalis*), nematodos de pasta agria (*Panagrellus redivivus*), nematodos de cerveza (*P. silusiae*), nematodos de aguja (*Paralongidorus microlaimus*), nematodos en espiral (*Paratylenchus* spp.), nematodos de raíz gruesa (*Paratrichodorus allius*, *P. minor*, *P. porosus*, *P. renifer*), nematodos de aguja (*Paratylenchus* spp., *P. baldaccii*, *P. bukowinensis*, *P. curvatus*, *P. dianthus*, *P. elachistus*, *P. hamatus*, *P. holdemani*, *P. italiensis*, *P. lepidus*, *P. nanus*, *P. neoamplycephalus*, *P. similis*), nematodos de lesión (o pradera) (*Pratylenchus* spp., *P. alleni*, *P. brachyurus*, *P. coffeae*, *P. convallariae*, *P. crenatus*, *P. flakkensis*, *P. goodeyi*, *P. hexincisus*, *P. leioccephalus*, *P. minyus*, *P. musicola*, *P. neglectus*, *P. penetrans*, *P. pratensis*, *P. scribneri*, *P. thornei*, *P. vulnus*, *P. zaeae*), nematodos de agalla de tallo (*Pterotylenchus cecidogenus*), nematodos de quiste de hierba (*Punctodera punctate*), nematodos de atrofia (*Quinislucius acutus*, *Q. capitatus*), nematodos excavadores (*Radopholus* spp.), nematodos de raíz de plátano (*R. similis*), nematodos de raíz de arroz (*R. oryzae*), nematodos de anillo rojo (o coco o palma de coco) (*Rhadinaphelenchus cocophilus*), nematodos reniformes (*Rotylenchulus* spp., *R. reniformis*, *R. parvus*), nematodos en espiral (*Rotylenchus* spp., *R. buxophilus*, *R. christiei*, *R. robustus*), nematodos de lanza de Thorne (*R. uniformis*), *Sarisodera hydrophylla*, nematodos en espiral (*Scutellonema* spp., *S. blaberum*, *S. brachyurum*, *S. bradys*, *S. clathricaudatum*, *S. christiei*, *S. conicephalum*), nematodos de raíz-agalla de la hierba (*Subanguina radiculicola*), nematodos cistoides redondos (*Thecavermiculatus andinus*), nematodos de raíz gruesa (*Trichodorus* spp., *T. christiei*, *T. kurumeensis*, *T. pachydermis*, *T. primitivus*), anguilas de vinagre (o nematodos) (*Turbatrix acetii*), nematodos de atrofia (o de estilete) (*Tylenchorhynchus* spp., *T. agri*, *T. annulatus*, *T. aspericutis*, *T. claytoni*, *T. ebriensis*, *T. elegans*, *T. golden*, *T. graciliformis*, *T. martini*, *T. mashhoodi*, *T. microconus*, *T. nudus*, *T. oleraceae*, *T. penniseti*, *T. punensis*), nematodos de cítricos (*Tylenchulus semipenetrans*), nematodos daga (*Xiphinema* spp., *X. americanum*, *X. bakeri*, *X. brasiliense*, *X. brevicolle*, *X. chambersi*, *X. coxi*, *X. diversicaudatum*, *X. index*, *X. insigne*, *X. nigeriense*, *X. radiculicola*, *X. setariae*, *X. vulgariae*, *X. vuittenezi*).

Se proporciona la aplicación de una cantidad eficaz de control plaguicida de un sobrenadante, filtrado o extracto que contiene un metabolito plaguicidamente activo, o un compuesto aislado producido por *B. megaterium* o la aplicación de combinaciones de lo anterior. La cepa o sobrenadante o filtrado o extracto, metabolito y/o compuesto se aplican, solos o en combinación con otra sustancia plaguicida, en una cantidad eficaz de control de plaga o plaguicida. Una cantidad eficaz se define como la cantidad de células de microorganismos, sobrenadante, filtrado o extracto, metabolito y/o compuesto solos o en combinación con otra sustancia plaguicida que es suficiente para modular la infestación de plagas. La tasa eficaz puede verse afectada por las especies de plagas presentes, etapa de crecimiento de plagas, densidad de población de plagas y factores ambientales tales como temperatura, velocidad del viento, lluvia, hora del día y estacionalidad. La cantidad que estará dentro de un intervalo eficaz en un caso particular puede determinarse mediante pruebas de laboratorio o de campo.

35 Promoción del crecimiento vegetal

La composición divulgada en el presente documento, en particular, *Bacillus megaterium* y/o un sobrenadante, filtrado, extracto, compuesto, metabolito o fracción celular obtenida de un cultivo de *B. megaterium*, se puede usar para modular o, más particularmente, promover el crecimiento de plantas, por ejemplo, cultivos tales como frutas (por ejemplo, fresa), vegetales (por ejemplo, tomate, calabaza, pimiento y berenjena), o cultivos de granos (por ejemplo, soja, trigo, arroz, maíz), árbol, flor, plantas ornamentales, arbustos (por ejemplo, algodón, rosas), planta de bulbo (por ejemplo, cebolla, ajo) o vid (por ejemplo, vid de uva). Las composiciones también se pueden usar para modular la germinación de una semilla(s) en una planta(s).

Las composiciones divulgadas en el presente documento, o producto formulado, se pueden usar solas o en combinación con uno o más de otros componentes como se describe a continuación, tales como agentes promotores del crecimiento y/o agentes antifitopatógenos en una mezcla de tanque o en un programa (aplicación secuencial llamada rotación) con un orden predeterminado e intervalo de aplicación durante la temporada de crecimiento. Cuando se usa en combinación con los productos mencionados anteriormente, a una concentración inferior a la recomendada en la etiqueta del producto, la eficacia combinada de los dos o más productos (uno de los cuales es la composición divulgada en el presente documento) es, en determinadas realizaciones, mayor que la suma del efecto de cada componente individual. Por lo tanto, el efecto se ve reforzado por la sinergia entre estos dos (o más) productos, y se reduce el riesgo de desarrollar resistencia a los plaguicidas entre las cepas patógenas de las plantas.

La composición se puede aplicar mediante inmersión de raíz en el trasplante, específicamente tratando una fruta o verdura con la composición sumergiendo raíces de la fruta o verdura en una suspensión de dicha composición (aproximadamente 0,25 a aproximadamente 1,5 % y más particularmente aproximadamente 0,5 % a aproximadamente 1,0 % en volumen) antes de trasplantar la fruta o verdura en el suelo.

Alternativamente, la composición se puede aplicar mediante goteo u otro sistema de riego. Específicamente, la composición se puede inyectar en un sistema de riego por goteo. En una realización particular, la composición se aplica a una concentración de 1×10^8 UFC/ml en un volumen de aproximadamente 11 a aproximadamente 4 cuartos por 4.046,86 m²(1 acre).

En otra realización más, la composición se puede añadir como una aplicación en surco. Específicamente, la composición se puede añadir como un aerosol en el surco en la siembra usando boquillas calibradas para administrar

una producción total de $1,8708 \times 10^{-6} - 5,6124 \times 10^{-6} \text{ m}^3/\text{m}^2$ (2-6 galones/acre). Las boquillas se colocan en el abridor de surcos en la sembradora para que la aplicación de plaguicidas y la caída de semillas en el surco sean simultáneas.

Las mezclas de las composiciones divulgadas con, por ejemplo, un adyuvante sólido o líquido se preparan de manera conocida. Por ejemplo, las mezclas se pueden preparar mezclando y/o moliendo homogéneamente los principios activos con expansores tales como disolventes, vehículos sólidos y, cuando sea adecuado, compuestos tensioactivos (tensioactivos). Las composiciones también pueden contener ingredientes adicionales tales como estabilizadores, reguladores de la viscosidad, aglutinantes, adyuvantes, así como fertilizantes u otros principios activos para obtener efectos especiales.

Combinaciones con agentes promotores del crecimiento vegetal

Las composiciones divulgadas en el presente documento se pueden usar en combinación con otros agentes promotores del crecimiento, tales como fertilizantes sintéticos u orgánicos (por ejemplo, fosfato de di-amonio, en forma granular o líquida), tés de compost, extractos de algas marinas, hormonas de crecimiento vegetal tales como IAA (ácido indol acético) utilizado en un tratamiento hormonal de enraizamiento para trasplantes, ya sea solo o en combinación con reguladores del crecimiento de plantas tales como IBA (ácido indol butírico) y NAA (ácido naftaleno acético) y microbios promotores del crecimiento, tales como, por ejemplo, *Bacillus* spp., *Pseudomonads*, *Rhizobia*, y *Trichoderma*.

Tratamientos de semillas

Los tratamientos de semillas incluyen la aplicación de una composición plaguicida, opcionalmente en combinación con otros agentes bioactivos, antagonistas o simbióticos a la superficie de una semilla antes de la siembra. Las toxinas, proteínas y/o compuestos plaguicidas divulgados en el presente documento se pueden aplicar a las semillas como polvos secos, polvos en suspensión o pulverizarse sobre las semillas antes de plantar.

Las composiciones divulgadas en el presente documento se pueden formular para tratamientos de semillas en cualquiera de los siguientes modos: polvo seco, polvo en suspensión de agua, solución líquida, concentrado o emulsión fluida, emulsión, microcápsulas, gel o gránulos dispersables en agua.

En el caso de un polvo seco, el principio activo se formula de manera similar a un polvo humectable, pero con la adición de un agente adhesivo, tal como aceite mineral, en lugar de un agente humectante. Por ejemplo, un kg de polvo de talco purificado (esterilizado durante 12 h), 15 g de carbonato de calcio y 10 g de carboximetilcelulosa se mezclan en condiciones asépticas siguiendo el método descrito por Nandakumar et al (2001). Los principios activos se mezclan en una proporción de 1:2,5 (suspensión a mezcla seca) y el producto se seca a la sombra para reducir el contenido de humedad al 20-35 %.

Las composiciones divulgadas en el presente documento también se pueden usar en combinación con agentes de recubrimiento de semillas. Dichos agentes de recubrimiento de semillas incluyen, pero sin limitación, etilenglicol, polietilenglicol, quitosano, carboximetil quitosano, turba, resinas y ceras o fungicidas o bactericidas químicos con un solo sitio, multisitio o modo de acción desconocido.

En realizaciones adicionales, las composiciones divulgadas se pueden aplicar a semillas mediante imbibición de semillas o como un inóculo en polvo.

Agentes antifitopatógenos

Las composiciones divulgadas en el presente documento también se pueden usar en combinación con otros agentes antifitopatógenos, tales como extractos de plantas, bioplaguicidas, protectores de cultivos inorgánicos (tal como cobre), tensioactivos (como ramnolípidos; Gandhi et al., 2007) o aceites naturales tales como aceite parafínico y aceite de árbol de té que posee propiedades plaguicidas o fungicidas o bactericidas químicos con un solo sitio, multisitio o modo de acción desconocido. Tal como se define en el presente documento, un "agente antifitopatógeno" es un agente que modula el crecimiento de un patógeno vegetal, particularmente un patógeno que causa enfermedades transmitidas por el suelo en una planta, o alternativamente previene la infección de una planta mediante un patógeno vegetal. Un patógeno vegetal incluye, pero sin limitación, un hongo, bacteria, actinomiceto o virus.

Como se ha indicado anteriormente, el agente antifitopatógeno puede ser un agente antifúngico de un solo sitio que puede incluir, pero sin limitación, bencimidazol, un inhibidor de la desmetilación (DMI) (por ejemplo, imidazol, piperazina, pirimidina, triazol), morfolina, hidroxipirimidina, anilino pirimidina, fosforotiolato, inhibidor fuera de quinona, quinolina, dicarboximida, carboximida, fenilamida, anilino pirimidina, fenilpirrol, hidrocarburo aromático, ácido cinámico, hidroxianilida, antibiótico, polioxina, acilamina, ftalimida, bencenoide (xililalanina). En una realización más particular, el agente antifúngico es un inhibidor de la desmetilación seleccionado entre el grupo que consiste en imidazol, piperazina, pirimidina y triazol (por ejemplo, bitertanol, miclobutanilo, penconazol, propiconazol, triadimefón, bromuconazol, ciproconazol, diniconazol, fenbuconazol, hexaconazol, tebuconazol, tetraconazol). En una realización más particular, el agente antifúngico es myclobutanil. En otra realización particular más, el agente antifúngico es un

inhibidor externo de quinona (por ejemplo, estrobilurina). La estrobilurina puede incluir, pero sin limitación, azoxiestrobina, kresoxima-metil o trofloxiestrobina. En otra realización particular más, el agente antifúngico es una quinona, por ejemplo, quinoxifeno (4-fluorofenil éter de 5,7-dicloro-4-quinolilo).

5 En otra realización más, el fungicida es un fungicida químico no inorgánico de múltiples sitios seleccionado del grupo que consiste en cloronitrilo, quinoxalina, sulfamida, fosfonato, fosfito, ditiocarbamato, cloralquiltios, fenilpiridina-amina y ciano-acetamida oxima.

10 En otra realización más, el agente antifitopatígeno puede ser estreptomycinina, tetraciclina, oxitetraciclina, cobre o kasugamicina.

Ejemplos

15 La composición y los métodos expuestos anteriormente se ilustrarán adicionalmente en los siguientes Ejemplos no limitantes. Los ejemplos son ilustrativos de varias realizaciones solamente y no limitan la invención reivindicada con respecto a los materiales, afecciones, relaciones en peso, parámetros de proceso y similares citados en el presente documento.

Ejemplo 1: Aislamiento e identificación de los microbios

20 La cepa H491 de *Bacillus megaterium* se aisló del suelo recogido en Kwadaso, Ghana, África. Las cepas M018 y J142 de *Bacillus megaterium* se recuperaron de suelos recolectados en California. Las bacterias se recuperaron de la muestra mediante métodos tradicionales de dilución en placa, como lo describen Lorch et al., 1995. Brevemente, la muestra se resuspendió en agua desionizada estéril. Se prepararon diluciones en serie de la muestra resuspendida en agua estéril. Algunas de estas diluciones se extendieron sobre placas de agar (por ejemplo, agar de dextrosa de patata) y se incubaron en la oscuridad y a temperatura ambiente. Después de varios días de incubación, las colonias se recuperaron de la superficie de la placa de agar.

30 Los aislamientos crecieron como colonias densas, planas, de color crema. Las bacterias aisladas son grampositivas.

Ejemplo 2: Identificación de la cepa H491, cepa J142 y cepa M018 de *Bacillus megaterium* mediante secuenciación de genes *recA* y ARNr

35 Los aislados (H491, J142 y M018) se identificaron como un *Bacillus megaterium* a través de una amplificación de ARNr 16s y una secuenciación adicional del gen *recA* utilizando cebadores bacterianos universales (Cerritos et al., 2008).

40 El crecimiento de una placa de dextrosa de patata de 24 horas se raspó con un asa estéril y se resuspendió en tampón de extracción de ADN. El ADN se extrajo usando el kit de extracción de ADN microbiano Ultra Clean MoBio. Se comprobó la calidad/cantidad del extracto de ADN mediante electroforesis de una alícuota de 5 µl en un gel de agarosa al 1 %.

Secuencias de ARNr

45 Las reacciones de PCR para la amplificación del gen del ARNr 16S se establecieron combinando 2 ml del extracto de ADN limpio con 25 µl de GoTaq Green Mastermix, 1,5 µl de cebador directo (cebador 27F; 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3' (SEQ ID NO:10)), 1,5 µl de cebador inverso (cebador 1525R; 5'-AAGGAGGTGWTCCARCC -3' (SEQ ID NO:11)). El volumen de reacción se realizó hasta 50 µl usando agua estéril libre de nucleasas. La reacción de PCR se realizó en una máquina termocicladora en las siguientes condiciones: 10 minutos a 95 °C (desnaturalización inicial), 30 ciclos de 45 segundos a 94 °C, 45 segundos a 55 °C y 2 minutos a 72 °C, seguido de 5 minutos a 72 °C (extensión final) y una temperatura de mantenimiento final de 10 °C.

El tamaño, la calidad y la cantidad del producto de PCR se evaluaron mediante electroforesis de una alícuota de 5 µl en un gel de agarosa al 1 % y comparación de la banda del producto con una escala de masa.

55 El exceso de cebadores, nucleótidos, enzima y plantilla se eliminaron del producto de PCR usando el kit de limpieza MoBio PCR. El producto de PCR limpio se sometió a secuenciación directa usando los cebadores descritos anteriormente.

60 Las secuencias directa (27F, SEQ ID NO: 1) e inversa (1525R, SEQ ID NO: 2) se alinearon usando el programa informático BioEdit, y se creó una secuencia consenso de 1451 pb (véase la SEQ ID NO: 3, *infra*). La secuencia consenso del gen del ARNr 16S de la cepa H491 se comparó con las secuencias 16S bacterianas representativas disponibles usando BLAST. Para la cepa H491, la coincidencia más cercana fue con *Bacillus megaterium* (número de registro de GenBank CP001983.1), con un 99 % de similitud.

65 Secuencia 27F (SEQ ID NO: 1):

ES 2 773 957 T3

NNNNNNNNNGNNNGCTATAATGCAAGTCGAGCGAACTGATTAGAAGCTTGCTT
CTATGACGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCTGTAAG
ACTGGGATAACTTCGGGAAACCGAAGCTAATACCGGATAGGATCTTCTCCTTCA
TGGGAGATGATTGAAAGATGGTTTTCGGCTATCACTTACAGATGGGCCCGCGGTG
CATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCATAGCCGAC
CTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGG
GAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGC
CGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACA
AGTACAAGAGTAACTGCTTGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCT
AACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAAT
TATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCAC
GGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAACCTTGAGTGCAGAAGAGAA
AAGCGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCA
GTGGCGAAGGCGGCTTTTTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGG
GGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTA
AGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCG
CCTGGGGAGTACNGGTTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCNCG
CACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTGGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCA
GGTCTTGACATCCTCTGACAACTCTNNGATAGAGCGTTCCCCTTNNGGGACAGA
GTGACAGGTGGNGCATGGGTTGTCTGTCAGCTCNTGTCGTGAGATNNTGGGTAA
GTCCCGCAACGAGCGCAACNTTGATCTANNNCAGCATTANNNGGNANTCTN
NNNGACTGCNGNTGANNACCGNAGAAAGNTGGGGATGACNN

Secuencia 1525R (SEQ ID NO: 2):

NNNNNNNNNNNNNNNNCGACTTCaCCCCAATCATCTGTCCCACCTTAGGCGGCTA
 GCTCCTTACGGTTACTCCACCGACTTCGGGTGTTACAAACTCTCGTGGTGTGAC
 GGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGAACGTATTCACCGCGGCATGCTGATCCGCG
 ATTACTAGCGATTCCAGCTTCATGTAGGCGAGTTGCAGCCTACAATCCGAAC TG
 AGAATGGTTTTATGGGATTGGCTTGACCTCGCGGTCTTGCAGCCCTTTGTACCAT
 CCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCA
 TCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACCGGCAGTCACCTTAGAGTGCCCAACTGAAT
 GCTGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTC
 ACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTCTGTCCCCGAAGG
 GGAACGCTCTATCTCTAGAGTTGTGAGAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTT
 CGCGTTGCTTCGAATTAACACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAA
 TTCCTTTGAGTTTCAGTCTTGCACCGTACTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGT
 TAGCTGCAGCACTAAAGGGCGGAAACCCTCTAACACTTAGCACTCATCGTTTAC
 GCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCTCCCACGCTTTCGCGCCTCA
 GCGTCAGTTACAGACCAAAAAGCCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCACATCTC
 TACGCATTTACCGCTACACGTGGAATTCCGCTTTTCTCTTCTGCACTCAAGTTC
 CCCAGTTTCCAATGACCCTCCACGGTTGAGCCGTGGGCTTTCACATCANACTTA
 ANAAACCGCCTGCGCGCGCTTTACGCCAATAATTNCNGATAACGCTTGNCACC
 TACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTANNTAGCCGNGGNTTCTGGTTAGGTA
 CNGTCNNGGTACAAGCANNTACTCTNNACTNNNNNTTNCNTAACANANANTTTA
 CGACCCGAANNCNTCNTCACTCANGCGCNTNGCTCNNNCAGANTNTNNNNN

Secuencia consenso (SEQ ID NO: 3):

ATAATGCAAGTCGAGCGAACTGATTAGAAGCTTGCTTCTATGACGTTAGCGGCG
 GACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTTCGGG
 AAACCGAAGCTAATACCGGATAGGATCTTCTCCTTCATGGGAGATGATTGAAAG
 ATGGTTTCGGCTATCACTTACAGATGGGCCCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGA
 GGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGC
 CACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAA
 TCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGG
 CTTTCGGGTGTA AAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACAAGAGTAACTGC
 TTGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGC
 CGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGC

GCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGG
 GTCATTGGAAACTGGGGAACCTTGAGTGCAGAAGAGAAAAGCGGAATTCCACGT
 GTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTT
 TTTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTA
 GATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTC
 CGCCCTTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACNGGT
 CGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCA
 TGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTG
 ACAACTCTAGAGATAGAGCGTTCCCCTTCGGGGGACAGAGTGACAGGTGGTGC
 ATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCG
 CAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCG
 GTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGA
 CCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAAAGGGCTGCAAGACCGCGA
 GGTCAAGCCAATCCATAAAAACCATTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCG
 CCTACATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAAT
 ACGTTCGGGGCCTTGTACACACCGCCCGTACACCACGAGAGTTTGTAAACACC
 CGAAGTCGGTGGAGTAACCGTAAGGAGCTAGCCGCCTAAGGTGGGACAGATGA
 TTGGGGTG

5 Para la cepa M018, se encontró que la coincidencia más cercana era la cepa PSB55 de *Bacillus megaterium* (número de registro de GenBank HQ242768), con una coincidencia del 99 %. La identificación se realizó como se describe para la cepa H491 anterior.

Secuencia M018 FD1 (SEQ ID NO: 4)

GCTATAcTGCAAGTCGAGCGAACTGATAGAAGCTTGCTTCTATGACGTTGCGGC
 GGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTTCGG
 GAAACCGAAGCTAATACCGGATAGGATCTTCTCCTTCATGGGAGATGATTGAAA
 GATGGTTTTCGGCTATCACTTACAGATGGGCCCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTG
 AGGTAACGGCTACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGCATCGG
 CCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGA
 ATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAG
 GCTTTCGGGTGCGTAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACAAGAGTAACTG
 CTTGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAG
 CCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCG

ES 2 773 957 T3

CGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGG
GTCATTGGAAACTGGGGAACCTTGAGTGCAGAAGAGAAAAGCGGAATTCCACGT
GTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTT
TTTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTA
GATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCC
GCCCTTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCG
CAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATG
TGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGAC
AACTCTAGAGATAGAGCGTTCCCCTTCGGGGGACAGAGTGACAGGTGGTGCAT
GGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGC
AACCCTTTGATCTTAGTTGCCAGCATTTAGTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGG
TGACAACGAGAAGGTGGGGATGACGTGGAATCATCATGCCCTTAKGACCTGG
GGCTWCACAMCGKTGCYWACAAGGAATTGGTTAC

Secuencia M018 RD1 (SEQ ID NO: 5):

TGTTACGACTTCACCCCAATCATCTGTCCCACCTTAGGGCGGCTAGCTCCTTACGG
TTACTCCACCGACTTCGGGTGTTACAAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGT
ACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACYAGCGA
TTCTGCTTCATGTAGGCKAGTTGCAGCCTACAATCCGAACTGAGAATGGTTTT
ATGGGATTGGCTTGACCTCGCGGTCTTGCAGCCCTTTGTACCATCCATTGTAGCA
CGTGTGTAGCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTC
CTCCGGTTTTGTCACCGGCAGTCACCTTAGAGTGCCCAACTAAATGCTGGCAACT
AAGATCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGA
GCTGACGACMACCATGCACCACCTGTCACTCTGTCCCCGAAGGGGAACGCTCT
ATCTCTAGAGTTGTCAGAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTT
CGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAG
TTTCAGTCTTGCGACCGTACTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCAG
CACTAAAGGGCGGAAACCCTCTAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGAC
TACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCCCCACGCTTTCGCGCCTCAGCGTCAGTT
ACAGACCAAAAAGCCGCCTTCGCCACTGGTGTTCTCCACATCTCTACGCATTT
CACCGCTACACGTGGAAATCCGCTTTTCTCTTCTGCACTCAAGTTCCCCAGTTTC
CAATGACCCTCCACGGTTGAGCCGTGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAACCGC
CTGCGCGCGCTTACGCCCAATAATTCAGATAACGCTCGCCACCTACGTATTAC
CGCGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTAGTACCGTCAGTACAG

CAGTACTCTGTACTTGTTCTTCTTAACAACAGAGTTTACGACCCGAAAGCCTTC
ATCATTC

Secuencia consenso M018 (SEQ ID NO: 6)

GCTATACTGCAAGTCGAGCGAACTGATAGAAGCTTGCTTCTATGACGTTGCGGC
 GGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTTCGG
 GAAACCGAAGCTAATACCGGATAGGATCTTCTCCTTCATGGGAGATGATTGAAA
 GATGGTTTTCGGCTATCACTTACAGATGGGCCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTG
 AGGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGG
 CCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGA
 ATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAG
 GCTTTCGGGTTCGTA AAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACAAGAGTAACTG
 CTTGTACCTTGACGGTACCTAACCCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAG
 CCGCGGTAATACGTAGGTGGCRAGCGTTATCYGGAATTATTGGGCGTAAAGCG
 CGCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGG
 GTCATTGGAAACTGGGGA ACTTGAGTGCAGAAGAGAAAAGCGGAWTTCACGT
 GTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTT
 TTTGGTCTGTA ACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTA
 GATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTC
 CGCCCTTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTC
 GCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCAT
 GTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGA
 CAACTCTAGAGATAGAGCGTTCCCCTTCGGGGGACAGAGTGACAGGTGGTGCA
 TGGTKGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCC GCAACGAGCGC
 AACCCCTGATCTTAGTTGCCAGCATTTAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGG
 TGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGAC
 CTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAAAGGGCTGCAAGACCGCGAG
 GTCAAGCCAATCCCATAAAACCATTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTMGC
 CTACATGAAGCAGGAATCGCTRGTAAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATA
 CGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAAACACC
 GAAGTCGGTGGAGTAACCGTAAGGAGCTAGCCGCCTAAGGTGGGACAGATGAT
 TGGGGTGAAGTCGTAACA

Para la cepa J142, la coincidencia más cercana fue para la cepa ZFJ-14 de *Bacillus megaterium*. La identificación se realizó como se describe para la cepa H491 anterior.

5

Secuencia J142 FD1 (SEQ ID NO: 7):

TGCTATAATGCAGTCGAGCGAACTGATTAGAAGCTTGCTTCTATGACGTTAGCG
 GCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTTC
 GGGAAACCGAAGCTAATACCGGATAGGATCTTCTCCTTCATGGGGGATGATTGA
 AAGATGGTTTTCGGCTATCACTTACAGATGGGCCCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGG
 TGAGGTAACGGCTCACCAAGGCMACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATC
 GGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGG
 GAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGA
 AGGCTTTCGGGTCGTAAAACCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACRAGAGTAA
 CTGCTTGTACCTTGACGGTACCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAG
 CAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAA
 GCGCGCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGG
 AGGGTCATTGGAACTGGGGAACCTTGAGTGCAGAAGAGAAAAGCGGAATTCCA
 CGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGG
 CTTTTTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGA
 TTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGT
 TTCCGCCCTTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACG
 GTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAG
 CATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCT
 GACACTCTAGAGATAGAGCGTTCCTTTCGGGGGACAGAGTGACAGTGTGCAT
 GGTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTGGGTAGTCCCGCACGAGCGCACCTGA
 TCTAGTGCAGCATTAGTGGCACTCTAGTGACTGCGTGACACGAGGAGGTGGGAT
 GACGTCATCATCATGCCCTATGACTGGGCTACCACGTGCTACATGGATGTCAA
 GGCTGCAGACCGAAGTCAGCAATCATAAACATTCTCAGTCGAATGTAAGTCA

Secuencia J142 RD1 (SEQ ID NO: 8):

CTTGTTGACTTCCCCCAATCATCTGTCCCACCTTAGGCGGCTAGCTCCTTACGG
 TTACTCCACCGACTTCGGGTGTTACAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGT
 ACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGAT
 TCCAGCTTCATGTAGGCGAGTTGCAGCCTACAATCCGAACTGAGAATGGTTTTA
 TGGGATTGGCTTGACCTCGCGGTCTTGCAGCCCTTTGTACCATCCATTGTAGCAC

ES 2 773 957 T3

GTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCC
TCCGGTTTGTACCCGGCAGTCACCTTAGAGTGCCCAACTAAATGCTGGCAACTA
AGATCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGC
TGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTCTGTCCCCGAAGGGGAACGCTCTAT
CTCTAGAGTTGTCAGAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCG
AATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCGTCAATTCTTTGAGTTT
CAGTCTTGCGACCGTACTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCAGCAC
TAAAGGGCGGAAACCCTCTAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTAC
CAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCTCCCCACGCTTTCGCGCCTCAGCGTCAGTTACA
GACCAAAAAGCCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCCTCCACATCTCTACGCATTTAC
CGCTACACGTGGAATTCCGCTTTTCTCTTCTGCACTCAAGTTCCCCAGTTTCCAA
TGACCCTCCACGGTTGAGCCGTGGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAACCGCCT
GCGCGCGCTTACGCCCAATAATTCCCGGATAACGCTTGCCACCTACGTATTAC
CGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTCTGGTTAGGTACCGTCGAGGT
ACAAGCAGTTACTCTCGTACTTGTCTTCCCTAACACAGAGTTTTACGACCCGAA
GCTCATCACTCAGCGCGTGCTCGTCGACTTCGTCATTGCGAGATCCCTACTGCTG
CTTCCGTAGGAGTCTGGACCTGTCTCAGTCAGGTGTGACGGATCACCTCTTCA
GTCGCCTATGTGCCACTCTCGTGGGTCCCG

Secuencia consenso J142 (SEQ ID NO: 9)

TGCTATAATGCAGTCGAGCGAACTGATTAGAAGCTTGCTTCTATGACGTTAGCG
 GCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTTC
 GGGAAACCGAAGCTAATACCGGATAGGATCTTCTCCTTCATGGGGGATGATTGA
 AAGATGGTTTCGGCTATCACTTACAGATGGGCCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGG
 TGAGGTAACGGCTACCAAGGCMACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGTATC
 GGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGG
 GAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGA
 AGGCTTTCGGGTCGTAAAACCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACGAGAGTAA
 CTGCTTGTACCTYGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAG
 CAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGGAATTATTGGGCGTAA
 AGCGCGCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCACGGCTCAACCGT
 GGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAACCTTGAGTGCAGAAGAGAAAAGCGGAATTC
 CACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGC
 GGCTTTTTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAG
 GATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGG
 GTTCCCGCCCTTATAGTGTGCTGACGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTA
 CGGTGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAGCGGTGG
 AGCATGTGGTTTAATTGGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCC
 TCTGACAACTCTAGAGATAGAGCGTTCCCCTTCGGGGGACAGAGTGACAGGTG
 GTGCATGGTTGTGCTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACG
 AGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTTAGTTGGGCACTCTAAGGTGACT
 GCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTT
 ATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAAAGGGCTGCAAGACC
 GCGAGGTCAAGCCAATCCATAAAACCATTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAA
 CTCGCTACATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTG
 AATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAAC
 ACCCGAAGTCGGTGGAGTAACCGTAAGGAGCTAGCCGCCTAAGGTGGGACAGA
 TGATTGGGGGAAGTCGAACAAG

secuencias recA

- 5 Las reacciones de PCR para la amplificación del gen *recA* se establecieron combinando 2 µl del extracto de ADN limpio con 25 µl de GoTaq Green Mastermix, 1,5 µl de cebador directo (*recAf*, 5'-GATCGTCARGCAGSCYTGWGAT -3', SEQ ID NO:12), y 1,5 µl de cebador inverso (*recAr*, 5'-TTWCCRACCATAACSCCRAC -3', SEQ ID NO:13). El volumen de reacción se llevó hasta 50 µl usando agua estéril libre de nucleasas. La reacción de PCR se realizó en una máquina termocicladora en las siguientes condiciones: 5 minutos a 95 °C (desnaturalización inicial), 30 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 30 segundos a 45 °C y 1 minuto a 72 °C, seguido de 5 minutos a 72 °C (extensión final) y una temperatura de mantenimiento final de 4 °C.
- 10

El tamaño, la calidad y la cantidad del producto de PCR se evaluaron ejecutando una alícuota de 5 µl en un gel de agarosa al 1 % y comparando la banda del producto con una escala de masa.

El exceso de cebadores, nucleótidos, enzima y plantilla se eliminaron del producto de PCR usando el kit de limpieza MoBio PCR. El producto de PCR limpio se sometió a secuenciación directa usando los cebadores descritos anteriormente.

5 Las secuencias directa e inversa se alinearon usando el programa informático BioEdit, y se creó una secuencia consenso de 505 pb.

10 La secuencia de consenso del gen *recA* de cada cepa (H491, J142 y M018) se comparó con secuencias bacterianas representativas usando BLAST. La coincidencia de especies más cercana fue al genoma completo de *Bacillus megaterium* (número de registro CP001982.1) con un 99 % de similitud.

Secuencia directa H491 *recA* (SEQ ID NO: 14):

TGAAAGCATTGGTAAGGTTCAATTATGAAATTAGGTGAACAAACGGAA
 AAAAGAATTTCTACAATTCCAAGTGGTTCATTGGCGTTAGATATAGCCTTAGGT
 GTAGGTGGATATCCACGTGGACGTGTAGTTGAAGTATATGGTCCAGAAAGCTCA
 GGTAACAACAGTTGCTCTTCATGCGATTGCAGAAGTTCAACAGCAGGGCGG
 ACAGGCTGCATTTATCGATGCGGAGCACGCGTTAGATCCTGTATATGCTCAAAA
 ATTAGGTGTGAATATTGATGAGCTATTATTATCTCAGCCTGATACGGGAGAACA
 AGCTTTAGAAATCGCTGAAGCTTTAGTTGAAGCGGTGCAGTAGATATTATCGT
 TGTTGACTCAGTAGCAGCATTAGTGCCAAAAGCGGAAATTGAAGGAGAAATGG
 GAGACTCTCACGTGGGTCTACAAGCTCGTTTAATGTCTCAAGCATTGCGTAAAC
 TATCTGGAGCTATCAATAAGTCTAAAACAATCGCTATCTTTATTAACCAAATTC
 15 GTGAAAAAGTCGGCGTTnGGGTCGGAAAA

Secuencia inversa H491 *recA* (SEQ ID NO: 15):

GWAGCGATTGTTTTAGACTTATTGATAGCTCCAGATAGTTTACGCAATGC
 TTGAGACATTAACKAGCTTGTAGACCCACGTGAGAGTCTCCATTTCTCCTTC
 AATTTCCGCTTTTGGCACTAATGCTGCTACTGAGTCAACAACGATAATATCTACT
 GCACCGCTTCGAACTAAAGCTTCAGCGATTTCTAAAGCTTGTTCTCCCGTATCA
 GGCTGAGATAATAATAGCTCATCAATATCACACCTAATTTTTGAGCATATACA
 GGATCTAACGCGTGCTCCGCATCGATAAATGCAGCCTGTCCGCCCTGCTGTTGA
 ACTTCTGCAATCGCATGAAGAGCAACTGTTGTTTTACCTGAGCTTTCTGGACCAT
 ATACTTCAACTACACGTCCACGTGGATATCCACCTACACCTAAGGCTATATCTA
 ACGCCAATGAACCACTTGAATTGTAGAAATCTTTTTTCCGTTTGTTTCACCTAA
 TTTCATAATTGAACCTTTACCAAATTGCTTTTCAATTTGTTTTAAAGCCATATCW
 20 AAGCCTGCWWWGACGATC

Secuencia consenso H491 (SEQ ID NO:16):

AAGGTTCAATTATGAAATTAGGTGAACAAACGGAAAAAGAATTTCTAC
AATTCCAAGTGGTTCATTGGCGTTAGATATAGCCTTAGGTGTAGGTGGATATCC
ACGTGGACGTGTAGTTGAAGTATATGGTCCAGAAAGCTCAGGTAAAACAACAG
TTGCTCTTCATGCGATTGCAGAAGTTCAACAGCAGGGCGGACAGGCTGCATTTA
TCGATGCGGAGCACGCGTTAGATCCTGTATATGCTCAAAAATTAGGTGTGAATA
TTGATGAGCTATTATTATCTCAGCCTGATACGGGAGAACAAGCTTTAGAAATCG
CTGAAGCTTTAGTTCGAAGCGGTGCAGTAGATATTATCGTTGTTGACTCAGTAG
CAGCATTAGTGCCAAAAGCGGAAATTGAAGGAGAAATGGGAGACTCTCACGTG
GGTCTACAAGCTCGTTTAATGTCTCAAGCATTGCGTAAACTATCTGGAGCTATC
AATAAGTCTAAAACAATCGCT

M018: secuenciación génica *recA*

5 Secuencia directa M018 *recA* (SEQ ID NO: 17):

TTGAAGCATTGGTAAAGGTTCAATTATGAAATTAGGTGAACAAACGGA
AAAAAGAATTTCTACAATTCCAAGTGGTTCATTAGCGTTAGATATAGCTTTAGG
TGTAGGTGGATATCCACGTGGACGCGTAGTTGAAGTATATGGTCCAGAAAGCTC
AGGTAAAACAACAGTTGCTCTTCATGCGATTGCAGAAGTTCAACAGCAGGGCG
GACAGGCTGCATTTATCGATGCGGAGCACGCGTTAGATCCTGTATATGCTCAAA
AATTAGGTGTGAATATTGATGAGCTATTATTATCTCAGCCTGATACGGGAGAAC
AAGCTTTAGAAATCGCTGAAGCTTTAGTTCGAAGCGGTGCAGTAGATATTATCG
TTGTTGACTCAGTAGCAGCATTAGTGCCAAAAGCGGAAATTGAAGGAGAAATG
GGAGACTCTCACGTGGGTCTACAAGCTCGTTTAATGTCTCAAGCATTGCGTAAA
CTATCTGGAGCTATCAACAAGTCTAAAACAATCGCTATCTTTATTAACCAAATT
CGTGAAAAAGTCGGCGTTnGGGTTCGGAAAA

10 Secuencia inversa M018 *recA* (SEQ ID NO: 18):

GGTATAAAGATAGGCGATTGTTTTAGACTTGTTGATAGCTCCAGATAGTT
TACGCAATGCTTGAGACATTAACgAGCTTGTAGACCCACGTGAGAGTCTCCA
TTTCTCCTTCAATTTCCGCTTTTGGCACTAATGCTGCTACTGAGTCAACAACGAT
AATATCTACTGCACCGCTTCGAACTAAAGCTTCAGCGATTTCTAAAGCTTGTTCT
CCCGTATCAGGCTGAGATAATAATAGCTCATCAATATTCACACCTAATTTTTGA
GCATATACAGGATCTAACGCGTGCTCCGCATCGATAAATGCAGCCTGTCCGCCC
TGCTGTTGAACTTCTGCAATCGCATGAAGAGCAACTGTTGTTTTACCTGAGCTTT
CTGGACCATATACTTCAACTACGCGTCCACGTGGATATCCACCTACACCTAAAG
CTATATCTAACGCTAATGAACCACTTGAATTGTAGAAATCTTTTTTCCGTTTG
TTCACCTAATTTCATAATTGAACCTTTACCAAATTGCTTTTCAATTTGTTTTAAA
GCCATATCWAAGCCTAAWWRGACGATCYA

Secuencia consenso (SEQ ID NO: 19):

AAGGTTCAATTATGAAATTAGGTGAACAAACGGAAAAAGAATTTCTAC
AATCCAAGTGGTTCATTAGCGTTAGATATAGCTTTAGGTGTAGGTGGATATCC
ACGTGGACGCGTAGTTGAAGTATATGGTCCAGAAAGCTCAGGTAAAACAACAG
TTGCTCTTCATGCGATTGCAGAAGTTCAACAGCAGGGCGGACAGGCTGCATTTA
TCGATGCGGAGCACGCGTTAGATCCTGTATATGCTCAAAAATTAGGTGTGAATA
TTGATGAGCTATTATTATCTCAGCCTGATACGGGAGAACAAGCTTTAGAAATCG
CTGAAGCTTTAGTTCGAAGCGGTGCAGTAGATATTATCGTTGTTGACTCAGTAG
CAGCATTAGTGCCAAAAGCGGAAATTGAAGGAGAAATGGGAGACTCTCACGTG
GGTCTACAAGCTCGTTTAATGTCTCAAGCATTGCGTAAACTATCTGGAGCTATC
AACAAGTCTAAAACAATCG

5

J142: secuenciación génica *recA*

Secuencia directa J142 *recA* (SEQ ID NO: 20):

10

GAAAGCATTGGTAAGGTTCAATTATGAAATTAGGTGAACAAACGGAAA
AAAGAATTTCTACAATTCCAAGTGGTTCATTAGCGTTAGATATAGCCTTAGGTG
TAGGTGGATATCCACGTGGACGTGTAGTTGAAGTATATGGTCCAGAAAGCTCAG
GTAAAACAACAGTTGCTCTTCATGCGATTGCAGAAGTTCAACAGCAGGGCGGA
CAGGCTGCATTTATCGATGCGGAGCACGCGTTAGATCCTGTATATGCTCAAAA
TTAGGTGTGAATATTGATGAGCTATTATTATCTCAGCCTGATACGGGAGAACAA
GCTTTAGAAATCGCTGAAGCTTTAGTTCTGAAGCGGTGCAGTAGATATTATCGTT
GTTGACTCAGTAGCAGCATTAGTGCCAAAAGCGGAAATTGAAGGAGAAATGGG
AGACTCTCACGTGGGTCTACAAGCTCGTTTAATGTCTCAAGCATTGCGTAAACT
ATCTGGAGCTATCAATAAGTCTAAAACAATCGCTATCTTTATTAACCAAATTCG
TGAAAAGTCGGCGTTnGGGTTCGGAAA

Secuencia inversa J142 recA (SEQ ID NO: 21):

AGCGATTGTTTTAGACTTATTGATAGCTCCAGATAGTTTACGCAATGCTT
GAGACATTAACGAGCTTGTAGACCCACGTGAGAGTCTCCATTTCTCCTTCAA
TTTCCGCTTTTGGCACTAATGCTGCTACTGAGTCAACAACGATAAATCTACTGC
ACCGCTTCGAACTAAAGCTTCAGCGATTTCTAAAGCTTGTTCTCCCGTATCAGG
CTGAGATAAATAAGCTCATCAATATTCACACCTAATTTTTGAGCATATACAGG
ATCTAACGCGTGCTCCGCATCGATAAATGCAGCCTGTCCGCCCTGCTGTTGAAC
TTCTGCAATCGCATGAAGAGCAACTGTTGTTTTACCTGAGCTTTCTGGACCATAT
ACTTCAACTACACGTCCACGTGGATATCCACCTACACCTAAGGCTATATCTAAC
GCTAATGAACCACTTGGAATTGTAGAAATTCTTTTTTCCGTTTGTTTCACCTAATT
TCATAATTGAACCTTTACCAAATTGCTTTTCAATTTGTTTTAAAGCCATATCAAA
GCCTGCTRAACRATCAA

5

Secuencia consenso (SEQ ID NO: 22):

AAGGTTCAATTATGAAATTAGGTGAACAAACGGAAAAAAGAATTTCTAC
 AATTCCAAGTGGTTCATTAGCGTTAGATATAGCCTTAGGTGTAGGTGGATATCC
 ACGTGGACGTGTAGTTGAAGTATATGGTCCAGAAAGCTCAGGTAAAACAACAG
 TTGCTCTTCATGCGATTGCAGAAGTTCAACAGCAGGGCGGACAGGCTGCATTTA
 TCGATGCGGAGCACGCGTTAGATCCTGTATATGCTCAAAAATTAGGTGTGAATA
 TTGATGAGCTATTATTATCTCAGCCTGATACGGGAGAACAAGCTTTAGAAATCG
 CTGAAGCTTTAGTTCGAAGCGGTGCAGTAGATATTATCGTTGTTGACTCAGTAG
 CAGCATTAGTGCCAAAAGCGGAAATTGAAGGAGAAATGGGAGACTCTCACGTG
 GGTCTACAAGCTCGTTTAATGTCTCAAGCATTGCGTAAACTATCTGGAGCTATC
 AATAAGTCTAAAACAATCGCT

Todos los aislados fueron 99-100 % coincidentes con *Bacillus megaterium* DSM319, así como con otras cepas de *Bacillus megaterium*. Estos resultados confirman la identidad de los tres aislados como *Bacillus megaterium*.

5

Ejemplo 3: Caracterización bioquímica de *B. megaterium* H491

Se determinó que la cepa H491 de *Bacillus megaterium* era grampositiva, ureasa positiva, catalasa positiva, oxidasa negativa y lipasa positiva. Se realizó una caracterización bioquímica exhaustiva del aislado utilizando micromatrices fenotípicas de Biolog. La micromatriz fenotípica completa de Biolog consta de veinte placas de 96 pocillos, conteniendo cada pocillo una fuente diferente de carbono, nitrógeno, fósforo u otra fuente de nutrientes. Algunas de las placas también contienen diferentes antibióticos, metales, etc., para evaluar la susceptibilidad del aislado. Las lecturas de absorbancia de los pocillos en cada placa se compararon con un pocillo de control negativo. Las lecturas de absorbancia por encima del umbral de control negativo indicaron el crecimiento del aislado bajo las condiciones en un pocillo particular, mientras que la lectura en o por debajo del control negativo indicó que el aislado no pudo prosperar bajo las condiciones específicas de ese pocillo. La prueba se realizó para H491 a 25 °C, con placas duplicadas para cada prueba de fenotipo.

10

15

La cepa H491 de *B. megaterium* fue capaz de utilizar los siguientes hidratos de carbono, ácidos orgánicos y péptidos como fuentes de carbono: L-Arabinosa, N-acetil D-glucosamina, D-galactosa, ácido L-aspartico, L-prolina, D-trehalosa, galactitol, glicerol, ácido D-glucurónico, ácido D-glucónico, D-xilosa, ácido L-láctico, D-manitol, ácido L-glutámico, D-Glucosa-6-Fosfato, ácido D-galactónico-g-lactona, ácido D,L-málico, D-ribosa, D-fructosa, a-D-Glucosa, maltosa, D-Melibiosa, timidina, L-asparagina, ácido D-aspartico, ácido a-cetoglutárico, sacarosa, L-glutamina, maltotriosa, ácido cítrico, ácido fumárico, Ácido bromosuccínico, L-alanina, Ala-Gly, metilpiruvato, ácido L-málico, L-Lixosa, ácido pirúvico, dextrina, glucógeno, D-arabinosa, arbutina, 2-desoxi-D-ribosa, 3-O-b-D-Galactopiranosil-D-Arabinosa, gentiobiosa, palatinosa, D-rafinosa, salicina, estaquirosa, D-tagatosa, turanosa, ácido g-amino-N-butírico, D-glucosamina, ácido b-hidroxibutírico, Ácido 5-ceto-D-glucónico, ácido quínico, ácido D-tartárico, ácido L-tartárico, L-ornitina, ácido L-piroglutámico y dihidroxiacetona.

20

25

30

Los siguientes sustratos no se utilizaron como fuentes de carbono, como lo demuestran las lecturas de absorbancia por debajo del umbral de control negativo: ácido D-sacárico, D-serina, D-sorbitol, L-fucosa, D,L-a-glicerol fosfato, L-ramnosa, ácido D-glucosamínico, 1,2-propanodiol, ácido a-cetobutírico, a-D-lactosa, D-Glucosa-1-Fosfato, ácido a-hidroxiglutarico-g-lactona, ácido a-hidroxibutírico, Adonitol, 2'-desoxiadenosina, adenosina, D-treonina, ácido propiónico, ácido mícico, ácido glicólico, ácido tricarbálico, L-treonina, N-acetil-D-Manosamina, ácido D-málico, Gly-Pro, ácido L-galactónico-g-lactona, Sulfato de condroitina C, a-ciclodextrina, inulina, laminarina, manano, N-acetil-D-galactosamina, Ácido N-acetil-neuramínico, b-D-alosa, amigdalina, D-arabitol, L-arabitol, i-eritritol, D-fucosa, L-glucosa, D-lactitol, b-metil-D-galactósido, 3-metilglucosa, ácido b-metil-D-glucurónico, a-metil-D-manósido, Sedoheptulosa, L-sorbosa, xilitol, N-acetil-D-glucosaminitol, ácido d-aminovalérico, ácido cáprico, ácido caproico, ácido citracónico, ácido citramálico, ácido 2-hidroxibenzoico, ácido 4-hidroxibenzoico, ácido a-cetovalérico, ácido itacónico, éter metílico del ácido D-láctico, ácido malónico, ácido melibiónico, ácido oxálico, D-ribono-1,4-lactona, ácido sebácico, ácido sórbico, ácido succinámico, acetamida, L-alaninamida, ácido N-acetil-L-glutámico, Glicina, L-Homoserina, hidroxil-L-prolina, L-isoleucina, L-leucina, L-lisina, L-fenilalanina, L-valina, D,L-Carnitina, sec-butilamina, D, L-Octopamina, 2,3-butanodiol, 2,3-butanodiona y 3-hidroxi-2-butanona.

35

40

45

La H491 fue capaz de utilizar los siguientes aminoácidos como fuentes de nitrógeno: L-glutamina, ácido L-piroglutámico, ácido L-glutámico, L-asparagina, L-ornitina, D-asparagina, L-prolina, ácido L-aspartico, D-alanina, L-arginina, L-alanina, L-serina, ácido D-aspartico, L-triptofano, y L-tirosina. También fue capaz de utilizar urea,

Putrescina, Agmatina, N-acetil D-glucosamina, citidina, guanosina, inosina, xantina, ácido úrico, alantoína, ácido g-amino-N-butírico y ácido a-amino-N-valérico como fuentes de nitrógeno orgánicas adicionales. H491 también podría utilizar amoníaco, nitrito y nitrato como fuentes inorgánicas de nitrógeno.

- 5 H491 fue capaz de utilizar una variedad de sustratos como fuentes de fósforo, incluyendo fosfato, tiofosfato, ditiofosfato, D-glucosamina-6-fosfato, cisteamina-S-fosfato, Uridina 2',3'-monofosfato cíclico y timidina 5'-Monofosfato.

10 El metabolismo de H491 se inhibió por debajo de pH 5, pero se restableció a pH 4,5 en presencia de L-arginina, L-metionina y 5-hidroxi-lisina. Se observó crecimiento entre pH 5 y pH 10. La cepa no toleró NaCl por encima del 5 %, y solo se detectó un ligero crecimiento con NaCl al 4 %. El Manual de Bergey de Bacteriología Sistemática indica que los aislados de *Bacillus megaterium* pueden usar el citrato como única fuente de carbono; la mayoría puede crecer con NaCl al 7 %, pero ninguno con NaCl al 10 %; y la mayoría de las cepas no reducen el nitrato. En cambio, H491 no toleró NaCl por encima del 5 % y fue capaz de utilizar tanto nitrato como nitrito como fuentes de nitrógeno.

15 **Ejemplo 4: Producción de *B. megaterium* H491, M018 y J142 mediante fermentación**

Se produjo un sobrenadante con actividad nematocida a través de la fermentación sumergida de la cepa H491 en condiciones aeróbicas en medio líquido V8. Otros medios adecuados incluyen caldo de soja tréptico, o cualquier medio nutriente que contenga fuentes apropiadas de carbono y nitrógeno.

20 Se inició una placa de semillas mediante siembra en estrías en una placa de agar de dextrosa de patata fresca con una pequeña cantidad de cepa H491, usando un asa estéril. La placa se incubó a 25 °C durante 2-3 días o hasta que se evidenció suficiente biomasa en la superficie de la placa.

25 Un matraz de semillas de medio V8 de 50 ml se inoculó con un asa de material recogido de la superficie de la placa de agar. La semilla se incubó en un agitador a 200 rpm durante 2 días.

30 Se inoculó asépticamente un matraz de vidrio Fernbach no deflectado de 2,8 l que contenía 500 ml de medio V8 con un 2 % de semilla. La fermentación se dejó proceder a 25 °C durante 5 días con agitación constante a 150-200 rpm.

El sobrenadante se obtuvo mediante separación de las células del caldo de fermentación gastado mediante centrifugación u otros medios de separación. La actividad del sobrenadante se verificó mediante medio del bioensayo descrito a continuación.

35 **Ejemplo 5: Caracterización adicional de *B. megaterium* H491, J142 y M018**

Resistencia a antibióticos

40 La susceptibilidad a los antibióticos de las cepas H491, J142 y M018 de *Bacillus megaterium* se probó utilizando discos antibióticos en medio Muller-Hinton como se describe en la hoja de datos técnicos n.º 535 de PML Microbiological. Los resultados obtenidos después de 48 horas de incubación a 25 °C se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1: Susceptibilidad de <i>Bacillus megaterium</i> H491, J142 y M018 a varios antibióticos. El grado de susceptibilidad se indica con +++ (alto), ++ (bastante), + (ligero), y la resistencia se indica mediante (-).				
	Concentración (mg)	H491	J142	M018
Tetraciclina	30	+++	+++	+++
Kanamicina	30	+++	+++	+++
Eritromicina	15	+++	+++	+++
Estreptomicina	10	+++	+++	+
Penicilina	10	+++	-	++
Ampicilina	10	+++	+++	++
Oxitetraciclina	30	+++	+++	+++
Cloranfenicol	30	+++	+++	++
Ciprofloxacino	5	+++	+++	+++
Gentamicina	10	+++	+++	+++
Piperacilina	100	+++	+	++
Cefuroxima	30	+++	+++	+++
Imipenem	10	+++	+++	+++
Sulfametoxazol-Trimetoprima	23,75/25	+++	+++	+++

Sensibilidad química

45 Los datos de sensibilidad química se obtuvieron de la micromatriz fenotípica de Biolog. Se descubrió que H491 es susceptible a los siguientes compuestos: clortetraciclina, lincomicina, Amoxicilina, Cloxacilina, Minociclina,

capreomicina, demeclociclina, Nafcilina, Cefazolina, Enoxacina, ácido nalidíxico, cloranfenicol, Eritromicina, Neomicina, Cefalotina, Kanamicina, Penicilina G, Tetraciclina, Carbenicilina, Oxacilina, Penimepiciclina, Paromomicina, Vancomicina, Sisomicina, Novobiocina, 2,4-diamino-6,7-diisopropilpteridina, Sulfadiazina, Cloruro de bencetonio, Tobramicina, Sulfatiazol, Ácido 5-fluoroorótico, Sulfametoxazol, L-aspártico-b-hidroxamato, Espiramicina, Rifampicina, Bromuro de dodeciltrimetilamonio, Azlocilina, 2,2'-dipiridilo, Monohidrato de 6-mercaptapurina, doxiciclina, Cromato potásico, Cefuroxima, 5-fluorouracilo, rolitetraciclina, Cloruro de cesio, Acetato de talio (I), Cloruro de cobalto (II), Trifluoperazina, Tilosina, Acriflavina, Furalfadona, Cloruro de sanguinarina, Ácido fusárico, Ácido bórico, 1-hidroxipiridina-2-tiona (piritona), Cianato de sodio, Cloruro de cadmio, Ácido yodoacético, Dicromato de sodio, Cefoxitina, Metaborato de sodio, cloranfenicol, Metavanadato de sodio, Cloruro de queleritina, Carbenicilina, Nitrito de sodio, Etilenglicol-bis(b-aminoetiléter)-N,N,N',N'-ácido tetraacético, Prometazina, Ortovanadato sódico, Clorhidrato de guanidina, D-Cicloserina, EDTA, 5,7-dicloro-8-hidroxiquinaldina, 5,7-dicloro-8-hidroxiquinolina, Ácido fusídico, sal de sodio, Monohidrato de 1,10-fenantrolina, Fleomicina, Bromuro de domifeno, Alexidina, 5-nitro-2-furaldehído semicarbazona (nitrofurazona), Viológeno de metilo, Oleandomicina, sal de fosfato, Puromicina, Carbonil-cianuro m-clorofenilhidrazona (CCCP), Azida sódica, Menadiona, bisulfito sódico, 2-Nitroimidazol, Hidroxiurea, 5-cloro-7-yodo-8-hidroxiquinolina, Sulfanilamida, Trimetoprima, Diclofluanida, Sulfato de protamina, Clorodinitrobenzeno, Diamida, Cinoxacina, Estreptomocina, Rifamicina SV, Telurito de potasio, Selenito de sodio, Hidroxamato de glicina, 4-cloro-3,5-dimetilfenol, D-serina, Tiosalicilato, Salicilato, sodio, Sulfacloropiridazina, Oxicarboxina, 3-amino-1,2,4-triazol, Clorpromazina, Niaproof, Compuesto 48/80, Tungstato de sodio, Cloruro de litio, Clorambucilo, Cefamandol nafato, Cefsulodin, Cafeína, Ketoprofeno, Tianfenicol, Trifluorotimidina, Poli-L-lisina, Pentaclorofenol, Arsenito sódico, Lidocaína, Peryodato de sodio, Cloruro de antimonio (III), Clorhidrato de semicarbazida, Tinidazol, 5-fluoro-5'-desoxiuridina, 2-fenilfenol, Plumbagin, Josamicina, Ácido gálico, Cloruro de metiltrioctilamonio, 2,4-dintrofenol, Diacetato de clorhexidina, Ácido trans-cinámico, Disulfuro de tetraetiltiuram, FCCP, ácido D,L-tioctico, Feneticilina, Caprilato sódico, Lauril sulfobetaína (N-dodecil-N,N-dimetil-3-amonio-1-propanosulfonato), Cloruro de hexamina cobalto (III), Polimixina B, Amitriptilina, Apramicina, Orfenadrina, D, L-propanolol, Violeta de tetrazolio, Tioridazina, Atropina, Ornidazol, Proflavina, 18-corona-6 éter, Cristal violeta, Dodina (n-dodecilguanidina), Hexaclorofeno, 4-hidroxicumarina, oxitetraciclina, Pridinol, Captán, Ácido 3,5-dinitrobenzoico, 8-hidroxiquinolina, Patulina, Tolofluanida y Troleandomicina.

Se observó resistencia en los pocillos que contienen los siguientes compuestos con actividad antibacteriana conocida (a una concentración máxima de 4 µg): amikacina, lomefloxacino, bleomicina, colistina, gentamicina, ofloxacino, polimixina B, sulfametazona, espectinomocina, ampicilina y ácido oxolínico.

Ejemplo 6: Composición de ácidos grasos

Después de la incubación durante 24 horas a 28 °C, se recogió un asa de células bien desarrolladas y se prepararon, separaron e identificaron ésteres metílicos de ácidos grasos usando el Sistema de Identificación Microbiana (MIDI) Sherlock como se describe (véase Vandamme et al. 1992). Los ácidos grasos predominantes presentes en las cepas de *Bacillus megaterium* se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2: Composición del éster metílico del ácido graso (FAME) (%) de las diferentes cepas de *Bacillus megaterium* con actividad nematocida.

FAME	M018	J142	H491
14:0i	4,77	6,05	6,36
14:0	1,33	1,65	1,52
15:0i	41,89	32,97	32,03
15:0ai	36,7	42,93	44,41
16:01ω 7cOH	1,32	1,39	1,03
16:0i	0,97	1,41	2,11
16:1ω 11c	3,56	4,03	3,16
16:0	2,06	2,96	3,47
17:1iω 10c	1,38	0,56	1,95
Suma en 4	1,08	0,71	3,97
17:0i	2,22	1,89	1,95
17:0ai	2,73	3,43	3,97
Índice de similitud con <i>B. megaterium</i>	0,949	0,948	0,991

Los índices de similitud de los perfiles FAME con la base de datos estaban todos dentro del umbral de confianza de la especie (0,948-0,991). Se construyó un dendograma mediante técnicas de análisis de grupos para producir emparejamientos de pares no ponderados basados en composiciones de ácidos grasos. Los resultados indican que H491 (listado como MBI-303) es más similar a J142, y que M018 es más diferente de las otras dos cepas.

Ejemplo 7: Identificación MALDI-TOF de los aislados H491, M018 y J142

Se enviaron muestras para perfiles e identificación de espectrometría MALDI-TOF (Desorción asistida por

matriz/ionización-Tiempo de vuelo) a MIDI Labs, Inc (Newark, DE) para crear un perfil a partir de las proteínas ribosómicas de los aislados. El perfil se comparó con una base de datos patentada y los aislados se identificaron según sus puntuaciones MALDITOF.

- 5 Las puntuaciones MALDI-TOF superiores a 2,000 proporcionan confianza de identificación al nivel de especie, puntuaciones de 1,700-1,999 al nivel de género, y puntuaciones inferiores a 1,700 indican que no hay coincidencia en la base de datos. Tanto H491 como M018 arrojaron puntuaciones MALDITOF superiores a 2,000 (2,163 y 2,291 respectivamente), mientras que J142 tuvo una puntuación de 1,972. Estos resultados indican que el perfil de proteína ribosómica de J142 puede ser único dentro de la especie *Bacillus megaterium*.

10 **Ejemplo 8: Eficacia de los aislados de *Bacillus megaterium* contra Nematodos de nudo de raíz (*Meloidogyne incognita*) - Ensayos en agar**

15 **A: Ensayo de agar agua n.º 1**

- 15 Para determinar y comparar los efectos de diferentes cepas de *Bacillus megaterium* sobre nematodos de nudo de raíz (*Meloidogyne incognita* VW6), se realizó un ensayo en agar agua. Se transfirieron plántulas de pepino 'White Wonder' de siete días en agar agua en placas de Petri de 60 mm de diámetro a razón de una siembra/placa. Los pepinos se trataron luego con 300 ml de sobrenadante de fermentación H491 de *B. megaterium* y 700 de *M. incognita*/placa, con seis repeticiones de cada tratamiento. Después de la incubación durante 11 días, se registró el número de agallas en las raíces de pepino. Los resultados, que se muestran en la Tabla 3, indican que todas las cepas redujeron significativamente el número de agallas en las raíces de pepino en comparación con el control de agua.

Tabla 3. Efectos del sobrenadante de fermentación de aislados de *Bacillus megaterium* sobre la formación de agallas de nudos en las raíces de pepino

Tratamiento	Número de agallas	% de reducción de agallas
H491	3,3 ± 1,4	66,7 ± 13,7
J142	3,7 ± 1,2	63,3 ± 12,1
M018	5,8 ± 1,5	41,7 ± 14,7
Avid (1 %)	1 ± 0,5	95 ± 5,5
Medio blanco	7 ± 1,2	33,3 ± 12,1
Agua	10 ± 2,6	0 ± 2,6

25 **B: Ensayo de plántulas de agar n.º 2: Efecto de *B. megaterium* H491 sobre la infestación de *M. incognita* en pepino**

- 30 Para evaluar el efecto del sobrenadante superior de *B. megaterium* H491 en juveniles (J2s) de nematodos de nudo de raíz (*Meloidogyne incognita* VW6), se realizó la siguiente prueba en placas de Petri de 60 mm de diámetro: Semillas de pepino cv. 'White Wonder' se germinaron en papel de seda húmedo en placas de Petri a temperatura ambiente. Una semana después, las plántulas germinadas se transfirieron a agar agua en placas de Petri a razón de una plántula/placa. Se añadió una alícuota de 300 ml de sobrenadante de fermentación *B. megaterium* H491 en cada placa, después de lo cual se añadieron 300 de *M. incognita* J2 en 150 ml de agua desionizada. Las placas de Petri se cubrieron luego y se incubaron a 25 °C durante 7 días. Se utilizaron agua, medio blanco y Avid (0,1 %) como controles negativo, negativo y positivo, respectivamente. El efecto de cada sustancia sobre la supervivencia de nematodos se evaluó después de 7 días contando el número de agallas en las raíces de pepino, y se expresó como un porcentaje del control de agua. Los experimentos se realizaron por duplicado.

- 40 Los resultados, presentados en la Figura 9, muestran que el sobrenadante de *B. megaterium* H491 redujo significativamente el número de agallas en las raíces de pepino en comparación con el control de agua en ambos ensayos, lo que indicó que H491 fue eficaz contra *M. incognita* y se puede usar para el manejo de este nematodo en pepino.

45 **Ejemplo 9: Ensayos *in vitro* con *M. incognita* y *M. hapla***

A: Bioensayo nematocida *in vitro* contra *M. incognita* y *M. hapla*

- 50 Con el fin de garantizar un control consistente y adecuado de los nematodos en todas las fermentaciones de *B. megaterium* H491 esterilizadas por filtro, se midió la motilidad de los nematodos juveniles de nudo de raíz (J2) en un bioensayo *in vitro* de placa de cultivo celular de 96 pocillos. Este procedimiento se basa en una clasificación visual de la motilidad de los nematodos en cada pocillo tratado con H491 donde cada tratamiento se prueba en repeticiones de pocillos de cuatro: se dispensaron 100 ml de cada solución de muestra microbiana en su pocillo correspondiente seguido de 30 ml de una dilución 1:100 de solución de material conservante de plantas (PPM, por sus siglas en inglés) que suprime momentáneamente el crecimiento microbiano y permite la visibilidad en cada pocillo. Finalmente, se añadieron 50 ml de solución de nematodos, que contiene aproximadamente 15 J2. La placa se cubrió y se incubó durante 24 horas a 25 °C, luego el efecto de cada muestra se calificó y registró visualmente. La actividad nematocida

se confirmó en 19 fermentaciones a pequeña escala diferentes, con actividad nematocida que generalmente ronda el 60 %, como se resume en la Figura 5.

B: Recuperación de nematodos (*M. hapla*) después de la exposición al sobrenadante H491

Para evaluar el efecto del sobrenadante H491 sobre la motilidad y la recuperación posterior de juveniles de nematodos de nudo de raíz (*Meloidogyne hapla*), se realizó la siguiente prueba en placas de cultivo celular de plástico de 96 pocillos. Se añadió una alícuota de 50 ml de cada solución de prueba a los pocillos apropiados, después de lo cual, se añadieron 50 J2 dispensados en 30 ml de agua desionizada a cada pocillo. La placa se cerró con una tapa y se incubó a 25 °C durante 72 horas. El agua y el nematocida Avid® (1 %) se usaron como controles negativo y positivo, respectivamente. El efecto de cada sustancia sobre la motilidad de los nematodos se determinó después de 24, 48 y 72 horas mediante la adición de una gota de NaOH 1 N en cada pocillo, y la proporción de nematodos móviles en cada tratamiento se registró como un porcentaje del número inicial. Para evaluar la recuperación de la motilidad en cada tratamiento, se eliminó un volumen de 70 ml de cada pocillo, y la solución restante en cada pocillo se diluyó mediante la adición de una solución de 100 ml de agua desionizada. Las placas se incubaron nuevamente durante 24 horas como se describió anteriormente, después de lo cual se realizó la segunda evaluación de motilidad. Hubo tres repeticiones para cada tratamiento y el estudio se realizó dos veces.

Los resultados se muestran en la Tabla 4. Después de 48 horas, los pocillos que contenían nematodos expuestos a la mayor cantidad de solución de tratamiento estaban demasiado turbios para leer sin lavar los tratamientos. Por lo tanto, el porcentaje de nematodos móviles no se registró directamente después de 48 o 72 horas. Se encontró que el porcentaje de nematodos móviles expuestos al sobrenadante H491 disminuye con el aumento del tiempo de incubación. La tasa más baja (17,5 %) se observó 72 horas después de la incubación. Estos resultados indican que el sobrenadante H491 puede inmovilizar juveniles de nematodos de nudos de raíz, y este efecto puede durar al menos 72 horas.

Tabla 4. Porcentaje de tasa de recuperación de *Meloidogyne hapla* después de 24, 48 y 72 horas de incubación con sobrenadante H491

Candidato	Tratamiento*			
	24	24-24	48-24	72-24
Agua	95 ± 3,2	97,5 ± 2,7	95 ± 4,5	90 ± 4,5
Medios	78,3 ± 2,6	82,5 ± 2,7	82,5 ± 2,7	80 ± 4,5
Avid (1 %)	10 ± 4,5	13,3 ± 2,6	11,7 ± 2,6	10 ± 4,5
H491	38 ± 2,7	35 ± 4,5	25 ± 5,5	17,5 ± 2,7

Los datos mostrados son valores medios obtenidos de dos estudios.

* "24" indica que la observación se realizó directamente 24 horas después de la incubación de nematodos con los candidatos; "24-24" indica observación después de la incubación con candidatos durante 24 horas y luego 24 horas en agua; "48-24" indica que la observación se realizó después de la incubación con candidatos durante 48 horas y luego 24 horas en agua; "72-24" indica que la observación se realizó después de la incubación con candidatos durante 72 horas y luego 24 horas en agua

Ejemplo 10: Ensayo de dosis-respuesta *in vitro* contra nematodos de vida libre

Para evaluar la eficacia y la estabilidad del caldo celular completo de *B. megaterium* H491, se analizó el sobrenadante para determinar el efecto sobre la motilidad J2 a diferentes diluciones: 1X = sin diluir; 0,75X= 75 ml de sobrenadante H491: 25 ml de agua; 0,50X= 50 ml de sobrenadante H491: 50 µl de agua; 0,25X= 25 ml de sobrenadante H491: 75 ml de agua. La motilidad de los nematodos de nudo de raíz juveniles (J2) se midió en un bioensayo *in vitro* de dosis-respuesta de placa de cultivo celular de plástico de 96 pocillos. Este procedimiento se basa en una clasificación visual de la motilidad de los nematodos en cada pocillo tratado con H491 donde cada tratamiento se prueba en repeticiones de pocillos de cuatro: se dispensaron 100 µl de cada dilución de muestra microbiana en su pocillo correspondiente seguido de 30 µl de una dilución 1:100 de solución de material conservante de plantas (PPM) que suprime temporalmente el crecimiento microbiano. Finalmente, se añadieron 50 µl de solución de nematodos, que contenía aproximadamente 15 nematodos de *M. hapla* J2, y la placa se cubrió y se incubó a 25 °C durante 24 horas. El efecto de cada muestra de dilución se calificó y registró visualmente. Los resultados, que se muestran en la Figura 6, indican que el efecto sobre la motilidad varió de aproximadamente un 15 % no móvil a una dilución cuádruple (0,25X), a un 100 % no móvil con sobrenadante de fuerza completa (1x).

Ejemplo 11: Ensayos en invernadero

A: Ensayo en maceta en invernadero: pepino con *Meloidogyne incognita*

Para demostrar la actividad nematocida del sobrenadante H491 contra los nematodos de nudo de raíz (*Meloidogyne incognita*), un estudio en invernadero en pepino (*Cucumis sativus*) cv. White Wonder se realizó utilizando un sobrenadante como producto de prueba. Se plantó una planta de pepino por maceta en arena esterilizada en autoclave y se cultivó en un invernadero bajo la luz natural del día. Las plantas de dos semanas de edad se trataron con una

alícuota de 40 ml del producto de prueba, después de lo cual se inocularon 2000 de *M. incognita* J2 recién nacidos en cada maceta. Una semana después, se aplicó una segunda porción de 40 ml del producto de prueba a la misma velocidad que antes. Se utilizaron agua, medio blanco y Avid (0,1 %) como controles negativo, negativo y positivo, respectivamente. Hubo cinco réplicas para cada producto de prueba, y el experimento se organizó en un diseño de bloques completos aleatorio. Las plantas se cultivaron en un invernadero durante cuatro semanas más, después de lo cual cada planta se cosechó y se evaluó el peso de los brotes y raíces. Se registró el número de nematodos en cada maceta y el número de m³ (galones) de raíz en cada planta.

Los datos presentados en la Tabla 5 a continuación muestran que, aunque los pesos frescos de brotes y raíces de pepino de las plantas tratadas con el sobrenadante H491 no fueron estadísticamente diferentes de los controles no tratados, las macetas tratadas con el sobrenadante H491 contienen significativamente menos nematodos que las macetas de control no tratadas. Además, el número de agallas de raíz en las plantas de pepino tratadas con sobrenadante H491 fue significativamente menor que en las plantas tratadas con control de agua o medio blanco. Estos resultados indican que el sobrenadante H491 es eficaz para restringir la formación de agallas mediante *M. incognita* en pepino.

Tabla 5. Efectos del sobrenadante H491 en la infestación con *Meloidogyne incognita* en pepino en un ensayo de invernadero en maceta.

Tratamiento	Peso de los brotes (g)	Peso de las raíces (g)	Número de agallas	Número de nematodos
Avid	15,2 ± 4,4	5,2 ± 2,1	0 ± 0 d	316 ± 193
Medios	24,3 ± 11,7	4,1 ± 2,5	19,6 ± 3,6	354 ± 195
Agua	21,1 ± 2,6	6,3 ± 1,2	29,0 ± 8,2	510 ± 256
H491	22,9 ± 5,6	5,6 ± 0,7	10,8 ± 2,8	332 ± 161

Los datos mostrados son medias de dos estudios.

B: Ensayo en maceta en invernadero: Efecto del sobrenadante H491 sobre la infestación por *Meloidogyne hapla* de plantas de pepino y tomate

Se realizaron estudios de invernadero en pepino (*Cucumis sativus*) cv. White Wonder y tomate (*Solanum lycopersicum*) cv. Roma para demostrar la actividad nematocida del sobrenadante H491 en nematodos de nudo de raíz (*M. hapla*). Se plantó una planta de pepino o tomate por maceta en arena esterilizada en autoclave y se cultivó en un invernadero bajo la luz natural del día. Las macetas que contenían plantas de pepino de dos semanas o de tomate de tres semanas de edad se trataron con una alícuota de 40 ml del producto de prueba por maceta, después de lo cual se inocularon 2000 juveniles de *M.hapla* nuevos en cada maceta. Una semana después, se aplicó un segundo tratamiento del producto de prueba a las macetas a la misma velocidad que antes. Se utilizaron agua, medio y Avid (0,1 %) como controles negativo, negativo y positivo, respectivamente. Hubo cinco réplicas para cada producto de prueba, y el experimento se organizó en un diseño de bloques completos aleatorio. Las plantas se cultivaron en un invernadero durante cuatro semanas más para el pepino y seis semanas más para el tomate, después de lo cual cada planta se cosechó y se evaluó el peso de los brotes y raíces frescas y la altura de los brotes. El vigor de la planta y el índice de agallamiento de la raíz fueron clasificados en una escala de 0-10. Para el vigor de la planta, 0 representa muerto y 10 representa el más saludable; para el índice de agallas de la raíz, 0 representa ausencia de agallas y 10 representa el 100 % de las raíces con agallas. También se registró el número de nematodos en cada maceta.

Los resultados del primer ensayo se presentan en las Tablas 6 y 7 para pepino y tomate, respectivamente. El sobrenadante H491 redujo significativamente el índice de agallas de la raíz en el pepino y la cantidad de nematodos en el pepino y el tomate en comparación con el control de agua. En el segundo ensayo, el índice de agallas de la raíz y el número de nematodos se redujeron mediante H491 en el pepino pero no en el tomate (Tablas 8 y 9). Los resultados de ambos ensayos indican que el sobrenadante H491 reduce el número de agallas en las plantas y disminuye el daño en las plantas por los nematodos de nudo de raíz.

Tabla 6. Efectos del sobrenadante H491 sobre *Meloidogyne hapla* en pepino en un ensayo de ensayo de maceta en invernadero.

Tratamiento	Vigor de la planta ^y	Índice de agallas de la raíz ^z	Población de nematodos
H491	9 ± 1	2 ± 1	2233 ± 924
Avid (1 %)	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
Medios	3 ± 1	7 ± 3	5233 ± 1097
Agua	1 ± 1	8 ± 1	5467 ± 611

Los datos mostrados son medias de dos estudios

^yVigor de la planta en una escala de 0-10: 0: muerta, 10: la más sana

^zÍndice de agallas de la raíz en una escala de 0 a 10: 0: sin agallas, 10: 100 % de raíces con agallas

Tabla 7. Efectos del sobrenadante H491 sobre *Meloidogyne hapla* en tomate en un ensayo de ensayo de maceta en invernadero.

Tratamiento	Altura de los brotes (cm)	Peso de los brotes (g)	Peso de las raíces (g)	Índice de agallas de la raíz	Número de nematodos
H491	26 ± 1 ^z	17 ± 3	4,3 ± 2	2 ± 1	140
Avid (1 %)	8 ± 8	1 ± 1	0,4 ± 1	0 ± 0	0
Medios	31 ± 5	24 ± 4	4,8 ± 3	2 ± 2	267
Agua	28 ± 6	14 ± 4	4,2 ± 1	2 ± 1	325

Los datos mostrados son medias de dos estudios

Tabla 8. Efectos del sobrenadante H491 sobre *Meloidogyne hapla* en pepino en un ensayo de ensayo de maceta en invernadero dos.

Candidato nematocida	Peso superior	Peso de las raíces	Índice de agallas de la raíz	Número de nematodos
Avid	16,1 ± 4,5	4,9 ± 2,5	0,2 ± 0,4	1180 ± 920
Medios	8,3 ± 2,6	2,1 ± 1,5	6,0 ± 1,2	3260 ± 1590
Agua	5,9 ± 1,2	0,5 ± 0,3	7,2 ± 1,3	2580 ± 934
H491	9,3 ± 2,1	1,4 ± 0,7	2,6 ± 1,0	1500 ± 412

Los datos mostrados son medias de dos estudios

Tabla 9. Efectos del sobrenadante H491 sobre *Meloidogyne hapla* en tomate en un ensayo de ensayo de maceta en invernadero dos.

Candidato nematocida	Peso superior	Peso de las raíces	Índice de agallas de la raíz	Número de nematodos
Avid	16,9 ± 4,8	6,2 ± 2,1	0 ± 0	332 ± 385
Medios	21,5 ± 5,9	8,3 ± 1,3	2,2 ± 2,8	342 ± 355
Agua	14,1 ± 1,1	5,7 ± 1,7	4,1 ± 3,2	334 ± 241
H491	11,3 ± 4,6	4,4 ± 2,3	2,8 ± 3,8	332 ± 491

Los datos mostrados son medias de dos estudios

Ejemplo 12: Inmovilización de nematodos en suelo infestado

5 En este ejemplo, se determinó el efecto del sobrenadante de *B. megaterium* H491 sobre la motilidad y la viabilidad de los nematodos en el suelo infestado. Estos ensayos se realizaron con suelos de campo infestados predominantemente con nematodos de aguijón o lanza. Cada ensayo consistió en 4 tratamientos: sobrenadante H491, medio de crecimiento en blanco, un control positivo (es decir, Avid® al 0,1 %) y un control negativo (es decir, agua). Los ensayos se realizaron como un diseño de bloques completos aleatorio con 8 repeticiones. Se recogieron doce litros de tierra que contenía los nematodos deseados, se separaron de la hierba y las raíces y se homogeneizaron. Después de mezclar el suelo, se extrajeron 5 muestras de suelo (100 cm³) utilizando un método de centrifugación y flotación de azúcar y, para cada muestra, se contó el número de nematodos de cada tipo para asegurar una distribución uniforme de los principales nematodos de interés (de aguijón o lanza) en todo el suelo. A continuación, se midieron porciones de 200 cm³ de tierra que contenía nematodos y se colocaron en una maceta de plástico de 5,08 x 5,08 x 5,08 cm (2 x 2 x 2 pulgadas). Los tratamientos se aplicaron como un tratamiento de inmersión (40 ml/maceta). Luego se colocaron las macetas en un banco de laboratorio y se dejaron durante 72 horas para exponer los nematodos a los tratamientos.

15 A continuación, el suelo de cada maceta se lavó sobre un aparato Baermann modificado para la extracción de nematodos. El aparato Baermann permite que los nematodos vivos se muevan fuera del suelo, a través de un filtro y hacia el agua, donde se pueden contar. Los nematodos muertos o inmóviles permanecen en el suelo. Después de incubar en los Baermanns durante 96 horas, se recogieron y contaron los nematodos vivos. Los recuentos de nematodos de cada tratamiento se compararon con SAS 9.2 usando la separación media de LSD de Fisher a $P \leq 0,05$ para todos los nematodos observados.

25 Se determinaron los efectos del sobrenadante H491 en cuatro géneros de nematodos parásitos de plantas. Estos cuatro géneros, observados en el suelo del campo utilizado para realizar el ensayo de banco de aguijón, fueron: nematodo de aguijón, nematodo de lanza, *Peltamigratus* sp. y *Scutellonema* sp. El recuento de nematodos de aguijón aumentó en un 5 % en el suelo expuesto al medio de crecimiento, en comparación con el suelo expuesto solo al agua. En comparación con el control negativo (suelo expuesto al agua), el suelo expuesto al sobrenadante H491 o a Avid experimentó una disminución del 14 % en el número de nematodos de aguijón.

35 Los recuentos de *Peltamigratus* sp. disminuyeron en un 7 %, 32 % y 88 % después del tratamiento del suelo con medio, sobrenadante H491 y Avid, respectivamente; en comparación con el control negativo (agua). Los recuentos de *Scutellonema* sp. no cambiaron en el suelo tratado con medio de crecimiento, en comparación con el control negativo (agua), y disminuyeron en un 17 % y un 75 % en el suelo tratado con H491 y Avid, respectivamente, en comparación con el control negativo (agua). Los recuentos de nematodos de lanza disminuyeron en un 9 %, 35 % y 69 % en el suelo sometido a tratamientos con medio, sobrenadante H491 y Avid, respectivamente, en comparación con el control de agua.

40

Ejemplo 13: Extracción y aislamiento de compuestos a partir del sobrenadante de cultivo H491 de *B. megaterium*

El siguiente procedimiento se usó para la purificación de compuestos a partir de cultivos de *B. megaterium*. Brevemente, se extrajo un extracto bruto del caldo de cultivo H491 de *B. megaterium* con Amberlite, y el extracto bruto se fraccionó mediante cromatografía líquida al vacío. Una fracción VLC activa se fraccionó adicionalmente mediante HPLC, y se identificaron compuestos activos. El compuesto de ácido 4-fenil butanoico nemáticamente activo (Compuesto 1) se obtuvo de la fracción 3 de VLC, tal como se describe a continuación.

10 Cromatografía líquida de extracto bruto

El caldo de cultivo obtenido de una fermentación de 10 l de *B. megaterium* en caldo V-8 se extrajo con resina Amberlite XAD-7 (Asolkar et al., 2006) mediante agitación de la suspensión celular con resina a 225 rpm durante dos horas a temperatura ambiente. La resina y la masa celular se recogieron mediante filtración a través de estopilla y se lavaron con agua desionizada para retirar las sales. La resina, la masa celular y la estopilla se empaparon durante 2 horas en acetona/metanol (50/50) después de lo cual la acetona/metanol se filtró y se secó al vacío, usando un evaporador rotatorio, para dar un extracto bruto. El extracto bruto se fraccionó mediante cromatografía líquida de vacío de fase inversa C18 (H₂O/CH₃OH; gradiente 80:20 % a 0:100 %) en 6 fracciones (Figura 1). Estas fracciones se concentraron hasta sequedad usando un evaporador rotatorio, y los residuos secos resultantes se seleccionaron para determinar la actividad biológica usando *M. incognita* y *M. hapla*.

Ensayo de actividad biológica de fracciones VLC de extracto de *Bacillus megaterium*

Las fracciones VLC 1-6 se disolvieron en dimetilsulfóxido (DMSO) y se probaron en un bioensayo *in vitro* de extracto de placa de cultivo celular de 96 pocillos para identificar la fracción/es que contienen el metabolito/s activo deseado. Para evaluar la actividad biológica, se expusieron 15-20 nematodos J2 en 50 ml de agua a 100 ml de una fracción concentrada de 4 mg/ml durante 24 horas a 25 °C. Cada fracción se probó por cuadruplicado. Los resultados se registraron en base a una clasificación visual de la inmotilidad de los nematodos juveniles (J2) en cada pocillo. Los resultados se muestran en la Figura 7.

30

Fraccionamiento mediante HPLC de fase inversa de fracciones de VLC

Las fracciones activas se sometieron a HPLC de fase inversa en un sistema Spectra System P4000 (Thermo Scientific) para proporcionar compuestos puros, que luego se seleccionaron en bioensayos como se describe anteriormente para identificar compuestos activos. Para confirmar la identidad de los compuestos, se registraron datos espectroscópicos adicionales tales como LC/MS y RMN.

35

La fracción 3 (anterior) se aplicó a una columna HPLC C-18 (Phenomenex, Luna 10u C18(2) 100 A, 250 x 30), y la columna se desarrolló con un sistema de disolventes en gradiente de agua:acetonitrilo (0-10 minutos, 80-70 % de CH₃CN acuoso; 10-45 min, 70-50 % de CH₃CN acuoso; 45-55 min, 35-30 % de CH₃CN acuoso; 55-60 min, 30-20 % de CH₃CN acuoso; 60-65 min, 20-0 % de CH₃CN acuoso; 65-75 min, 100% de CH₃CN; 75-80 min, 0-80 % de CH₃CN acuoso) a un caudal de 7 ml/min y detección UV de 210 nm. El compuesto activo ácido 4-fenilbutanoico (1) tiene un tiempo de retención de 47,85 min.

40

45 Ensayo de actividad biológica de fracciones de HPLC

Cada máximo de HPLC se probó en un bioensayo *in vitro* de extracto de placa de cultivo celular de plástico de 96 pocillos para identificar el máximo/s que contienen el metabolito/s activo deseado. Para estos ensayos, se expusieron 15-20 nematodos en una solución de agua de 50 ml a 3 ml de un concentrado máximo de 20 mg/ml durante un período de 24 horas a 25 °C. Una vez que se completó el período de incubación, los resultados se registraron en base a una clasificación visual de la inmotilidad de los nematodos juveniles (J2) en cada pocillo tratado con máximos purificados H491 H1-H38; cada tratamiento se probó en repeticiones de cuatro. Los resultados, que se muestran en la Figura 8, indican que H491 produce numerosos compuestos con actividad plaguicida. La fracción 29 fue seleccionada para análisis y pruebas adicionales.

55

Análisis espectroscópico de masas de compuestos

La espectroscopía de masas de máximos activos, aislados mediante HPLC usando el procedimiento establecido anteriormente, se realizó en un instrumento de electronebulización (ESI) Thermo Finnigan LCQ Deca XP Plus usando los modos de ionización tanto positivo como negativo en un modo de escaneo completo (m/z 100-1500 Da) en un espectrómetro de masas LCQ DECA XP^{plus} (Thermo Electron Corp., San Jose, CA). Instrumento de cromatografía líquida de alto rendimiento térmico (HPLC) equipado con detector Finnigan Surveyor PDA plus, autosampler plus, bomba MS y una columna Luna C18 5 μ 100A de 4,6 mm x 100 mm (Phenomenex). El sistema disolvente consiste en agua (disolvente A) y acetonitrilo (disolvente B). La fase móvil comienza con 10 % de disolvente B y se aumenta linealmente hasta 100 % de disolvente B durante 20 minutos y luego se mantiene durante 4 minutos, y finalmente se devuelve a 10 % de disolvente B durante 3 minutos y se mantiene durante 3 minutos. El caudal fue de 0,5 ml/min. El

65

volumen de inyección es 10 µl y las muestras se mantuvieron a temperatura ambiente en una muestra automática. Los compuestos se analizaron mediante LC-MS utilizando la LC y cromatografía de fase inversa. El análisis por espectroscopía de masas de los presentes compuestos se realiza en las siguientes condiciones: El caudal del gas nitrógeno se fijó a 30 y 15 arb para el caudal del gas de impulsión y del aux/de barrido, respectivamente. La ionización mediante electropulverización se realizó con un voltaje de pulverización ajustado a 5000 V y un voltaje capilar a 35,0 V. La temperatura capilar se ajustó a 400 °C. Los datos se analizaron en el programa informático Xcalibur. El ácido 4-fenilbutanoico (1) exhibió una masa molecular de 163,34 en modo de ionización negativa (véase la Figura 2).

Análisis espectroscópico de RMN de compuestos

Los espectros de RMN se midieron en un espectrómetro de campo en gradiente Bruker a 600 MHz. La referencia se establece en el estándar interno tetrametilsilano (TMS, 0,00 ppm).

Para la elucidación de la estructura, se analizó adicionalmente el ácido 4-fenilbutanoico (1) purificado con peso molecular 164 usando un instrumento de RMN de 600 MHz. Se detectaron valores δ de RMN ^1H a 7,28 (2H), 7,19 (2H), 7,17, 2,67, 2,31 y 1,92 (véase la Figura 3). Se detectaron valores de RMN ^{13}C de 177,5, 142,9, 129,5, 129,5, 129,4, 129,4, 126,9, 36,1, 34,4 y 28 (véase la Figura 4). El compuesto activo se aisló como un sólido incoloro, con bandas de absorción UV a 220 y 283 nm. El espectro de masas de ionización mediante electropulverización negativa reveló un máximo de iones moleculares a m/z 163,32 [M - H] y 327,14 [2M - H] lo que sugiere un peso molecular de 164, que es consistente con la fórmula molecular $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_2$ (con 5 grados de insaturación). El espectro de RMN ^1H exhibió señales indicativas de la presencia de un anillo aromático monosustituido (δ 7,28, 2H, d, $J = 7,7$ Hz; 7,19, 2H, d, $J = 7,7$ Hz; 7,17 1H, t, $J = 7,7$ Hz). Asimismo, el espectro de RMN ^1H reveló la presencia de tres grupos metileno, a δ 2,62, 2H, t, $J = 7,92$ Hz, 2,30, 2H, t, $J = 7,65$ y 1,92, 2H, q, $J = 7,65$ Hz. El espectro de RMN ^{13}C del Compuesto (1), interpretado con la ayuda del experimento HSQC, indicó la presencia de 10 átomos de carbono, incluido un carbonilo (δ_c 177,5); seis carbonos sp^2 , uno de los cuales no es protonado (δ_c 142,9); cinco átomos de carbono protonados (δ_c 129,5, 129,5, 129,4, 129,4, 126,9); y tres metilenos (δ_c 36,1, 34,4, 28,1). El análisis de la correlación COSY y HSQC reveló dos sistemas de rotación, uno que implica tres grupos metileno de la estructura $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$, y el otro que comprende un anillo de benceno monosustituido. A partir del análisis detallado de los experimentos COSY, HMQC y HMBC, la estructura del compuesto se asignó como ácido 4-fenilbutanoico. La estructura asignada se confirmó mediante comparación con una muestra sintética. Este compuesto ha sido aislado de la bacteria marina *B. pumilus* S6-15, que inhibe la formación de biopelículas en especies grampositivas y gramnegativas (Nithya et al., 2011).

Ejemplo 14: Ensayo de cono en invernadero: efecto de *Meloidogyne incognita* en plántulas de tomate

Se realizaron estudios en invernadero en tomate (*Solanum lycopersicum*) cv. UC 82 para probar la actividad nematocida del sobrenadante H491 en nematodos de nudo de raíz (*M. incognita*). Una plántula de tomate de 25 días por recipiente cónico (Stuewe & Sons, Inc, Tangent, OR) se trasplantó en mezcla de arena esterilizada en autoclave y de suelo (2:1) y se cultivó en un invernadero bajo la luz natural del día. 16 días después del trasplante, cada plántula de tomate (3-4 hojas verdaderas) se empapó con una alícuota de 10 ml de caldo celular completo (WCB) de H491 y otros productos de prueba vertiendo la alícuota directamente sobre la superficie del suelo. Después de eso, se inocularon 4000 huevos de *M. incognita* suspendidos en 1 ml de agua en tres agujeros de 6 cm de profundidad alrededor de los tallos en cada cono. Una semana después, se aplicó una segunda inmersión a los conos al mismo ritmo que la primera inmersión. Se utilizaron agua, medio y Avid (625 ppm) como controles negativo y positivo, respectivamente. Hubo cuatro réplicas y el experimento se organizó en un diseño de bloques completos aleatorio. Las plantas se cultivaron en un invernadero durante 3 semanas antes de retirarlas. Luego se evaluó la fitotoxicidad de cada planta, el peso de la parte superior fresca (o brote), el peso de la raíz fresca, el número de agallas por raíz y el índice de agallas con base en una escala de 0 a 10 (0 = sin agallas, 10 = 100 % de las raíces con agallas). No se observó fitotoxicidad durante el período de incubación de la prueba. El análisis estadístico (ANOVA) se realizó mediante la prueba de Fisher, y las diferencias estadísticas entre las medias de tratamiento se calcularon en $P \leq 0,05$.

Los resultados se presentan en la Tabla 10. El WCB H491 redujo significativamente el índice de agallas, la cantidad de agallas por raíz y la cantidad de agallas por gramo de raíz en comparación con el control de agua. Las plantas tratadas con H491 tenían un peso de la parte superior fresca más pesado que las tratadas con agua. No se observaron diferencias significativas en el peso de la raíz fresca entre tratamientos.

Tabla 10. Efectos del caldo celular completo (WCB) H491 sobre *Meloidogyne incognita* en tomate en un ensayo^x de cono de invernadero

Tratamiento	FTW (g) ^y	FRW (g) ^y	índice de agallas ^z	agallas/raíz	agallas/g de raíz
H491	10,74 ± 0,34 _a	6,1 ± 0,59 ^a	2,3 ± 0,96 ^b	142,5 ± 69,70 ^b	22,7 ± 9,28 ^b
agua	7,35 ± 6,03 ^b	5,43 ± 1,37 ^a	6,5 ± 1,29 ^a	271,8 ± 53,60 ^a	54,1 ± 25,20 ^a
avid	8,43 ± 1,36 _{ab}	5,33 ± 1,33 ^a	0 ± 0,00 ^c	1,0 ± 2,00 ^c	0,24 ± 0,48 ^b
valor p	0,038	0,606	0	0	0,003

^x Los datos son medias ± desviaciones estándar (DE) con 4 repeticiones. Los valores seguidos de la misma letra en la misma columna no fueron significativamente diferentes, de acuerdo con la diferencia menos significativa de Fisher en $P \leq 0,05$.

^y FTW: peso de la parte superior fresca; FRW: peso de la raíz fresca.

^z Índice de agallas en una escala de 0 a 10: 0: sin agallas; 10: 100 % de raíces con agallas.

Ejemplo 15: Respuesta a la dosis para caldo celular completo H491 en mini tubo en bioensayo en planta

5 El caldo celular completo (WCB) H491 de *Bacillus megaterium* se probó en un bioensayo en planta a 3 diluciones diferentes en agua (1X, 0,7X y 0,5X v/v) para determinar la potencia del WCB contra juveniles de *Meloidogyne incognita*. Esta prueba es una prueba en miniatura de maceta en invernadero en la que se modificaron los tubos Falcon estériles cortando la parte superior de 3,81 cm (1,5 pulgadas) y haciendo agujeros en la parte inferior para permitir el drenaje. Los tubos se llenaron con una mezcla de arena y tierra (1:2) y se empaparon con alícuotas de 2 ml de caldo celular completo H491 (50, 70 y 100 %), Avid (caudal de marcado) como control positivo y agua como control negativo. Después de empapar, se plantaron semillas de pepino (cv. SMR58) y luego los tubos se inocularon con 800 huevos de *M. incognita*. Los tubos se cubrieron con parafilm y se colocaron en una caja con toallas de papel húmedas para garantizar una alta humedad. Después de 4 días, la mayor parte de la semilla había germinado y se retiró la cubierta de parafilm. Después de una semana, se aplicó una segunda dosis (1 ml). La prueba se terminó después de dos semanas y se evaluaron el peso de la parte superior fresca, el peso de la raíz fresca y el índice de agallas (escala: 1 sin raíces saludables - 10 raíces saludables).

10 Los resultados, que se muestran en la Figura 10, indican que el índice de agallas se redujo a todas las concentraciones de caldo celular completo H491 analizadas.

Ejemplo 16: Ensayo de motilidad in vitro

15 El WCB H491 obtenido de cuatro lotes de fermentación separados se probó en un ensayo de motilidad in vitro. En este ensayo, los juveniles (J2) de *M. incognita* se expusieron a muestras de prueba en una placa de fondo plano de 96 pocillos. Después de 24 horas, los juveniles se transfirieron a placas de 6 pocillos que contenían 1,5 % de agar agua, para permitir la posible recuperación. La motilidad se midió mediante el recuento del número de juveniles (J2) que se movieron fuera del área inicial después de otras 24 horas. Los resultados se muestran en la Figura 11. Los datos indican que, para los cuatro lotes de WCB H491, se logró el 100 % de inmovilización después de una exposición de 24 horas.

Ejemplo 17: Capacidades de promoción del crecimiento de las plantas de *B. megaterium* H491

20 *B. megaterium* H491 se probó para marcadores de promoción del crecimiento de plantas en cinco ensayos de placa diferentes, y los resultados representativos se muestran en la Tabla 11. La bacteria fue capaz de solubilizar fosfato y produjo la enzima ACC desaminasa. También fue capaz de crecer en metanol como fuente de carbono. Estos resultados sugirieron que *B. megaterium* H491 puede promover el crecimiento y conferir tolerancia al estrés a las plantas.

35

40

	Sol. fosfato	ACC desaminasa	IAA*	CAS*	AMS*
H491	+++	+++	+	-	++

*IAA: ácido acético indol; CAS: Cromo azurol S; AMS: Sales minerales de amonio

Ejemplo 18: Actividad promotora del crecimiento en soja y sorgo

45 Para evaluar la capacidad de *B. megaterium* H491 para promover el crecimiento de las plantas, se realizaron dos ensayos de vigor de plántulas en soja y sorgo. La cepa H491 se cultivó en una placa de agar y se transfirieron algunas colonias a 50 ml de caldo Luria estéril (LB: 25 g/l) y se incubaron a 25 °C, 180 rpm durante 24 horas. Las células bacterianas se cosecharon de los cultivos LB mediante centrifugación a 3220 x g durante 20 minutos. El sobrenadante se desechó y las células se lavaron en 20 ml de tampón de MgSO₄ estéril y luego se centrifugaron por segunda vez a 3220 x g durante 20 minutos. Después de descartar el sobrenadante, las células se resuspendieron en un pequeño volumen de tampón estéril. La concentración de células en la suspensión se determinó midiendo la absorbancia a 600 nm en un espectrofotómetro. Las semillas se trataron con la suspensión celular mediante imbibición. Se dispensó un

inóculo celular (1×10^8 UFC/ml) sobre las semillas, en un tubo Falcon de 50 ml, a un caudal de 0,6 ml por gramo de semilla (para semillas con 250-300 semillas/g). La semilla y el inóculo se incubaron durante la noche a 25 °C, y las semillas tratadas se secaron luego en una campana estéril durante 30 minutos. El control negativo se preparó de la misma manera, excepto que el inóculo celular se reemplazó con tampón estéril. La promoción del crecimiento se evaluó midiendo el peso fresco de las plántulas, como se muestra en la Tabla 12. Para la soja, el peso de las plántulas se duplicó con el tratamiento H491. Para el sorgo, se observó un aumento del 64 % del peso fresco.

Tabla 12

	Control (Tampón)	Tratado con H491
Soja	5,46	11,22
Sorgo	0,89	1,46

10 Ejemplo 19: Actividad promotora del crecimiento en maíz

Las semillas de maíz se plantaron y se empaparon en el momento de la siembra y una semana después de la siembra con caldo celular completo (WCB) H491 de *B. megaterium*. Se plantaron y evaluaron un total de 10 plantas por maceta y 9 macetas por tratamiento. Se registró el peso fresco total 2 semanas después de la siembra, y se realizó un análisis estadístico usando Minitab ANOVA Tukey's.

Los resultados se muestran en la Tabla 13. En las plantas de maíz tratadas con WCB H491, se observó un aumento significativo en el peso fresco vegetativo, con un intervalo de confianza simultáneo del 95 % según la evaluación de Tukey.

Tabla 13

	Maíz Caldo celular completo	
	Control	H491
MED	21,48	30,07
DE	4,02	2,42

25 Ejemplo 20: Efecto del Compuesto 1 sobre la motilidad de nematodos

La fracción de HPLC H29 (Ejemplo 13 y Figura 8) se determinó que era ácido 4-fenilbutanoico. En este ejemplo, se sintetizó ácido 4-fenilbutanoico (Compuesto 1) y se probó la respuesta a la dosis en un ensayo de motilidad de nematodos. Los juveniles (J2) de *M. incognita* se expusieron a diferentes concentraciones de ácido 4-fenilbutadieno en una placa de fondo plano de 96 pocillos durante 24 horas. Los juveniles se transfirieron luego a placas de 6 pocillos que contenían agar agua al 1,5 % para permitir la recuperación. Después de otras 24 horas, la motilidad se determinó contando el número de juveniles (J2) que se habían mudado fuera del área inicial. Se utilizaron agua y DMSO como controles negativos, y Avid como control positivo.

Los resultados se muestran en la Figura 12. Usando la inmotilidad al 75 % como umbral para la actividad nematocida, las concentraciones de ácido 4-fenilbutanoico de 0,017 mg/ml o más proporcionaron una actividad nematocida sustancial.

40 Ejemplo 22: Actividad nematocida de tres aislados de *B. megaterium*

Se cultivaron aislados de *B. megaterium* H491, M018 y J142. El caldo celular completo de cada uno de los tres cultivos se probó en el ensayo de inmotilidad con agar agua descrito en el Ejemplo 21. Los resultados, que se muestran en la Figura 13, indican que el caldo celular completo de las tres cepas es capaz de hacer que el 100 % de los juveniles sean inmóviles.

45 DEPÓSITO DE MATERIAL BIOLÓGICO

El siguiente material biológico ha sido depositado conforme a los términos del Tratado de Budapest con la Colección de Cultivos de Investigación Agrícola (NRRL, por sus siglas en inglés), 1815 N. University Street, Peoria, Illinois 61604 USA, y se le ha dado el siguiente número:

Depósito	Número de registro	Fecha de depósito
<i>Bacillus megaterium</i> cepa H491	NRRL B-50769	3 de agosto de 2012
<i>Bacillus megaterium</i> cepa M018	NRRL B-50770	3 de agosto de 2012
<i>Bacillus megaterium</i> cepa J142	NRRL B-50771	3 de agosto de 2012

50 La cepa se ha depositado en condiciones que aseguran que el acceso al cultivo estará disponible durante la tramitación de esta solicitud de patente a una determinada por el Comisionado de Patentes y Marcas Registradas para tener derecho al mismo bajo 37 C.F.R. §1.14 y 35 U.S.C. §122. El depósito representa un cultivo sustancialmente puro de

la cepa depositada. El depósito está disponibles según lo exigen las leyes de patentes extranjeras en los países donde se presentan los homólogos de la solicitud objeto o sus descendientes. Sin embargo, debe entenderse que la disponibilidad de un depósito no constituye una licencia para practicar la invención objeto en la derogación de los derechos de patente concedidos por la acción gubernamental.

- 5
- REFERENCIAS**
- Aksoy, H.M. y Ozman-Sullivan, S.K., 2008, Isolation of *Bacillus megaterium* from *Aphis pomi* (Homoptera: aphididae) and assessment of its pathogenicity *J. Plant Pathology* 90:449-452
- 10 Asolkar, R. N., Jensen, P. R., Kauffman, C. A., Fenical, W. 2006. Daryamides A-C, Weakly Cytotoxic Polyketides from a Marine-Derived Actinomycete of the Genus *Streptomyces* strain CNQ-085 *J. Nat. Prod.* 69:1756-1759.
- 15 Damberg, M., Russ, P., Zeeck, A. (1982). Die constitution der fungistatischen ansamycin-antibiotics ansatrienin A und B. *Tetrahedron Lett.* 23, 59-62.
- Hebeda, R. E., Styrlund, C. R., Teague, W. M. (1988). Benefits of *Bacillus megaterium* amylase in dextrose production. *Starch* 40, 33-36.
- 20 Hu, X y Boyer, G. H. (1995). Isolation and characterization of the siderophore N-deoxyschizokinen from *Bacillus megaterium* ATCC 19213. *BioMetals*, 8, 357-64 (Japón. Patente 83 164 561. (1983)).
- Izawa, M., Wada, Y., Kasahara, F., Asai, M., Kishi, T. (1981). Hydroxylation of ansamitocin P-3. *J. Antibiot.*, 34 1591-1595.
- 25 Kittsteiner-Eberle, R., Ogbomo. I., Schmidt, H. L. (1989). Biosensing devices for the semi-automated control of dehydrogenase substrates in fermentations. *Biosensors* 4, 75-85.
- Komatsu, Y., Hayashi, H. (1998). Histone deacetylase inhibitors up-regulate the expression of cell surface MHC class -I molecules in B16/BL6 cells. *J. Antibiot.* 51, 89-91.
- 30 Martin, L., Prieto M. A., Cortes, E., Garcia, J. L. (1995). Cloning and sequencing of the pac gene encoding the penicillin G acylase of *Bacillus megaterium* ATCC 14945. *FEMS Microbiol Lett* 125, 287-292.
- 35 Metz, R. J., Allen, L. N., Cao, T. M., Zeman, N. W. (1988). Nucleotide sequence of an amylase gene from *Bacillus megaterium*. *Nucleic Acids Res.* 16, 5203.
- Nagao, T., Mitamura, T., Wang, X. H., Negoro, S., Yomo, T., Urabe, I., Okada, H. (1992). Cloning, nucleotide sequences, and enzymatic properties of glucose dehydrogenase isozymes from *Bacillus megaterium* IAM1030. *J. Bacteriol.* 174, 5013-5020.
- 40 Nakahama, K., Izawa, M., Asai, M., Kida, M., Kishi, T. (1981). Microbial conversion of anamitocin. *J. Antibiot.*, 34 1581-1586.
- 45 Nithya, C., Devi, M. G., Pamdian, S. K. 2011. A novel compound from the marine bacterium *Bacillus pumilus* S6-15 inhibits biofilm formation in gram-positive and gram-negative species. *Biofouling*, 27, 519-528.
- Plowman, J.E., Loehr, T. M., Goldman, S. J., Sanders-Loehr, J., (1984). Structure and siderophore activity of ferric Schizokinen. *J. Inorg. Biochem.*, 20, 183-186.
- 50 Shimada, N., Hasegawa, S., Harada, T., Tomisawa, T., Fujii, A., Takita, T. (1986). Oxetanocin, a novel nucleoside from bacteria, *J. Antibiot.*, 39, 1623-1625.
- Shimada, N., Hasegawa, S., Saito, S., Nishikiori, T., Fujii, A., Takita, T. (1987). Derivatives of oxetanocin: oxetanocins H, X, G and 2-aminooxetanocin A. *J. Antibiot.*, 40, 1788-1790.
- 55 Suga, K., Shiba, Y., Sorai, T., Shioya, S., Ishimura, F. (1990). Reaction kinetics and mechanism of immobilized penicillin acylase from *Bacillus megaterium*. *Ann N Y Acad Sci.* 613, 808-815.
- 60 Takaichi, S. (1990). Heterogeneous position of the double bonds of unsaturated fatty acids in carotenoid glucoside esters from *Rhodococcus rhodochrous* RNMS1. *Agric. Biol. Chem.*, 54, 2139-2140.
- Takasaki, Y. (1989). Novel maltose-producing amylase from *Bacillus megaterium* G-2. *Agric Biol Chem.* 53, 341-347.
- 65 Vandamme et al. Polyphasic taxonomic study of the emended genus *Arcobacter* with *Arcobacter butzleri* comb. nov. and *Arcobacter skirrowii* sp. nov., an aerotolerant bacterium isolated from veterinary specimens". *Int. J. Syst. Bacteriol.*

42: 344-356. 1992.

Vihinen, M., Mantsala, P. (1989). Microbial amylolytic enzymes. Crit Rev Biochem Mol Biol. 24, 329-418.

LISTADO DE SECUENCIAS

5

<110> Marrone Bio Innovations, Inc.

10

Asolkar, Ratnakar
Cordova-Kreylos, Ana
Rodriguez, Margarita
Todd, Carly
Wilk, Debora
Marrone, Pamela

15

<120> COMPOSICIONES BIOACTIVAS Y METABOLITOS DE BACILLUS MEGATERIUM

<130> MOI-42033-PCT

20

<150> 61683154
<151> 14/08/2012

25

<150> 13832407
<151> 15/03/2013

<160> 22

<170> PatentIn versión 3.5

30

<210> 1
<211> 1162
<212> ADN
<213> *Bacillus megaterium*

35

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(9)
<223> n es a, c, g o t

40

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(13)
<223> n es a, c, g o t

45

<220>
<221> misc_feature
<222> (867)..(867)
<223> n es a, c, g o t

50

<220>
<221> misc_feature
<222> (905)..(905)
<223> n es a, c, g o t

55

<220>
<221> misc_feature
<222> (986)..(987)
<223> n es a, c, g o t

60

<220>
<221> misc_feature
<222> (1005)..(1006)
<223> n es a, c, g o t

65

<220>
<221> misc_feature

<222> (1026)..(1026)
 <223> n e s a, c, g o t

5 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1047)..(1047)
 <223> n e s a, c, g o t

10 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1059)..(1060)
 <223> n e s a, c, g o t

15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1089)..(1089)
 <223> n e s a, c, g o t

20 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1098)..(1100)
 <223> n e s a, c, g o t

25 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1110)..(1112)
 <223> n e s a, c, g o t

30 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1115)..(1115)
 <223> n e s a, c, g o t

35 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1117)..(1117)
 <223> n e s a, c, g o t

40 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1121)..(1124)
 <223> n e s a, c, g o t

45 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1131)..(1131)
 <223> n e s a, c, g o t

50 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1133)..(1133)
 <223> n e s a, c, g o t

55 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1137)..(1138)
 <223> n e s a, c, g o t

60 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1143)..(1143)
 <223> n e s a, c, g o t

65 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1150)..(1150)

ES 2 773 957 T3

<223> n es a, c, g o t
 <220>
 <221> misc_feature
 5 <222> (1161)..(1162)
 <223> n es a, c, g o t
 <400> 1

 nnnnnnnnng nnnngctataa tgcaagtoga gcgaactgat tagaagcttg cttctatgac 60
 gtttagcggcg gacgggtgag taacacgtgg gcaacctgcc tgtaagactg ggataacttc 120
 gggaaaccga agctaatacc ggataggatc ttctccttca tgggagatga ttgaaagatg 180
 gtttcggcta tcacttacag atgggcccg ggtgcattag ctagttggtg aggtaacggc 240
 tcaccaaggc aacgatgcat agccgacctg agagggtgat cggccacact gggactgaga 300
 cacggcccag actcctacgg gaggcagcag tagggaatct tccgcaatgg acgaaagtct 360
 gacggagcaa cgccgcgtga gtgatgaagg ctttcgggtc gtaaaaactct gttgttaggg 420
 aagaacaagt acaagagtaa ctgcttgtag cttgacggta cctaaccaga aagccacggc 480
 taactacgtg ccagcagccg cggtaatag taggtggcaa gcgttatccg gaattattgg 540
 gcgtaaagcg cgcgcaggcg gtttcttaag tctgatgtga aagcccacgg ctcaaccgtg 600
 gagggtcatt ggaaactggg gaacttgagt gcagaagaga aaagcggaat tccacgtgta 660
 gcggtgaaat gcgtagagat gtggaggaac accagtggcg aaggcggctt tttggtctgt 720
 aactgacgct gaggcgcgaa agcgtgggga gcaaacagga ttagataccc tggtagtcca 780
 cgccgtaacg atgagtgcta agtgtagag ggtttccgcc ctttagtgct gcagctaacg 840
 cattaagcac tccgcctggg gagtacnggt cgcaagactg aaactcaaag gaattgacgg 900
 gggcncgcac aagcggtgga gcatgtggtt taattcgaag caacgcgaag aaccttacca 960
 ggtcttgaca tcctctgaca actctnngat agagcgttcc ccttnnggga cagagtgaca 1020
 ggtggngcat gggttgtcgt cagctcntgt cgtgagatnn tgggttaagt cccgcaacga 1080
 gcgcaacctn tgatctannn cagcattcan nnggnantct nnnngactgc ngntgannac 1140
 10 cgnagaaagn tggggatgac nn 1162

 <210> 2
 <211> 1133
 <212> ADN
 15 <213> *Bacillus megaterium*

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(15)
 20 <223> n es a, c, g o t

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (916)..(916)
 25 <223> n es a, c, g o t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (923)..(923)
 <223> n es a, c, g o t
 5
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (957)..(957)
 <223> n es a, c, g o t
 10
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (959)..(959)
 <223> n es a, c, g o t
 15
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (971)..(971)
 <223> n es a, c, g o t
 20
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1004)..(1005)
 <223> n es a, c, g o t
 25
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1012)..(1012)
 <223> n es a, c, g o t
 30
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1015)..(1015)
 <223> n es a, c, g o t
 35
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1031)..(1031)
 <223> n es a, c, g o t
 40
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1035)..(1036)
 <223> n es a, c, g o t
 45
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1047)..(1048)
 <223> n es a, c, g o t
 50
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1055)..(1056)
 <223> n es a, c, g o t
 55
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1060)..(1063)
 <223> n es a, c, g o t
 60
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1066)..(1066)
 <223> n es a, c, g o t
 65
 <220>

<221> misc_feature
 <222> (1068)..(1068)
 <223> n es a, c, g o t

5

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1074)..(1074)
 <223> n es a, c, g o t

10

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1076)..(1076)
 <223> n es a, c, g o t

15

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1078)..(1078)
 <223> n es a, c, g o t

20

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1092)..(1093)
 <223> n es a, c, g o t

25

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1095)..(1095)
 <223> n es a, c, g o t

30

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1098)..(1098)
 <223> n es a, c, g o t

35

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1106)..(1106)
 <223> n es a, c, g o t

40

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1111)..(1111)
 <223> n es a, c, g o t

45

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1113)..(1113)
 <223> n es a, c, g o t

50

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1118)..(1120)
 <223> n es a, c, g o t

55

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1125)..(1125)
 <223> n es a, c, g o t

60

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1127)..(1127)
 <223> n es a, c, g o t

65

<220>
 <221> misc_feature

ES 2 773 957 T3

<222> (1129)..(1133)
 <223> n e s a, c, g o t

<400> 2

5

```

nnnnnnnnnn nnnnncgact tcacccaat catctgtccc accttagggc gctagctcct      60
tacggttact ccaccgactt cgggtgttac aaactctcgt ggtgtgacgg gcgggtgtgta      120
caaggcccgg gaacgtattc accgcgcat gctgatccgc gattactagc gattccagct      180
tcatgtaggc gagttgcagc ctacaatccg aactgagaat ggttttatgg gattggcttg      240
acctcgcggt cttgcagccc tttgtacat ccattgtagc acgtgtgtag cccaggtcat      300
aaggggcatg atgatttgac gtcacccca ccttcctccg gtttgtcacc ggcagtcacc      360
ttagagtgcc caactgaatg ctggcaacta agatcaaggg ttgcgctcgt tgcgggactt      420
aaccaacat ctcacgacac gagctgacga caaccatgca ccacctgtca ctctgtcccc      480
cgaaggggaa cgctctatct ctagagttgt cagaggatgt caagacctgg taaggttctt      540
cgcgttgctt cgaattaaac cacatgctcc accgcttctg cgggcccccg tcaattcctt      600
tgagtttcag tcttgcgacc gtactcccca ggcggagtgc ttaatgcggt agctgcagca      660
ctaaagggcg gaaaccctct aacacttagc actcatcgtt tacggcgtgg actaccaggg      720
tatctaatec tgtttgctcc ccacgcttcc gcgcctcagc gtcagttaca gaccaaaaag      780
ccgccttcgc cactggtggt cctccacatc tctacgcatt tcaccgctac acgtggaatt      840
ccgcttttct cttctgcact caagttcccc agtttccaat gaccctccac ggttgagccg      900
tgggctttca catcanactt aanaaacgc ctgcgcgcgc tttagccca ataattncng      960
ataacgcttg ncacctacgt attaccgagg ctgctggcac gtanntagcc gnggntttct     1020
ggttaggtag ngtcnnggta caagcannta ctctnnactn nnnttncnta acananantt     1080
tacgaccgca annctcctc actcangcgc ntngctcnnn cagantntnn nnn              1133
  
```

<210> 3
 <211> 1451
 <212> ADN
 <213> *Bacillus megaterium*

10

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (852)..(852)
 <223> n e s a, c, g o t

15

<400> 3

ES 2 773 957 T3

ataatgcaag tcgagcgaac tgattagaag cttgcttcta tgacgttagc ggcggacggg 60
 tgagtaacac gtgggcaacc tgcctgtaag actgggataa cttcgggaaa ccgaagctaa 120
 taccggatag gatcttctcc ttcattgggag atgattgaaa gatggtttcg gctatcactt 180
 acagatgggc ccgcggtgca ttagctagtt ggtgaggtaa cggctcacca aggcaacgat 240
 gcatagccga cctgagaggg tgatcggcca cactgggact gagacacggc ccagactcct 300
 acgggaggca gcagtaggga atcttcogca atggacgaaa gtctgacgga gcaacgccgc 360
 gtgagtgatg aaggctttcg ggtcgtaaaa ctctgttgtt agggaagaac aagtacaaga 420
 gtaactgctt gtacctgac ggtacctaac cagaaagcca cggctaacta cgtgccagca 480
 gccgcggtaa tacgtaggtg gcaagcgta tccggaatta ttgggcgtaa agcgcgcgca 540
 ggcggtttct taagtctgat gtgaaagccc acggctcaac cgtggagggt catttgaaac 600
 tggggaactt gagtgcagaa gagaaaagcg gaattccacg tgtagcggtg aaatgcgtag 660
 agatgtggag gaacaccagt ggcgaaggcg gctttttggt ctgtaactga cgctgaggcg 720
 cgaaagcgtg gggagcaaac aggattagat accctggtag tccacgccgt aaacgatgag 780
 tgctaagtgt tagagggtt ccgcccttta gtgctgcagc taacgcatta agcactccgc 840
 ctggggagta cnggtcgcaa gactgaaact caaaggaatt gacggggggc cgcaacaagc 900
 gtggagcatg tggtttaatt cgaagcaacg cgaagaacct taccaggtct tgacatcctc 960
 tgacaactct agagatagag cgttcccctt cgggggacag agtgacaggt ggtgcatggt 1020
 tgtcgtcagc tcgtgtcgtg agatgttggg ttaagtcccg caacgagcgc aacccttgat 1080
 cttagtggcc agcattcagt tgggcaactc aaggtgactg ccggtgacaa accggaggaa 1140
 ggtggggatg acgtcaaatc atcatgcccc ttatgacctg ggctacacac gtgctacaat 1200
 ggatggtaca aaggctgca agaccgcgag gtcaagccaa tcccataaaa ccattctcag 1260
 ttcggattgt aggctgcaac tcgcctacat gaagctggaa tcgctagtaa tcgcgatca 1320
 gcatgccgcg gtgaatacgt tcccgggctc tgtacacacc gcccgtcaca ccacgagagt 1380
 ttgtaacacc cgaagtcggt ggagtaaccg taaggagcta gccgcctaag gtgggacaga 1440
 tgattggggt g 1451

<210> 4
 <211> 1212
 <212> ADN
 <213> *Bacillus megaterium*

 <400> 4

5

ES 2 773 957 T3

gctatactgc aagtcgagcg aactgataga agcttgcttc tatgacgttg cggcggacgg 60
 gtgagtaaca cgtgggcaac ctgcctgtaa gactgggata acttcgggaa accgaagcta 120
 ataccggata ggatcttctc cttcatggga gatgattgaa agatggtttc ggctatcact 180
 tacagatggg cccgcggtgc attagctagt tggtagagta acggctcacc aaggccacga 240
 tgcatagccg acctgagagg gtgatcggcc aactgggac tgagacacgg cccagactcc 300
 tacgggaggg agcagtaggg aatcttccgc aatggacgaa agtctgacgg agcaacgccg 360
 cgtgagtgat gaaggctttc gggtcgtaaa actctgttgt tagggaagaa caagtacaag 420
 agtaactgct tgtaccttga cggtacctaa ccagaaagcc acggctaact acgtgccagc 480
 agccgcggta atacgtaggt ggcaagcgtt atccggaatt attgggcgta aagcgcgcgc 540
 aggcggtttc ttaagtctga tgtgaaagcc cacggctcaa ccgtggaggg tcattggaaa 600
 ctggggaact tgagtgcaga agagaaaagc ggaattccac gtgtagcggg gaaatgcgta 660
 gagatgtgga ggaacaccag tggcgaaggc ggctttttgg tctgtaactg acgctgaggg 720
 gcgaaagcgt ggggagcaaa caggattaga taccctggta gtccacgccg taacgatgag 780
 tgctaagtgt tagagggttt cgccttcta gtgctgcagc taacgcatta agcactccgc 840
 ctggggagta cggtcgcaag actgaaactc aaaggaattg acgggggccc gcacaagcgg 900
 tggagcatgt ggtttaattc gaagcaacgc gaagaacctt accaggtctt gacatcctct 960
 gacaactcta gagatagagc gttccccttc gggggacaga gtgacaggtg gtgcatgggt 1020
 tgtcgtcagc tcgtgtcgtg agatgttggg ttaagtcccg caacgagcgc aacccttga 1080
 tcttagttgc cagcatttag tgggactctt aaggtgactg ccggtgacaa cgagaaggtg 1140
 gggatgacgt cgaatcatca tgccccttak gacctggggc twcacamcgk tgcywacaak 1200
 ggaattgggt ac 1212

<210> 5
 <211> 1089
 <212> ADN
 <213> *Bacillus megaterium*

5

<400> 5

ES 2 773 957 T3

tgttacgact	tcacccaat	catctgtccc	accttaggcg	gctagctcct	tacggttact	60
ccaccgactt	cgggtgttac	aaactctcgt	ggtgtgacgg	gcggtgtgta	caaggcccgg	120
gaacgtattc	accgcggcat	gctgatccgc	gattacyagc	gattcctgct	tcatgtaggc	180
kagttgcagc	ctacaatccg	aactgagaat	ggttttatgg	gattggcttg	acctcgcggt	240
cttgacagccc	tttgtaccat	ccattgtagc	acgtgtgtag	cccaggcat	aaggggcatg	300
atgatttgac	gtcatcccca	ccttcctccg	gtttgtcacc	ggcagtcacc	ttagagtgcc	360
caactaaatg	ctggcaacta	agatcaaggg	ttgcgctcgt	tgcgggactt	aaccaacat	420
ctcacgacac	gagctgacga	cmaccatgca	ccacctgtca	ctctgtcccc	cgaaggggaa	480
cgctctatct	ctagagttgt	cagaggatgt	caagacctgg	taaggttctt	cgcgttgctt	540
cgaattaaac	cacatgctcc	accgcttgtg	cgggcccccg	tcaattcctt	tgagtttcag	600
tcttgcgacc	gtactcccca	ggcggagtgc	ttaatgcggt	agctgcagca	ctaaagggcg	660
gaaaccctct	aacacttagc	actcatcggt	tacggcgtgg	actaccaggg	tatctaatac	720
tgtttgctcc	ccacgctttc	gcgccctcagc	gtcagttaca	gaccaaaaag	ccgccttcgc	780
cactgggtgtt	cctccacatc	tctacgcatt	tcaccgctac	acgtggaaat	ccgcttttct	840
cttctgcact	caagttcccc	agtttccaat	gaccctccac	ggttgagccg	tgggctttca	900
catcagactt	aagaaaccgc	ctgcgcgcgc	tttacgcca	ataattcaga	taacgctcgc	960
cacctacgta	ttaccgcgct	gctggcacgt	agttagccgt	ggctttctgg	ttagtaccgt	1020
cagtacagca	gtactctgta	cttgttcttc	ctaacaacag	agtttacgac	ccgaaagcct	1080
tcatcattc						1089

<210> 6
 <211> 1462
 <212> ADN
 <213> *Bacillus megaterium*

5

<400> 6

ES 2 773 957 T3

gctatactgc aagtcgagcg aactgataga agcttgcttc tatgacgttg cggcggacgg 60
 gtgagtaaca cgtgggcaac ctgcctgtaa gactgggata acttcgggaa accgaagcta 120
 ataccgata ggatcttctc cttcatggga gatgattgaa agatggtttc ggctatcact 180
 tacagatggg cccgcggtgc attagctagt tggtgaggta acggctcacc aaggccacga 240
 tgcatagccg acctgagagg gtgatcgcc acactgggac tgagacacgg cccagactcc 300
 tacgggaggg agcagtaggg aatcttccgc aatggacgaa agtctgacgg agcaacgccg 360
 cgtgagtgat gaaggctttc gggtcgtaaa actctgttgt tagggaagaa caagtacaag 420
 agtaactgct tgtacctga cggtagctaa ccagaaagcc acggctaact acgtgccagc 480
 agccgcggta atacntaggt ggcragcgtt atcyggaatt attgggcgta aagcgcgcgc 540
 aggcggtttc ttaagtctga tgtgaaagcc cacggctcaa ccgtggaggg tcattggaaa 600
 ctggggaact tgagtgcaga agagaaaagc ggawttccac gtgtagcggg gaaatgcgta 660
 gagatgtgga ggaacaccag tggcgaaggc ggctttttgg tctgtaactg acgctgaggg 720
 gcgaaagcgt ggggagcaaa caggattaga taccctggta gtccacgccg taaacgatga 780
 gtgctaagtg ttagaggggt tccgcccttt agtgctgcag ctaacgcatt aagcactccg 840
 cctggggagt acgtcgcaa gactgaaact caaaggaatt gacgggggcc cgcacaagcg 900
 gtggagcatg tggtttaatt cgaagcaacg cgaagaacct taccaggtct tgacatcctc 960
 tgacaactct agagatagag cgttcccctt cgggggacag agtgacaggt ggtgcatggt 1020
 kgtcgtcagc tcgtgctgtg agatgttggg ttaagtcccg caacgagcgc aacccttgat 1080
 cttagttgcc agcatttagt tgggcactct aaggtgactg ccggtgacaa accggaggaa 1140
 ggtggggatg acgtcaaatac atcatgcccc ttatgacctg ggctacacac gtgctacaat 1200
 ggatggtaca aaggctgca agaccgcgag gtcaagccaa tcccataaaa ccattctcag 1260
 ttcggattgt aggctgcaac tmgcctacat gaagcaggaa tcgctrghaa tcgcggatca 1320
 gcatgccgcg gtgaatacgt tcccggcct tgtacacacc gcccgtcaca ccacgagagt 1380
 ttgtaacacc cgaagtcggt ggagtaaccg taaggagcta gccgcctaag gtgggacaga 1440
 tgattggggg gaagtcgtaa ca 1462

5
 <210> 7
 <211> 1229
 <212> ADN
 <213> *Bacillus megaterium*
 <400> 7

ES 2 773 957 T3

tgctataatg cagtcgagcg aactgattag aagcttgctt ctatgacgtt agcggcggac	60
gggtgagtaa cacgtgggca acctgcctgt aagactggga taacttcggg aaaccgaagc	120
taataccgga taggatcttc tccttcatgg gggatgattg aaagatggtt tcggctatca	180
cttacagatg ggcccgcggt gcattagcta gttggtgagg taacggctca ccaaggcmac	240
gatgcatagc cgacctgaga gggatgatcg ccacactggg actgagacac ggcccagact	300
cctacgggag gcagcagtag ggaatcttcc gcaatggacg aaagtctgac ggagcaacgc	360
cgcgtagtg atgaaggctt tcgggtcgta aaactctggt gttagggag aacaagtacr	420
agagtaactg cttgtacctt gacggtacct aaccagaaag ccacggctaa ctacgtgcca	480
gcagccgagg taatacgtag gtggcaagcg ttatccggaa ttattgggag taaagcgcgc	540
gcagggcgggt tcttaagtct gatgtgaaag cccacggctc aaccgtggag ggtcattgga	600
aactggggaa cttgagtgca gaagagaaaa gcggaattcc acgtgtagcg gtgaaatgcg	660
tagagatgtg gaggaacacc agtggcgaag gcggcttttt ggtctgtaac tgacgctgag	720
gcgcgaaagc gtggggagca aacaggatta gataccctgg tagtccacgc cgtaaacgat	780
gagtgctaag tgtagaggg tttccgccct ttagtgctgc agctaacgca ttaagcactc	840
cgctggggga gtacggtcgc aagactgaaa ctcaaaggaa ttgacggggg cccgcacaag	900
cggtggagca tgtggtttaa ttcgaagcaa cgcgagaacc ttaccaggtc ttgacatcct	960
ctgacactct agagatagag cgttcccctt cgggggacag agtgacagtg tgcatgggtg	1020
cgtcagctcg tgtcgtgaga tgtggtagt cccgcacgag cgcacctgat ctagtgcagc	1080
attagtggca ctctagtac tgcgtgacac gaggaggtgg gatgacgtca tcatcatgcc	1140
cctatgactg ggctaccacg tgctacatgg atgtcaaggc tgcagaccga agtcagcaat	1200
cataaacatt ctcagtcgaa tgtaagtca	1229

<210> 8
 <211> 1224
 <212> ADN
 <213> *Bacillus megaterium*
 <400> 8

5

ES 2 773 957 T3

cttgttcgac ttcccccaat catctgtccc accttaggcg gctagctcct tacggttact 60
 ccaccgactt cgggtgttac aaactctcgt ggtgtgacgg gcggtgtgta caaggcccgg 120
 gaacgtattc accgcggcat gctgatccgc gattactagc gattccagct tcatgtaggc 180
 gagttgcagc ctacaatccg aactgagaat ggttttatgg gattggcttg acctcgcggt 240
 cttgcagccc tttgtacat ccatgtagc acgtgtgtag cccaggcat aaggggcatg 300
 atgatttgac gtcacccca ccttcctcgg gtttgtcacc ggcagtcacc ttagagtgcc 360
 caactaaatg ctggcaacta agatcaaggg ttgcgctcgt tgcgggactt aaccaacat 420
 ctcacgacac gagctgacga caacatgca ccacctgtca ctctgtcccc cgaaggggaa 480
 cgctctatct ctagagttgt cagaggatgt caagacctgg taaggttctt cgcgttgctt 540
 cgaattaaac cacatgctcc accgcttggc cgggccccgg tcaattcctt tgagttcag 600
 tcttgcgacc gtactcccca ggcggagtgc ttaatgcgtt agctgcagca ctaaagggcg 660
 gaaaccctct aacacttagc actcatcgtt tacggcgtgg actaccaggg tatctaacc 720
 tgtttgctcc ccacgctttc gcgcctcagc gtcagttaca gaccaaaaag ccgccttcgc 780
 cactggtggt cctccacatc tctacgcatt tcaccgctac acgtggaatt ccgcttttct 840
 cttctgcaact caagttcccc agtttccaat gaccctccac ggttgagccg tggggctttc 900
 acatcagact taagaaaccg cctgcgcgcg ctttacgccc aataattccc ggataacgct 960
 tgccacctac gtattaccgc ggctgctggc acgtagttag ccgtggcttt ctggttaggt 1020
 accgtcgagg tacaagcagt tactctcgta cttgtcttcc ctaacacaga gttttacgac 1080
 ccgaagctca tcactcagcg cgtgctcgtc gacttcgtca ttgcgagatc cctactgctg 1140
 cttccgtagg agtctggacc tgtctcagtc aggtgtgacg gatcaccctc ttcagtcgcc 1200
 tatgtgccac tctcgtgggt cccg 1224

<210> 9
 <211> 1466
 <212> ADN
 <213> *Bacillus megaterium*

5

<400> 9

tgctataatg cagtcgagcg aactgattag aagcttgctt ctatgacggt agcggcggac 60
 gggtgagtaa cacgtgggca acctgcctgt aagactggga taacttcggg aaaccgaagc 120
 taataccgga taggatcttc tccttcatgg gggatgattg aaagatggtt tcggctatca 180
 cttacagatg ggcccgcggt gcattagcta gttggtgagg taacggctca ccaaggcmac 240

10

ES 2 773 957 T3

gatgcatagc cgacctgaga gggatgatcgg ccacactggg actgagacac ggcccagact 300
 cctacgggag gcagcagtag ggaatcttcc gcaatggacg aaagtctgac ggagcaacgc 360
 cgcgtgagtg atgaaggctt tcgggtcgtg aaactctggt gttagggaag aacaagtacg 420
 agagtaactg cttgtaccty gacggtacct aaccagaaag ccacggctaa ctacgtgcca 480
 gcagccgcgg taatacgtag gtggcaagcg ttatccggga attattgggc gtaaagcgcg 540
 cgcagggcgg ttottaagtc tgatgtgaaa gccccacggc tcaaccgtgg agggtcattg 600
 gaaactgggg aacttgagtg cagaagagaa aagcgggaatt ccacgtgtag cggtgaaatg 660
 cgtagagatg tggaggaaca ccagtggcga aggcggcttt ttggtctgta actgacgctg 720
 aggcgcgaaa gcgtggggag caaacaggat tagataccct ggtagtccac gccgtaaacg 780
 atgagtgcta agtgtttagag ggtttccgcc cttagtgct gcagctaacg cattaagcac 840
 tccgcctggg gagtacggtc gcaagactga aactcaaagg aattgacggg ggcccgcaca 900
 agcggtgagg catgtggttt aattcgaagc aacgcgaaga acctaccag gtcttgacat 960
 cctctgacaa ctctagagat agagcgttcc ccttcggggg acagagtgac aggtggtgca 1020
 tggttgtcgt cagctcgtgt cgtgagatgt tgggttaagt cccgcaacga gcgcaaccct 1080
 tgatcttagt tgccagcatt tagttgggca ctctaagggtg actgccggtg acaaaccgga 1140
 ggaagtgagg gatgacgtca aatcatcatg ccccttatga cctgggctac acacgtgcta 1200
 caatggatgg tacaagggc tgcaagaccg cgaggtaag ccaatcccat aaaaccattc 1260
 tcagttcggg ttgtaggctg caactcgcct acatgaagct ggaatcgcta gtaatcgcgg 1320
 atcagcatgc cgcgggtgaat acgttcccgg gccttgatca caccgcccgt cacaccacga 1380
 gagtttghaa caccggaagt cgggtggagta accgtaagga gctagccgcc taagggtggga 1440
 cagatgattg ggggaagtcg aacaag 1466

5 <210> 10
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Cebador 27F - secuencia sintetizada hecha en laboratorio
 <400> 10
 agagttgat cmtggctcag 20

15 <210> 11
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> 1525R - Secuencia sintetizada hecha en laboratorio
 <400> 11
 aaggaggtgw tccarcc 17

ES 2 773 957 T3

<210> 12
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> recAf Secuencia sintetizada hecha en laboratorio
 <400> 12
 gatcgtcarg cagscytwga t 21
 <210> 13
 <211> 20
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> recAr - secuencia sintetizada hecha en laboratorio
 20 <400> 13
 ttwccracca taacsccrac 20
 <210> 14
 <211> 562
 25 <212> ADN
 <213> *Bacillus megaterium*
 <220>
 <221> misc_feature
 30 <222> (551)..(551)
 <223> n es a, c, g o t
 <400> 14
 tgaaagcatt tggtaaggtt caattatgaa attaggtgaa caaacggaaa aaagaatttc 60
 tacaattcca agtggttcat tggcgttaga tatagcctta ggtgtaggtg gatatccacg 120
 tggacgtgta gttgaagtat atggtccaga aagctcaggt aaaacaacag ttgctcttca 180
 tgcgattgca gaagttcaac agcagggcgg acaggctgca tttatcgatg cggagcacgc 240
 gttagatcct gtatatgctc aaaaattagg tgtgaatatt gatgagctat tattatctca 300
 gcctgatacg ggagaacaag ctttagaaat cgctgaagct ttagttcgaa gcggtgcagt 360
 agatattatc gttggtgact cagtagcagc attagtcca aaagcggaaa ttgaaggaga 420
 aatgggagac tctcacgtgg gtctacaagc tcgtttaatg tctcaagcat tgcgtaaact 480
 atctggagct atcaataagt ctaaaacaat cgctatcttt attaaccaaa ttcgtgaaaa 540
 35 agtcggcgtt ngggtcggaa aa 562
 <210> 15
 <211> 558
 <212> ADN
 40 <213> *Bacillus megaterium*
 <400> 15

ES 2 773 957 T3

gwagcgattg ttttagactt attgatagct ccagatagtt tacgcaatgc ttgagacatt 60
 aaackagctt gtagaccac gtgagagtct cccatttctc cttcaatttc cgcttttggc 120
 actaatgctg ctactgagtc aacaacgata atatctactg caccgcttcg aactaaagct 180
 tcagcgattt ctaaagcttg ttctcccgta tcaggctgag ataataatag ctcatcaata 240
 ttcacaccta atttttgagc atatacagga tctaacgcgt gctccgcacg gataaatgca 300
 gcctgtccgc cctgctggtg aacttctgca atcgcatgaa gagcaactgt tgttttacct 360
 gagctttctg gaccatatac ttcaactaca cgtccacgtg gatatccacc tacacctaag 420
 gctatatcta acgccaatga accacttgga attgtagaaa ttcttttttc cgtttgttca 480
 cctaatttca taattgaacc tttaccaaat tgcttttcaa tttgttttaa agccatatac 540
 aagcctgcww wgacgatc 558

<210> 16
 <211> 500
 <212> ADN
 <213> *Bacillus megaterium*

5

<400> 16

aaggttcaat tatgaaatta ggtgaacaaa cggaaaaaag aatttctaca attccaagtg 60
 gttcattggc gttagatata gccttaggtg taggtggata tccacgtgga cgtgtagttg 120
 aagtatatgg tccagaaagc tcaggtaaaa caacagttgc tcttcatgcg attgcagaag 180
 ttcaacagca gggcggacag gctgcattta tcgatgcgga gcacgcgta gatcctgtat 240
 atgctcaaaa attaggtgtg aatattgatg agctattatt atctcagcct gatacgggag 300
 aacaagcttt agaaatcgct gaagcttag ttcgaagcgg tgcagtagat attatcgttg 360
 ttgactcagt agcagcatta gtgccaaaag cggaaattga aggagaaatg ggagactctc 420
 acgtgggtct acaagctcgt ttaatgtctc aagcattgcg taaactatct ggagctatca 480
 ataagtctaa aacaatcgct 500

10

<210> 17
 <211> 564
 <212> ADN
 <213> *Bacillus megaterium*

15

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (552)..(552)
 <223> n e s a , c , g o t

20

<400> 17

ES 2 773 957 T3

ttgaagcatt tggtaaaggt tcaattatga aattaggtga acaaacggaa aaaagaattt 60
ctacaattcc aagtggttca ttagcgttag atatagcttt aggtgtaggt ggatatccac 120
gtggacgcgt agttgaagta tatggtccag aaagctcagg taaaacaaca gttgctcttc 180
atgcgattgc agaagttcaa cagcagggcg gacaggctgc atttatcgat gcggagcacg 240
cgttagatcc tgtatatgct caaaaattag gtgtgaatat tgatgagcta ttattatctc 300
agcctgatac gggagaacaa gctttagaaa tcgctgaagc tttagttcga agcgggtgcag 360
tagatattat cgttggtgac tcagtagcag cattagtgcc aaaagcggaa attgaaggag 420
aaatgggaga ctctcacgtg ggtctacaag ctcgtttaat gtctcaagca ttgcgtaaac 480
tatctggagc tatcaacaag tctaaaacaa tcgctatctt tattaaccaa attcgtgaaa 540
aagtcggcgt tngggttcgg aaaa 564

<210> 18
<211> 570
<212> ADN
<213> *Bacillus megaterium*

5

<400> 18

ggtataaaga taggcgattg ttttagactt gttgatagct ccagatagtt tacgcaatgc 60
ttgagacatt aaacgagctt gtagaccac gtgagagtct cccatttctc cttcaatttc 120
cgcttttggc actaatgctg ctactgagtc aacaacgata atatctactg caccgcttcg 180
aactaaagct tcagcgattt ctaaagcttg ttctcccgta tcaggctgag ataataatag 240
ctcatcaata ttcacaccta atttttgagc atatacagga tctaacgcgt gctccgcac 300
gataaatgca gcctgtccgc cctgctggtg aacttctgca atcgcatgaa gagcaactgt 360
tgttttacct gagctttctg gaccatatac ttcaactacg cgtccacgtg gatatccacc 420
tacacctaaa gctatatcta acgctaatga accacttgga attgtagaaa ttcttttttc 480
cgtttggttca cctaatttca taattgaacc tttaccaaat tgcttttcaa tttgttttaa 540
agccatataw aagcctaaww rgacgatcya 570

10

<210> 19
<211> 498
<212> ADN
<213> *Bacillus megaterium*

15

<400> 19

ES 2 773 957 T3

aaggttcaat tatgaaatta ggtgaacaaa cggaaaaaag aatttctaca attccaagtg 60
 gttcattagc gttagatata gctttaggtg taggtggata tccacgtgga cgcgtagttg 120
 aagtatatgg tccagaaagc tcaggtaaaa caacagttgc tcttcatgcg attgcagaag 180
 ttcaacagca gggcggacag gctgcattta tcgatgcgga gcacgcgta gatcctgtat 240
 atgctcaaaa attaggtgtg aatattgatg agctattatt atctcagcct gatacgggag 300
 aacaagcttt agaaatcgct gaagcttttag ttcgaagcgg tgcahtagat attatcgttg 360
 ttgactcagt agcagcatta gtgccaaaag cggaaattga aggagaaatg ggagactctc 420
 acgtgggtct acaagctcgt ttaatgtctc aagcattgcg taaactatct ggagctatca 480
 acaagtctaa acaatcg 498

5 <210> 20
 <211> 561
 <212> ADN
 <213> *Bacillus megaterium*

10 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (550)..(550)
 <223> n e s a, c, g o t

<400> 20

gaaagcattt ggtaaggttc aattatgaaa ttaggtgaac aaacggaaaa aagaatttct 60
 acaattccaa gtggttcatt agcgttagat atagccttag gtgtaggtgg atatccacgt 120
 ggacgtgtag ttgaagtata tgggccagaa agctcaggta aaacaacagt tgctcttcat 180
 gcgattgcag aagttcaaca gcagggcgga caggctgcat ttatcgatgc ggagcacgcg 240
 ttagatcctg tatatgctca aaaattaggt gtgaatattg atgagctatt attatctcag 300
 cctgatacgg gagaacaagc tttagaaatc gctgaagctt tagttcgaag cgggtgcagta 360
 gatattatcg ttgttgactc agtagcagca ttagtgccaa aagcggaaat tgaaggagaa 420
 atgggagact ctcacgtggg tctacaagct cgtttaatgt ctcaagcatt gcgtaaaacta 480
 tctggagcta tcaataagtc taaaacaatc gctatcttta ttaaccaaat tcgtgaaaaa 540
 15 gtcggcgtnn gggtcggaaa a 561

20 <210> 21
 <211> 557
 <212> ADN
 <213> *Bacillus megaterium*

<400> 21

ES 2 773 957 T3

agcgattggt ttagacttat tgatagctcc agatagttaa cgcaatgctt gagacattaa 60
 acgagcttgt agaccacagt gagagtctcc catttctcct tcaatttccg cttttggcac 120
 taatgctgct actgagtcaa caacgataat atctactgca ccgcttcgaa ctaaagcttc 180
 agcgatttct aaagcttgtt ctcccgtatc aggctgagat aataatagct catcaatatt 240
 cacacctaatt ttttgagcat atacaggatc taacgcgtgc tccgcatcga taaatgcagc 300
 ctgtccgccc tgctgttgaa cttctgcaat cgcatgaaga gcaactggtg ttttacctga 360
 gctttctgga ccatatactt caactacagc tccacgtgga tatccaccta cacctaaggc 420
 tatatctaac gctaataaac cacttggaat tgtagaaatt cttttttccg tttgttcacc 480
 taatttcata attgaacctt taccaaattg cttttcaatt tgttttaag ccatatcaaa 540
 gcctgctraa cratcaa 557

<210> 22
 <211> 500
 <212> ADN
 <213> *Bacillus megaterium*

5

<400> 22

aaggttcaat tatgaaatta ggtgaacaaa cggaaaaaag aatttctaca attccaagtg 60
 gttcattagc gttagatata gccttaggtg taggtggata tccacgtgga cgtgtagttg 120
 aagtatatgg tccagaaagc tcaggtaaaa caacagttgc tcttcatgcg attgcagaag 180
 ttcaacagca gggcggacag gctgcattta tcgatgcgga gcacgcgta gatcctgtat 240
 atgctcaaaa attaggtgtg aatattgatg agctattatt atctcagcct gatacgggag 300
 aacaagcttt agaaatcgct gaagctttag ttcgaagcgg tgcagtagat attatcgttg 360
 ttgactcagt agcagcatta gtgccaaaag cggaaattga aggagaaatg ggagactctc 420
 acgtgggtct acaagctcgt ttaatgtctc aagcattgcg taaactatct ggagctatca 480
 ataagtctaa aacaatcgct 500

10

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende
 - 5 a) un sobrenadante, filtrado, extracto o caldo celular completo recogido del cultivo de *Bacillus megaterium* H491 (n.º de registro NRRL B-50769), en donde dicho sobrenadante, filtrado, extracto o caldo celular completo tiene actividad de promoción de crecimiento de plantas o plaguicida; y
 - b) al menos uno de un vehículo, diluyente, tensioactivo o adyuvante.
- 10 2. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además un plaguicida seleccionado del grupo que consiste en un nematocida, un fungicida y un insecticida.
3. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicha cepa de *B. megaterium* H491 (número de registro NRRL B-50769) produce ácido 4-fenilbutanoico.
- 15 4. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la composición está presente en una formulación seleccionada del grupo que consiste en un concentrado emulsionable, un polvo humectable, un líquido soluble, un aerosol, una solución concentrada de volumen ultra-bajo, un polvo soluble, una microencapsulación, gránulos dispersos en agua,
- 20 un fluido, una microemulsión y una nanoemulsión.
5. Un método para modular la infestación de plagas en una planta, comprendiendo el método aplicar a la planta o semillas de la misma o sustrato usado para cultivar dicha planta, una cantidad de la composición de las reivindicaciones 1-2 eficaz para modular dicha infestación de plagas.
- 25 6. Un método para aislar un compuesto que comprende ácido 4-fenilbutanoico, en donde el método comprende las etapas de:
 - 30 a) cultivar un *Bacillus megaterium* H491 (número de registro NRRL B-50769) durante un tiempo y a una temperatura suficiente para producir dicho compuesto; y
 - b) aislar dicho compuesto producido en (a) a partir de dicho cultivo.
7. Una semilla que comprende la composición de la reivindicación 1.
- 35 8. Un método para modular (i) el crecimiento de una planta, o (ii) la germinación de una semilla de dicha planta, comprendiendo el método poner en contacto dicha planta o su semilla o su sustrato de crecimiento con la composición de la reivindicación 1 o 2 en una cantidad de dicha composición eficaz para modular dicho crecimiento de dicha planta y/o germinación de dicha semilla.
- 40 9. El método de acuerdo con la reivindicación 8, en donde dicha planta comprende fresa, calabaza, pepino, tomate, rosa, pimiento, berenjena, vid, algodón, cebolla, ajo, trigo, soja, maíz o arroz.
10. El método de acuerdo con la reivindicación 8, que comprende además trasplantar dicha planta en dicho sustrato de crecimiento.
- 45 11. El método de acuerdo con la reivindicación 10, en donde antes de trasplantar dicha planta en dicho sustrato de crecimiento, una o más raíces de dicha planta se tratan con dicha composición.

Figura 1

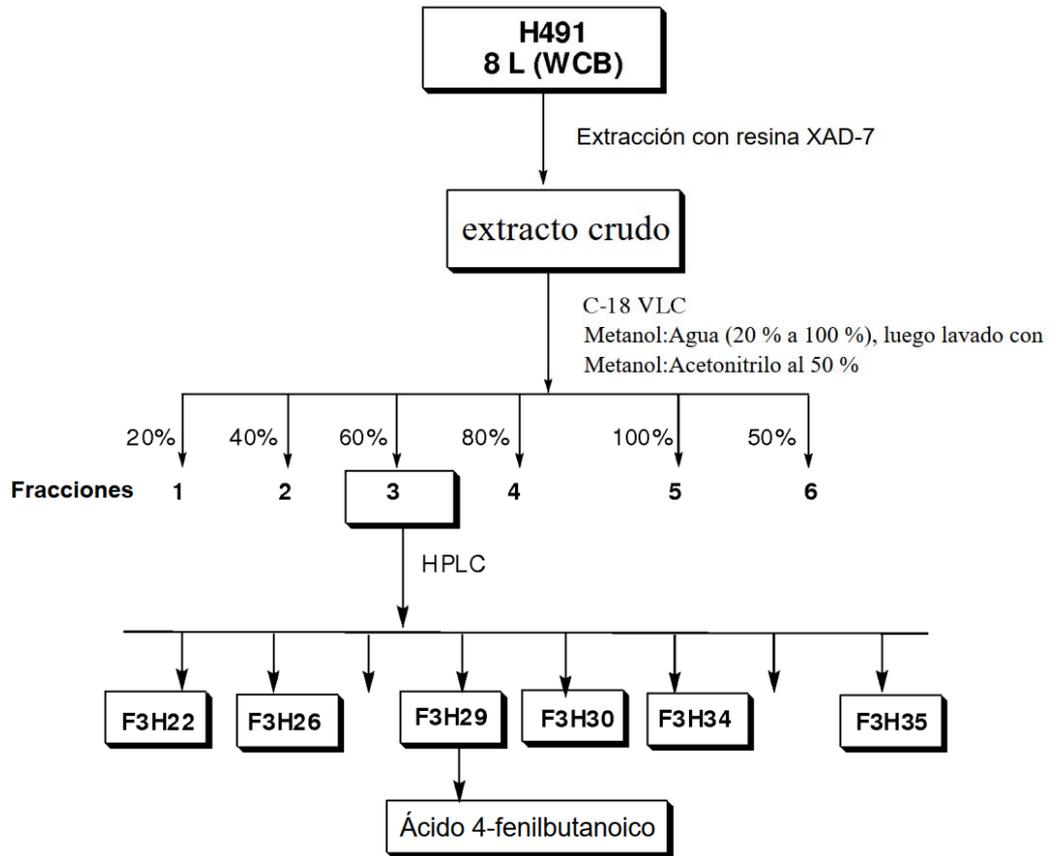


Figura 2

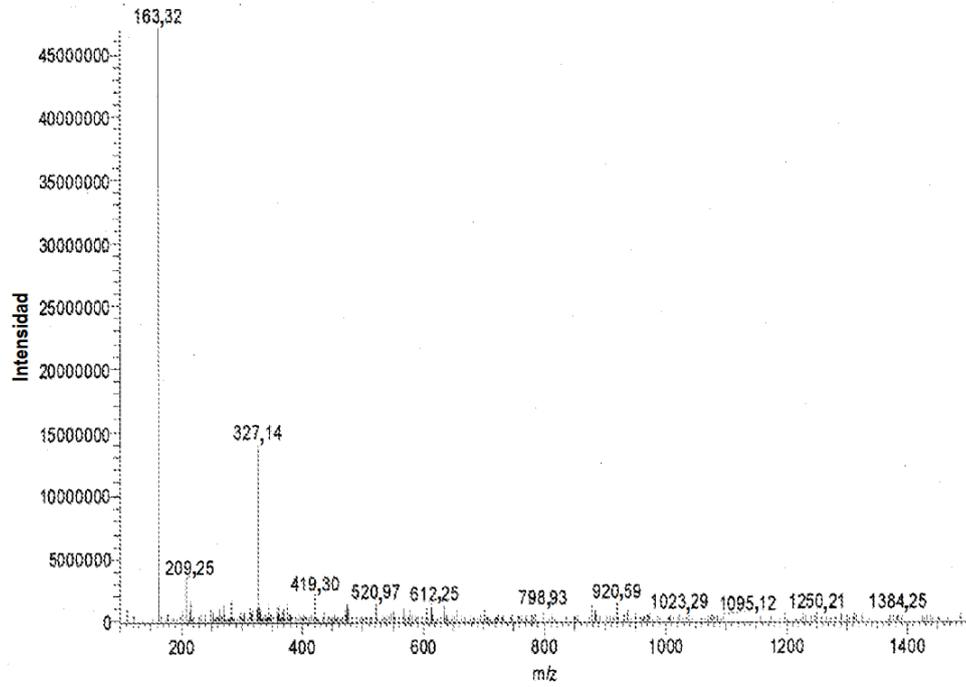


Figura 3

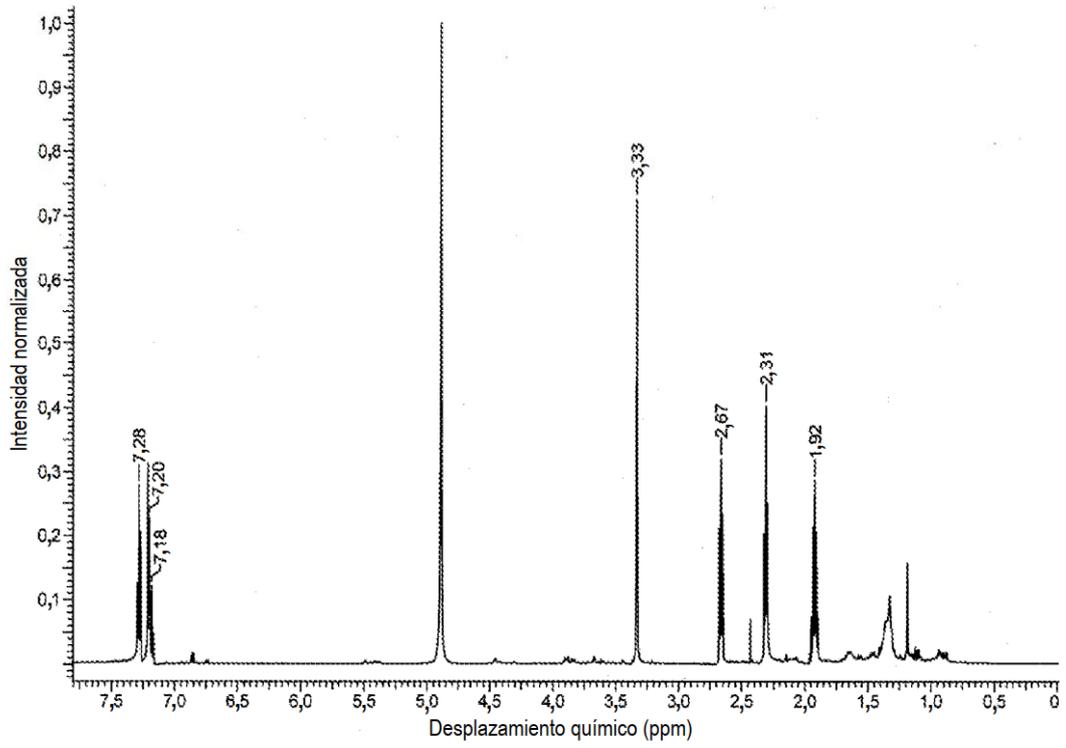


Figura 4

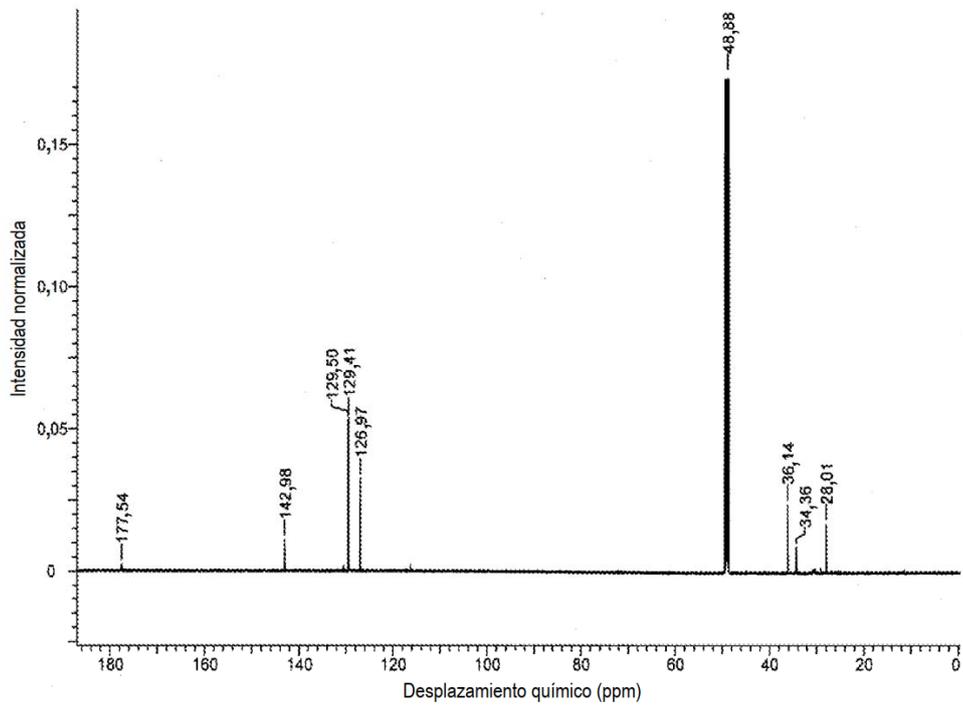


Figura 5

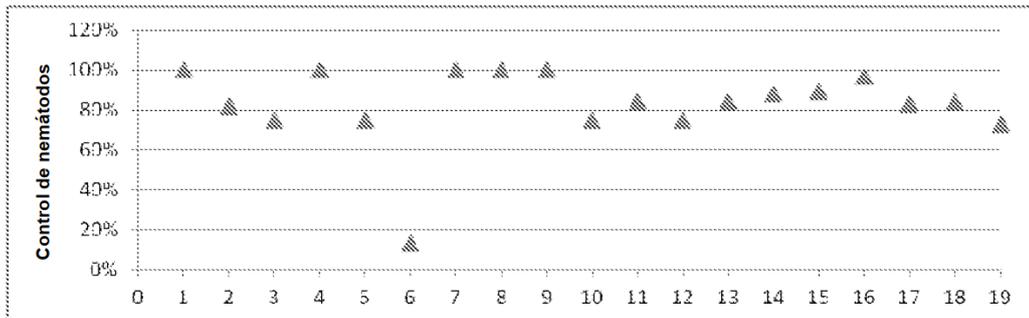


Figura 6

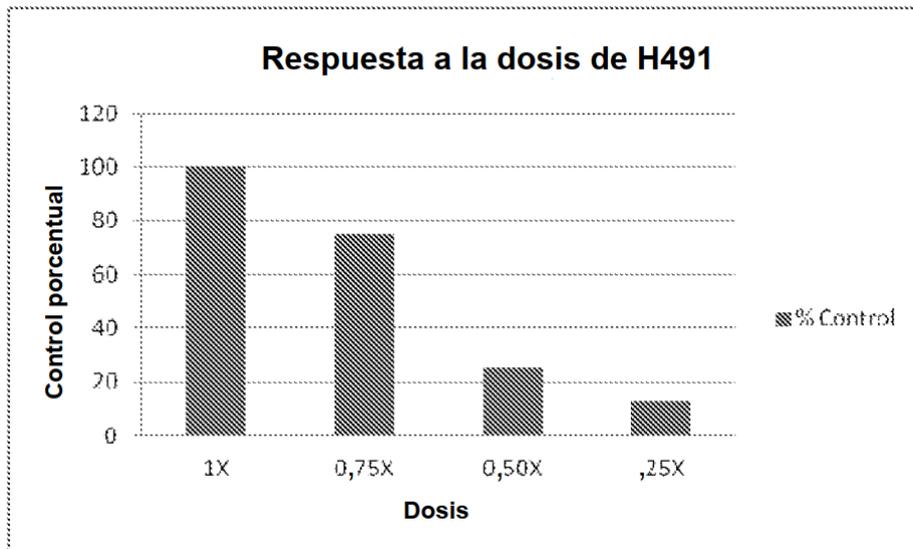


Figura 7

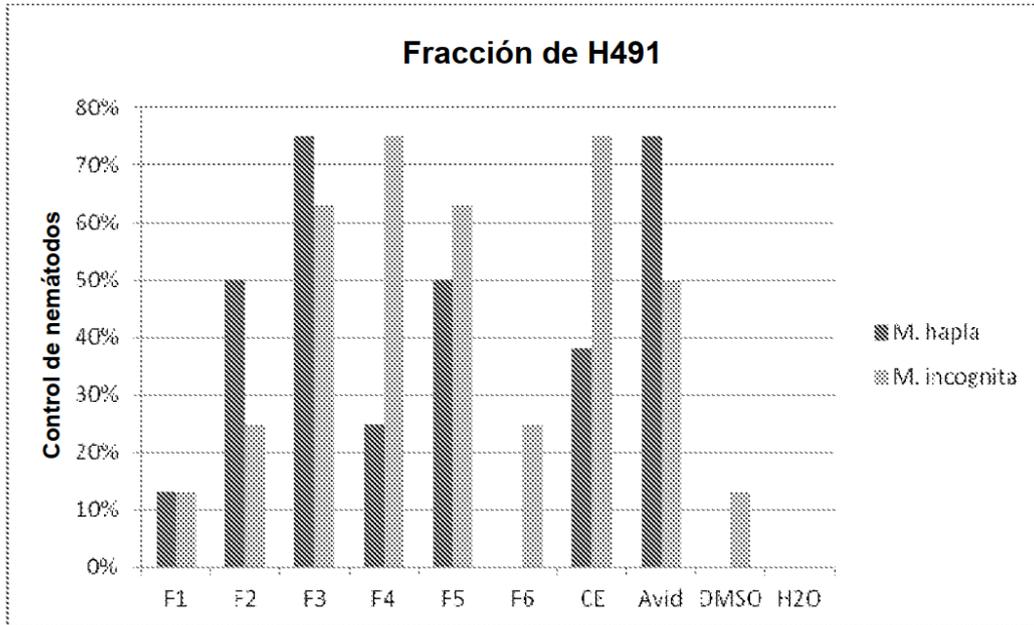


Figura 8

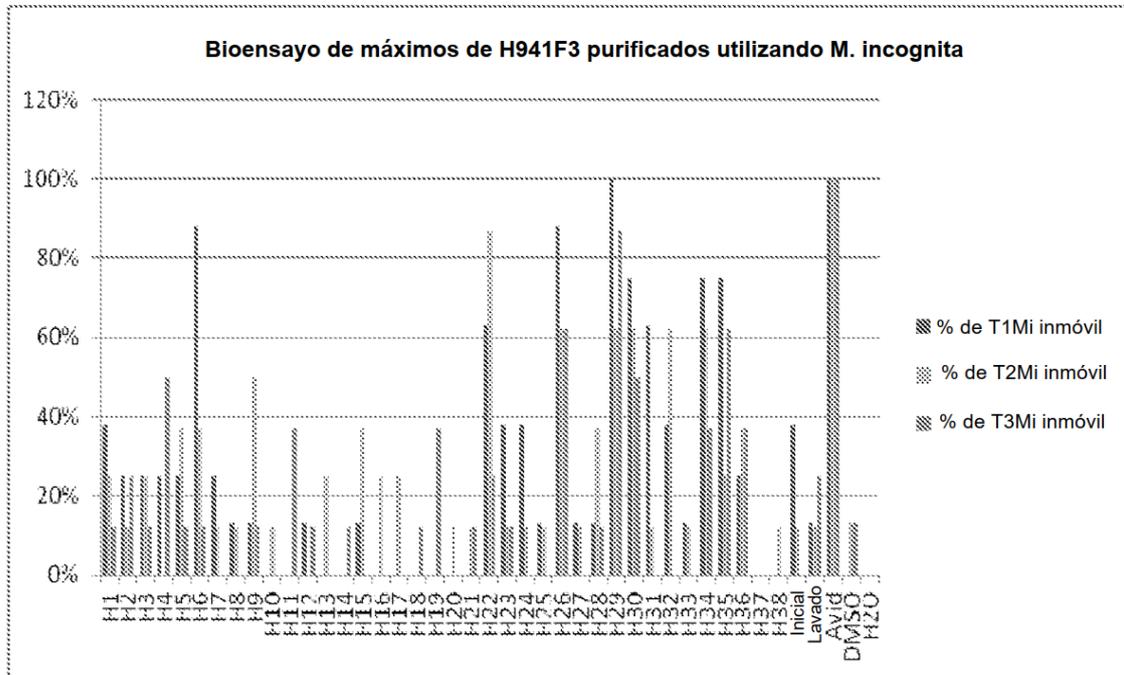


Figura 9

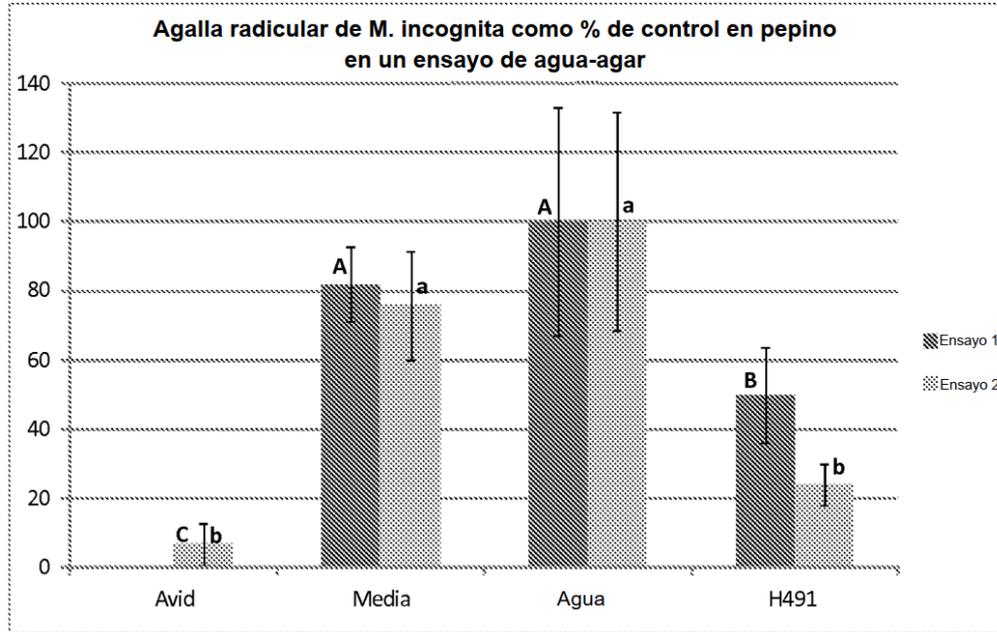


Figura 10

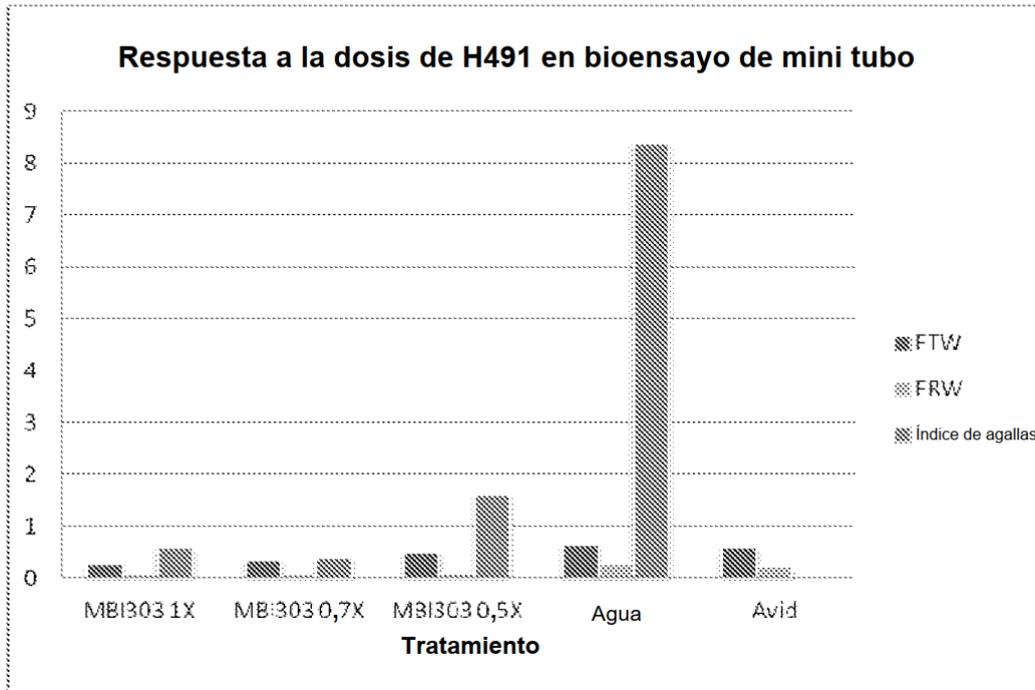


Figura 11

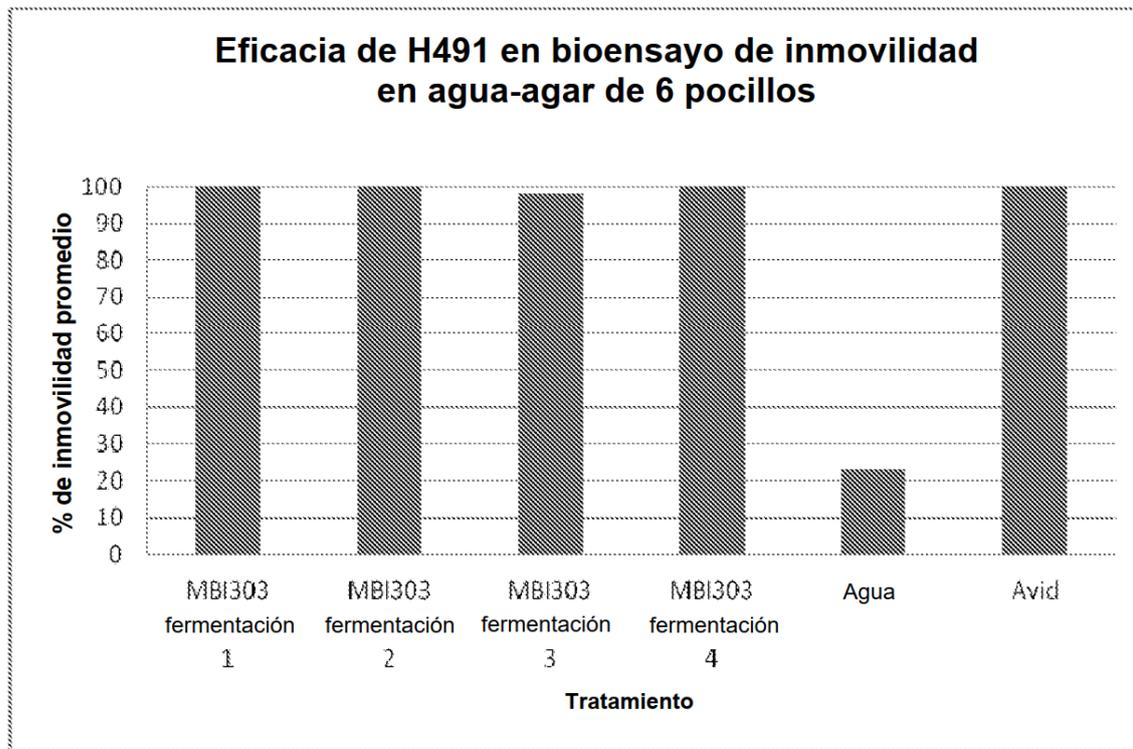


Figura 12

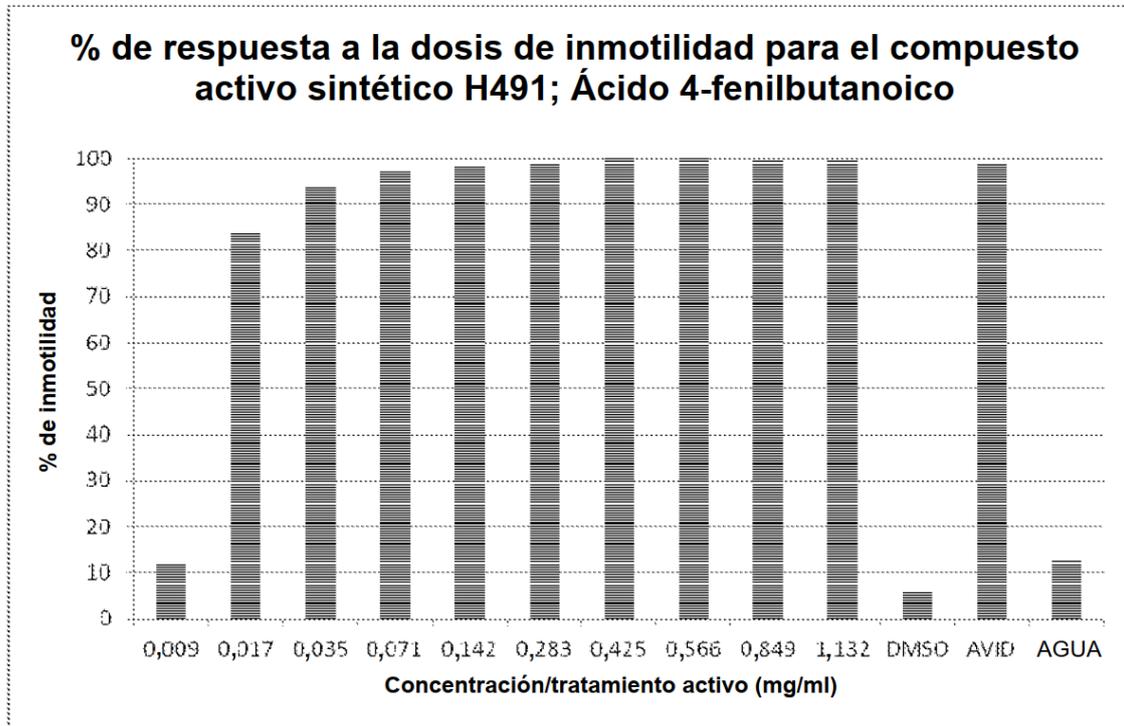


Figura 13

