

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 774 163**

51 Int. Cl.:

C12N 1/20	(2006.01)
A01N 63/02	(2006.01)
A01N 63/00	(2006.01)
A01P 3/00	(2006.01)
A01P 21/00	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.08.2013 PCT/US2013/054775**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **20.02.2014 WO14028521**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.08.2013 E 13829528 (2)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.12.2019 EP 2885398**

54 Título: **Cepa de Bacillus sp. con actividad antifúngica, antibacteriana y de promoción del crecimiento**

30 Prioridad:

14.08.2012 US 201261683174 P
15.03.2013 US 201313835677

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.07.2020

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;
MCCORT, CHRISTOPHER;
WILK, DEBORA;
TODD, CARLY;
SU, HAI y
MARRONE, PAMELA

74 Agente/Representante:

INGENIAS CREACIONES, SIGNOS E
INVENCIONES, SLP

ES 2 774 163 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Cepa de Bacillus sp. con actividad antifúngica, antibacteriana y de promoción del crecimiento

5 **Referencia cruzada a solicitudes relacionadas**

Esta solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud de Patente Provisional de los Estados Unidos N.º 61/683.174 presentada el 14 de agosto de 2012, y de la Solicitud de Patente de los Estados Unidos N.º 13/835.677, presentada el 15 de marzo de 2013.

10

Campo técnico

La presente divulgación está en el campo de los bioplaguicidas y el control de plagas; en particular plaguicidas microbianos y las cepas microbianas que los producen.

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% derivan de productos naturales, solamente el 11% de los plaguicidas derivan 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, G. D. y Dutton, R. et al. (2000). "Spinosad - a case study: an example from a natural products discovery programme," Pest Management Science 56: 696-702; Arena, J. P., Liu, K. K. et al. (1995), "The mechanism of action of avermectins in *Caenorhabditis elegans* - correlation between activation of glutamate-sensitive chloride current, membrane binding and biological activity", Journal of Parasitology 81: 286-294; Krieg, A., A. y Huger, M. et al. (1983), "Bacillus thuringiensis var. tenebrionis: Ein neuer, gegenüber Larven von Coleopteren wirksamer Pathotyp", Z. Angew. Entomol. 96: 500-508).

20

25

30

35

40

El desarrollo de un plaguicida microbiano comienza con el aislamiento de un microbio en un cultivo puro. Después se procede a la evaluación 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 aditivos biocompatibles y aprobados para aumentar la eficacia y maximizar la facilidad de aplicación.

45

Con el desarrollo de una resistencia creciente a los plaguicidas químicos, se está reduciendo el espectro de plaguicidas disponibles. Además, los plaguicidas de origen no natural pueden tener efectos ambientales perjudiciales. En consecuencia, existe la necesidad de nuevos plaguicidas de origen natural a los que los patógenos de las plantas no hayan desarrollado resistencia y que tengan efectos ambientales mínimos.

El documento US 2010/0143316 A1 divulga una nueva cepa de Bacillus Amyloliquefaciens y su uso.

50

El documento US 2011/0274673 A1 divulga una cepa de Bacillus Amyloliquefaciens. El documento US 2011/0230345 A1 divulga una cepa de Bacillus Amyloliquefaciens.

El documento EP 2 138 044 A1 divulga un cultivo puro de la cepa AH2 de la especie Bacillus Velezensis y un producto para el control biológico de hongos fitopatógenos.

55

El documento KR 2012 0071532 A divulga una composición para controlar enfermedades de las plantas que comprende 3-Pentanol como ingrediente eficaz.

El documento WO 2012/063824 A1 desvela una composición agroquímica biológica.

60

El documento WO 2010/030554 A1 divulga semillas genéticamente modificadas combinadas con bacterias formadoras de esporas y agentes de control de insectos opcionales.

El documento US 2008/0102062 A1 divulga un nuevo Bacillus Amyloliquefaciens KTGB0202 y un método de control de hongos patógenos de plantas que lo utilizan.

65

El documento US 2004/052776 A1 divulga un método para inhibir hongos patógenos en plantas que usa Bacillus Amyloliquefaciens.

El documento WO 02/091824 A2 divulga una composición herbicida que contiene ácidos grasos.

5 El documento US 6.808.917 B1 divulga el control de patógenos de plantas con combinaciones de antagonistas fúngicos/bacterianos.

10 El documento WO 2011/135121 A2 divulga un método para cambiar el patrón de desarrollo, aumentar el crecimiento y la acumulación de almidón, cambiar la estructura del almidón y aumentar la resistencia al estrés hídrico en las plantas.

15 El documento WO 00/51435 divulgan composiciones biológicas y métodos para potenciar el crecimiento y la salud de las plantas y producir plantas supresoras de enfermedades.

Sumario

15 La invención se refiere a una composición que comprende:

- 20 (a) un sobrenadante, filtrados, extractos o caldo de células completas recogido del cultivo de la cepa F727 de *Bacillus* (N.º de registro NRRL B-50768), en donde el sobrenadante, los filtrados, los extractos o el caldo de células completas tiene actividad plaguicida o de promoción de crecimiento; y
 (b) al menos uno de un transportador, diluyente, tensioactivo o adyuvante.

25 En el presente documento se divulga una cepa microbiana, aislado F727 de *Bacillus sp.*, que tiene actividad plaguicida. Esta cepa produce metabolitos bioactivos activos para controlar las plagas y promover el crecimiento de las plantas. También se divulgan métodos para usar aislado 727 de *Bacillus sp.* y sus metabolitos para controlar las plagas y promover el crecimiento de las plantas. En una realización particular, el *Bacillus sp.* puede tener al menos una de las características de identificación de NRRL B-50768.

30 Asimismo, el *Bacillus sp.* puede tener una secuencia génica del ARNr 16S con al menos un 99 % de identidad y particularmente un 99,5 % de identidad con la secuencia consenso establecida en la SEQ ID NO: 3 y que comprende una secuencia directa que tiene al menos un 99 % de identidad y particularmente un 99,5 % de identidad con el conjunto de secuencias establecidas en la SEQ ID NO: 1, y una secuencia inversa que tiene al menos un 99 % de identidad y particularmente un 99,5 % de identidad con la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 2.

35 Además se proporciona un cultivo o caldo de células completas sustancialmente puro que comprende dicha cepa, o fracción celular, extracto, sobrenadante y/o sustancias o compuestos derivados de dicha cepa o extracto de la misma.

40 Además se proporciona un método para modular la infestación de plagas en una planta que comprende aplicar a una planta, y/o semillas de la misma y/o sustrato usado para cultivar dicha planta una cantidad de dicho aislado F727 de *Bacillus sp.* (y/o un cultivo, fracción celular, extracto, sobrenadante y/o sustancias o compuestos derivados de dicha cepa o extracto) que sea eficaz para modular dicha infestación de plagas. En determinadas realizaciones, la plaga es un hongo de plantas tal como, por ejemplo, *Bremia*, *Botrytis*, *Sclerotinia*, *Sphaerotheca*, *Rhizoctonia*, *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Verticillium*, *Phytophthora* o *Bipolaris*. En realizaciones adicionales, la plaga es una bacteria tal como, por ejemplo, *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Acidovorax* o *Clavibacter*.

45 También se proporcionan métodos para promover el crecimiento de plantas y/o la germinación de las semillas, en donde los métodos comprenden aplicar a la planta y/o semillas de la misma y/o al sustrato usado para cultivar dicha planta una cantidad de dicho aislado F727 de *Bacillus sp.* (y/o un cultivo, fracción celular, extracto, sobrenadante y/o sustancias o compuestos derivados de dicha cepa o extracto) que sea eficaz para promover el crecimiento de las plantas y/o la germinación de las semillas.

50 En realizaciones particulares, dicho *Bacillus* produce un compuesto seleccionado del grupo que consiste en:

55 (a) compuesto "A" que

- (i) se puede obtener de *Bacillus sp.*, particularmente, del aislado 727 de *Bacillus sp.*;
- (ii) tiene actividad plaguicida;
- (iii) tiene un peso molecular de aproximadamente 1020-1060 y más particularmente, 1044 según se determina por Cromatografía Líquida/Espectrometría de Masas (LC/MS, por sus siglas en inglés);
- 60 (iv) tiene valores RMN ¹H de δ 7,15, 6,72, 4,81, 4,70, 4,65, 4,40, 4,35, 4,25, 4,15, 3,85, 3,65, 3,50, 3,22, 2,85, 2,80, 2,65, 2,45, 2,35, 2,30, 2,20, 1,95, 1,55, 1,31, 1,20 y 0,85;
- (d) tiene un tiempo de retención de Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC) de aproximadamente 6-12 minutos, más específicamente de aproximadamente 8 minutos e incluso más específicamente aproximadamente 8,31 min en una columna HPLC C-18 de fase inversa (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 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 CH₃ CN acuoso) a un caudal de 0,5 ml/min y detección UV de 210 nm;
 (vi) opcionalmente contiene 47 carbonos, 72 hidrógenos, 12 nitrógenos y 15 oxígenos; y
 (vii) es opcionalmente un péptido y puede comprender glutamina (1 unidad), prolina (1 unidad), serina (1
 5 unidad), tirosina (1 unidad) y asparagina (3 unidades);

(b) Compuesto " B " que

(i) tiene actividad plaguicida;
 (iii) tiene un peso molecular de aproximadamente 1030-1080 y más particularmente, 1058 según se determina
 10 por Cromatografía Líquida/Espectrometría de Masas (LC/MS, por sus siglas en inglés);
 (iii) tiene un tiempo de retención de Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC) de aproximadamente 6-14
 minutos, más específicamente aproximadamente 8 minutos e incluso más específicamente aproximadamente
 8,67 min en una columna HPLC C-18 de fase inversa usando un sistema de disolventes en gradiente de
 15 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 CH₃ CN acuoso) a un caudal de 0,5 ml/min y detección UV de
 210 nm;
 (iv) opcionalmente comprende 48 carbonos, 74 hidrógenos, 12 nitrógenos y 15 oxígenos; y
 (v) es opcionalmente un péptido y puede comprender glutamina (1 unidad), prolina (1 unidad), serina (1 unidad),
 20 tirosina (1 unidad) y asparagina (3 unidades); y

(c) Compuesto " C " que

(i) tiene actividad plaguicida;
 (iii) tiene un peso molecular de aproximadamente 1050-1120 y más particularmente, 1072 según se determina
 25 por Cromatografía Líquida/Espectrometría de Masas (LC/MS, por sus siglas en inglés);
 (iii) tiene un tiempo de retención de Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC) de aproximadamente 6-14
 minutos, más específicamente aproximadamente 9 minutos e incluso más específicamente aproximadamente
 9,19 min en una columna HPLC C-18 de fase inversa usando un sistema de disolventes en gradiente de
 30 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 CH₃ CN acuoso) a un caudal de 0,5 ml/min y detección UV de
 210 nm;
 (iv) opcionalmente contiene 49 carbonos, 76 hidrógenos, 12 nitrógenos y 15 oxígenos; y
 (v) es opcionalmente un péptido y puede comprender glutamina (1 unidad), prolina (1 unidad), serina (1 unidad),
 35 tirosina (1 unidad) y asparagina (3 unidades).

También se proporciona en el presente documento una cepa de *Bacillus* que tiene las siguientes características:

(a) al menos uno de:

(1) una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 99,5 % de identidad con una secuencia de ARNr 16S
 establecida en la SEQ ID NO: 3;
 (2) una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 95 % de identidad con una secuencia de *recA*
 establecida en la SEQ ID NO: 10; y
 (3) una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 90 % de identidad con una secuencia inversa de *phoR*
 establecida en la SEQ ID NO: 13;

b) produce uno o más compuestos que

(i) tienen actividad plaguicida;
 (ii) tienen un peso molecular de aproximadamente 1020-1120 determinado por Cromatografía
 50 Líquida/Espectroscopía de Masas (LC/MS), y
 (iii) tienen un tiempo de retención de Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC) de aproximadamente 6-15
 minutos en una columna HPLC C-18 de fase inversa usando un sistema de disolventes en gradiente de
 55 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 de 210
 nm, y
 iv) son opcionalmente péptidos;

(c) es resistente a Kanamicina, Cloranfenicol, Ampicilina, Penicilina, Cefuroxima, Piperacilina, Tetraciclina; y
 60 (d) posee actividad fosfatasa alcalina, esterasa, fosfatasa ácida y naftol-AS-BI-fosfohidrolasa.

También se proporciona una combinación que comprende dicho aislado F727 de *Bacillus sp.*, una fracción celular,
 extracto, sobrenadante y sustancias, metabolitos o compuestos sustancialmente puros derivados de dicha cepa o
 extracto de la misma y al menos una de (a) una segunda sustancia que puede ser un plaguicida químico o biológico y
 65 (b) al menos uno de un transportador, diluyente, tensioactivo, adyuvante. La combinación puede ser una composición
 y puede recubrir una semilla.

Además se proporciona un método para modular la infestación de plagas en una planta que comprende aplicar a una planta, y/o semillas de la misma y/o sustrato usado para cultivar dicha planta una cantidad de dicha combinación eficaz para modular dicha infestación de plagas. En determinadas realizaciones, la plaga es un hongo de plantas tal como, por ejemplo, *Bremia*, *Botrytis*, *Sclerotinia*, *Sphaerotheca*, *Rhizoctonia*, *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Verticillium*, *Phytophthora* o *Bipolaris*. En realizaciones adicionales, la plaga es una bacteria tal como, por ejemplo, *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Acidovorax* o *Clavibacter*.

También se proporciona el uso de una composición, opcionalmente en combinación con una o más segundas sustancias, para formular una composición plaguicida, en donde la composición se selecciona del grupo que consiste en uno o más de:

- (a) un cultivo sustancialmente puro de aislado F727 de *Bacillus sp.*,
- (b) una fracción celular de un cultivo de aislado F727 de *Bacillus sp.*,
- (c) un sobrenadante obtenido a partir de un cultivo de aislado F727 de *Bacillus sp.*,
- (d) un filtrado obtenido a partir de un cultivo de aislado F727 de *Bacillus sp.*,
- (e) un extracto de cualquiera de (a), (b), (c) o (d),
- (d) un metabolito producido por un cultivo de aislado F727 de *Bacillus sp.*,
- (g) compuesto A,
- (h) compuesto B y
- (i) compuesto C; y

la segunda sustancia se selecciona del grupo que consiste en:

- (a) un plaguicida,
- (b) un agente promotor del crecimiento de la planta,
- (c) un transportador,
- (d) un adyuvante,
- (e) un tensioactivo,
- (f) un fertilizante y
- (g) un agente antifitopatígeno.

Breve descripción de las figuras

- La Figura 1 muestra una representación esquemática del esquema de purificación para obtener los compuestos de la invención a partir de caldo de cultivo.
- La Figura 2 representa el cromatograma ESI-LCMS para el compuesto "A".
- La Figura 3 representa los (+) ESIMS para el compuesto "A".
- La Figura 4 representa el cromatograma ESI-LCMS para el compuesto "B".
- La Figura 5 representa los (+) ESIMS para el compuesto "B".
- La Figura 6 representa el cromatograma ESI-LCMS para el compuesto "C".
- La Figura 7 representa los (+) ESIMS para el compuesto "C".
- La Figura 8 representa la bioactividad de la fracción 3 de VLC (F727F3 en la Figura) y del Compuesto A (F727F3H11 en la Figura), Compuesto B (F727F3H14 en la Figura) y Compuesto C (F727F3H17 en la Figura) purificados por HPLC contra cuatro patógenos fúngicos: *Botrytis cinerea* (*Botrytis* en la Figura), *Sclerotinia homeocarpa* (*Sclerotinia* en la Figura), *Rhizoctonia solani* (*Rhizoctonia* en la Figura) y *Bipolaris maydis* (*Bipolaris* en la Figura).
- La Figura 9 muestra el efecto del sobrenadante de F727 sobre *Botrytis cinerea* en tomate. Las plantas se inocularon con esporas de *B. cinerea* a las concentraciones indicadas en la Figura y se trataron con sobrenadante de una fermentación con *Bacillus sp. F1U* (segunda barra desde la izquierda) o Switch® (tercera barra desde la izquierda). Los controles incluyeron plantas no inoculadas (barra más a la izquierda) y plantas no tratadas con plaguicidas inoculadas con dos concentraciones diferentes del hongo (barras cuarta y quinta de la izquierda).
- La Figura 10 muestra el efecto del sobrenadante de F727 sobre Mildiu Velloso en lechuga. Las plantas se trataron con el sobrenadante de aislado F727 de *Bacillus sp. (F727)*; Ridomil, o no se trataron (UTC, por sus siglas en inglés).
- La Figura 11 compara el efecto del sobrenadante de F727 con Fenhexamida sobre *Botrytis* en tomate. Las plantas que se habían infectado de manera experimental con *B. cinerea* se pulverizaron previamente una vez (sobrenadante de F727) o dos veces (sobrenadante de F727 x 2) con sobrenadante de F727, con agua o con Fenhexamida (Elevate®), y se analizó la gravedad de la enfermedad.
- La Figura 12 compara el efecto del sobrenadante de F727 con Fenhexamida sobre *Botrytis* en pimientos. Las plantas se pulverizaron con sobrenadante de fermentación de aislado F727 de *Bacillus sp. (F727)*, agua, (UTC) o Fenhexamida (Elevate®). Las plantas pulverizadas se infectaron después de manera experimental con *B. cinerea*, se cultivaron y se analizaron después de 13 días para determinar la gravedad de la enfermedad.
- La Figura 13 muestra medidas de control de enfermedad en pepinos infectados con oídio y tratados con diferentes preparaciones de F727. Las células F727 se cultivaron en tres medios diferentes: SPY, SMP y TSB, como se indica en la figura. Se obtuvieron caldos de células completas, células (suspendidas en MgSO₄ 10 mM) y sobrenadante

para cada una de estas condiciones de crecimiento. Se usó agua ("Agua DI" en la figura) como control negativo. También se incluyeron en blanco para medio SMP, medio SPY, medio TSB y MgSO₄ 10 mM.

La Figura 14 muestra medidas de control de enfermedad en plantas de tomate infectadas con *Botrytis cinerea* y tratadas con diferentes preparaciones de F727. Las células F727 se cultivaron en tres medios diferentes: SPY, SMP y TSB, como se indica en la figura. Se obtuvieron caldos de células completas, células (suspendidas en MgSO₄ 10 mM) y sobrenadante para cada una de estas condiciones de crecimiento. Se usó agua ("Agua DI" en la figura) como control negativo. También se incluyeron en blanco para medio SMP, medio SPY, También se incluyeron medio TSB y MgSO₄ 10 mM.

La Figura 15 muestra medidas de control de enfermedad en plantas de pepino infectadas con oídio. Antes de la inoculación con esporas de hongos, las plantas se pulverizaron con agua ("agua DI" en la figura, control negativo), caldo de células completas (WCB por sus siglas en inglés) a partir de la fermentación de aislado F727 (WCB MBI-110) o uno de varios plaguicidas comerciales (Double Nickel® (Certis, cepa D747 de *Bacillus amyloliquefaciens*) Sonata® (*Bacillus subtilis*), Vacciplant®, Companion®, Serenade® (*Bacillus pumilus*) o Regalia® (*Reynoutria sachalinensis*), o una combinación de Regalia® (*Reynoutria sachalinensis*) y WCB de F727.

La Figura 16 muestra medidas de control de enfermedad en plantas de tomate infectadas con *Phytophthora infestans*. Antes de la inoculación con *P. infestans*, las plantas se pulverizaron con agua ("agua DI" en la figura, control negativo), Regalia®, (Double Nickel® (Certis, cepa D747 de *Bacillus amyloliquefaciens*) o caldo de células completas a partir de fermentación de aislado F727 (WCB MBI- 110).

La Figura 17 muestra los efectos de los sobrenadantes de la fermentación de F727 y los controles, sobre el crecimiento micelial de *S. rofsii* en un ensayo *in vitro*. Se muestran los efectos del agua (agua DI), sobrenadante de F727 sin filtrar (F727 sin filtrar), sobrenadante F727 filtrado (filtrado F727) y Pristine®. Para cada material de prueba y control, se evaluaron dos volúmenes: en cada par de barras, la barra más a la izquierda muestra los resultados usando 25 µl, y la barra más a la derecha muestra los resultados usando 50 µl.

La Figura 18 muestra el efecto de WCB de F727 sobre infección de Mildiu Velloso de lechuga. UTC: plantas de lechuga de control no tratadas infectadas con aproximadamente 5x10⁴ esporas de Mildiu Velloso; Inundación con F727: plantas de lechuga que se sometieron a una inundación de suelo con WCB de F727 una hora antes de la inoculación con aproximadamente 5x10⁴ esporas de Mildiu Velloso. La gravedad de la enfermedad se midió como porcentaje de cobertura de hojas/cotiledones con tejido enfermo.

La Figura 19 muestra los resultados de ESIMS/MS para el Compuesto A.

La Figura 20 muestra un diagrama esquemático de la estructura del Compuesto A.

Descripción detallada

Si bien las composiciones y métodos divulgados en el presente documento son susceptibles de diversas modificaciones y formas alternativas, se describirán en detalle realizaciones ejemplares en el presente documento. Debería entenderse, sin embargo, que no hay intención de limitar la invención a las formas particulares divulgadas, sino por el 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, hasta la décima parte 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 establecido o intermedio en el intervalo establecido, está incluido en el mismo. También se incluyen intervalos más pequeños. Los límites superior e inferior de estos intervalos más pequeños también se incluyen en el mismo, sujetos a cualquier límite específicamente excluido en el intervalo indicado.

A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que el que entiende comúnmente un experto habitual en la materia a la cual pertenece la presente invención.

Cabe destacar que, 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.

Tal como se define en el presente documento, "derivado 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, "derivado de" significa que puede aislarse u obtenerse del propio organismo o del medio utilizado para cultivar o hacer crecer dicho organismo.

Tal como se define en el presente documento, las expresiones "cultivo de caldo completo" o "caldo de cultivo completo" se refiere a un cultivo líquido que contiene tanto células como medios. Si las bacterias crecen en una placa, las células pueden cosecharse en agua u otro líquido, para proporcionar cultivo de caldo completo.

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

Tal 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.

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

5 Tal 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 bactericida o fungicida. Tal como se define en el presente documento, un "compuesto aislado" está esencialmente libre de otros compuestos o sustancias, p. ej., al menos aproximadamente 10 20 % puro, preferentemente al menos aproximadamente 40 % puro, más preferentemente aproximadamente 60 % puro, incluso más preferentemente aproximadamente 80 % puro, lo 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 electroforéticos. Los términos "metabolito" y "compuesto" pueden usarse indistintamente.

15 Un "transportador" 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 para facilitar su almacenamiento, transporte y/o manipulación.

20 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.

La expresión " 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 25 aparición de una maleza no deseada en un sistema de crecimiento.

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

30 **Identificación y caracterización de F727 de *Bacillus sp.***

El aislado F727 de *Bacillus sp.*, se identificó como una nueva cepa de *Bacillus* utilizando un enfoque polifásico que combina la determinación de la secuencia del ARNr 16S, el análisis de ácidos grasos, el análisis de proteínas MALDI-TOF y la caracterización utilizando varios ensayos bioquímicos. Véanse los Ejemplos 1-4, *infra*.

Se aislaron y caracterizaron metabolitos producidos por fermentación de F727 de *Bacillus sp.* Véanse los Ejemplos 5, 25 y 26 *infra*. Algunos de estos metabolitos demostraron actividad contra hongos y bacterias patógenas tanto *in vitro* como *in vivo*. Véanse los Ejemplos 6-17, 20, 22, 23 y 27-29 *infra*. También se han observado efectos de promoción del crecimiento de las plantas, de F727 de *Bacillus sp.* y sus metabolitos en varias plantas. Véanse los Ejemplos 18 y 40 19, y 21, 24 *infra*.

Por lo tanto, F727 de *Bacillus sp.* y/o sus metabolitos, pueden usarse como productos naturales para el control de enfermedades fúngicas y bacterianas en la agricultura; y para promover el crecimiento de las plantas.

45 **Métodos de Producción**

Como se ha indicado anteriormente, se pueden obtener compuestos o metabolitos, se pueden obtener o pueden derivar de un organismo que tiene una o más características identificativas de una cepa F727 de *Bacillus*. Los métodos comprenden cultivar estos organismos y obtener los compuestos y/o composiciones de la presente invención aislando estos compuestos del cultivo de estos organismos.

En particular, los organismos se cultivan en medio nutriente usando métodos conocidos en la técnica. Los organismos pueden cultivarse mediante cultivo en matraces de agitación, fermentación a pequeña o gran escala (incluidas, entre 55 otras, fermentaciones continuas, discontinuas, discontinuas alimentadas o de estado sólido) en fermentadores de laboratorio o industriales realizados en medios adecuados 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 pueden prepararse de acuerdo con las composiciones publicadas.

60 Tras el cultivo, puede usarse un sobrenadante, filtrado y/o extracto de o derivado de dicha cepa de *Bacillus* (por ejemplo, cepa F727 de *Bacillus sp.*) para formular una composición plaguicida.

Como alternativa, tras el cultivo, se pueden extraer, enriquecer o purificar los compuestos y/o metabolitos del caldo de cultivo.

El extracto puede fraccionarse mediante cromatografía. Las fracciones cromatográficas pueden analizarse para la actividad tóxica contra, por ejemplo, hongos (por ejemplo, *Botrytis*, *Sclerotinia*, *Rhizoctonia* y *Bipolaris*) usando métodos conocidos en la técnica. El fraccionamiento puede repetirse una o más veces utilizando los mismos o diferentes métodos cromatográficos.

5 Como se divulga en el presente documento, una composición producida por la cepa F727 comprende uno o más compuestos que (i) tienen actividad plaguicida; (ii) tienen un peso molecular de aproximadamente 1020-1120 determinado por Cromatografía Líquida/Espectroscopía de Masas (LC/MS); (iii) tienen un tiempo de retención de Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC) de aproximadamente 6-15 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 de 210 nm; y (iv) se pueden obtener opcionalmente de una especie de *Bacillus*. En una realización los compuestos pueden ser péptidos.

15 Como se divulga en el presente documento, el compuesto "A" (i) se puede obtener de una especie de *Bacillus*; (ii) es tóxico para una plaga; (iii) tiene un peso molecular de aproximadamente 1020-1060 y más particularmente, 1044 según se determina por Cromatografía Líquida/Espectrometría de Masas (LC/MS, por sus siglas en inglés); (iv) tiene valores RMN ¹H de δ 7,15, 6,72, 4,81, 4,70, 4,65, 4,40, 4,35, 4,25, 4,15, 3,85, 3,65, 3,50, 3,22, 2,85, 2,80, 2,65, 2,45, 2,35, 2,30, 2,20, 1,95, 1,55, 1,31, 1,20, 0,85; y (v) tiene un tiempo de retención de Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC) de aproximadamente 6-12 minutos, más específicamente aproximadamente 8 minutos e incluso más específicamente aproximadamente 8,31 min en una columna HPLC C-18 de fase inversa (Phenomenex, Luna 5 μ C18(2) 100 A, 100 x 4,60 mm) usando agua:acetonitrilo (CH₃CN) con un sistema de disolventes en gradiente de (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 de 210 nm. Además, El compuesto "A" revela señales para 47 carbonos, 72 hidrógenos, 12 nitrógenos y 15 oxígenos según se determina por análisis de RMN ¹H, RMN ¹³C y MS. El espectro de RMN ¹H muestra características de un péptido típico. El análisis detallado del Compuesto "A" por RMN ¹H, RMN ¹³C, y MS/MS y el análisis de aminoácidos revelaron la presencia de glutamina (1 unidad), prolina (1 unidad), serina (1 unidad), tirosina (1 unidad) y asparagina (3 unidades).

30 Como se divulga en el presente documento, un compuesto producido por la cepa F727 es un compuesto "B" que (i) tiene actividad plaguicida; (iii) tiene un peso molecular de aproximadamente 1030-1080 y más particularmente, 1058 según se determina por Cromatografía Líquida/Espectrometría de Masas (LC/MS, por sus siglas en inglés); y (iii) tiene un tiempo de retención de Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC) de aproximadamente 6-14 minutos, más específicamente aproximadamente 8 minutos e incluso más específicamente aproximadamente 8,67 min 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 de 210 nm. Los datos de los espectros de RMN ¹H y ¹³C, junto con los datos de MS, revelan señales para 48 carbonos, 74 hidrógenos, 12 nitrógenos y 15 oxígenos. El espectro de RMN ¹H muestra características de un péptido típico. El análisis detallado del Compuesto "B" por RMN ¹H, RMN ¹³C, y MS/MS y el análisis de aminoácidos revelaron la presencia de glutamina (1 unidad), prolina (1 unidad), serina (1 unidad), tirosina (1 unidad) y asparagina (3 unidades).

45 La invención también divulga un compuesto producido por la cepa F727 que es un compuesto "C" que (i) tiene actividad plaguicida; (iii) tiene un peso molecular de aproximadamente 1050-1120 y más particularmente, 1072 según se determina por Cromatografía Líquida/Espectrometría de Masas (LC/MS, por sus siglas en inglés); y (iii) tiene un tiempo de retención de Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC) de aproximadamente 6-14 minutos, más específicamente aproximadamente 9 minutos e incluso más específicamente aproximadamente 9,19 min 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 de 210 nm. Los datos de los espectros de RMN ¹H y ¹³C, junto con los datos de MS, revelan señales para 49 carbonos, 76 hidrógenos, 12 nitrógenos y 15 oxígenos. El espectro de RMN ¹H muestra características de un péptido típico. El análisis detallado del Compuesto "C" por RMN ¹H, RMN ¹³C, y MS/MS y el análisis de aminoácidos revelaron la presencia de glutamina (1 unidad), prolina (1 unidad), serina (1 unidad), tirosina (1 unidad) y asparagina (3 unidades).

55 Composiciones

Las composiciones pueden comprender cultivos de caldo completos, caldos de células completas, cultivos líquidos o suspensiones de o derivadas de una cepa de *Bacillus*, específicamente una cepa de *Bacillus* que tiene al menos una de las características identificativas del aislado F727 de *Bacillus sp.*, así como sobrenadantes, filtrados o extractos obtenidos de dicho *Bacillus sp.* Las composiciones también pueden comprender uno o más metabolitos o compuestos aislados derivados del aislado F727 de *Bacillus sp.*, que en particular tiene actividad bactericida, fungicida y/o de promoción del crecimiento de las plantas.

65 Las composiciones expuestas anteriormente pueden formularse de cualquier manera. Formulaciones ejemplares incluyen, pero sin limitación, concentrados emulsionables (EC, por sus siglas en inglés), polvos humectables (WP, por

5 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), microencapsulados, 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 %.

10 Las composiciones pueden estar en la forma de o un líquido, gel o sólido. Puede prepararse una composición sólida suspendiendo un transportador sólido en una solución de principios(s) activo(s) y secando la suspensión en condiciones suaves, tal como evaporación a temperatura ambiente o evaporación al vacío a 65 °C o menos.

15 Una composición puede comprender principios(s) activo(s) encapsulado(s) en gel. Dichos materiales encapsulados en gel pueden prepararse mezclando un agente formador de gel (por ejemplo, gelatina, celulosa o lignina) con un cultivo o suspensión de células de la cepa F727 de *Bacillus sp.* vivas o inactivadas, o con un filtrado libre de células o fracción celular de un cultivo o suspensión de la cepa F727 de *Bacillus sp.*, o con un cultivo, célula o fracción celular de la cepa F727 de *Bacillus sp.* pulverizado o liofilizado; o con una solución de compuestos plaguicidas usados en el método de la invención; e inducir la formación de gel del agente.

20 La composición puede comprender adicionalmente un tensioactivo para usarlo con el fin de emulsificación, dispersión, humectación, 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, un intervalo preferido es 5-25 %. La elección de agentes dispersantes y emulsionantes, tales como agentes dispersantes y emulsionantes no iónicos, aniónicos, anfóteros y catiónicos, y la cantidad empleada, está determinada por la naturaleza de la composición y la capacidad del agente para facilitar la dispersión de las composiciones.

25 Las composiciones expuestas anteriormente pueden combinarse con otro agente, microorganismo y/o plaguicida (por ejemplo, nematocida, bactericida, fungicida, acaricida, insecticida). Los microorganismos incluyen, pero sin limitación, *Bacillus sp.* (p.ej., *Bacillus firmus*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus subtilis*), *Paecilomyces sp.* (*P. lilacinus*), *Pasteuria sp.* (*P. penetrans*), *Chromobacterium sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Brevibacillus sp.*, *Lecanicillium sp.*, *Ampelomyces sp.*, *Pseudozyma sp.*, *Streptomyces sp.* (*S. bikiniensis*, *S. costaricanus*, *S. avermitilis*), *Burkholderia sp.*, *Trichoderma sp.*, *Gliocladium sp.*, avermectin, *Myrothecium sp.*, *Paecilomyces spp.*, *Sphingobacterium sp.*, *Arthrobotrys sp.*, *Chlorosplnium*, *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.*, *Muscodor sp.*

30 El agente puede ser un aceite natural o un producto oleoso con actividad nematocida, fungicida, bactericida y/o insecticida (p. ej., aceite parafínico, aceite del árbol del té, aceite de hierba de limón, aceite de clavo, aceite de canela, aceite de cítricos, aceite de romero, piretro, aceite de cítricos (incluidos, pero sin limitación, aceites de naranja amarga, naranja y limón); aceite de romero, pimienta de Jamaica, bergamota, goma azul, camomila, citronela, jazmín común, enebro común, lavanda común, mirra común, menta de campo, fresia, santolina gris, hisopo de hierba, albahaca santa, árbol de incienso, jazmín, lavanda, caléndula, menta, hierbabuena, caléndula cultivada, menta verde, árbol yang.ylang, saponinas).

35 45 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) (p. ej., imidazol, piperazina, pirimidina, triazol), morfolina, hidroxipirimidina, anilino pirimidina, fosforotiolato, inhibidor externo de quinona, quinolina, dicarboximida, carboximida, fenilamida, anilino pirimidina, fenilpirrol, hidrocarburo aromático, ácido cinámico, hidroxianilida, antibiótico, polioxina, acilamina, ftalimida, bencenoide (xililalanina); un inhibidor de la desmetilación seleccionado entre el grupo que consiste en imidazol, piperazina, pirimidina y triazol (p. ej., bitertanol, miclobutanilo, penconazol, propiconazol, triadimefón, bromuconazol, ciproconazol, diniconazol, fenbuconazol, hexaconazol, tebuconazol, tetraconazol), miclobutanil y un inhibidor externo de quinona (p. ej., estrobilurina). La estrobilurina puede incluir, pero sin limitación, azoxiestrobina, kresoxima-metoilo o trofloxiestrobina. En otra realización particular más, el agente antifúngico es una quinona, p. ej., quinoxifeno (4-fluorofenil éter de 5,7-dicloro-4-quinolilo). El agente antifúngico también puede derivar de un extracto de *Reynoutria*.

50 60 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, fenilpiridina-amina y ciano-acetamida oxima.

65 Como se ha indicado anteriormente, la composición puede comprender además un nematocida. El nematocida puede incluir, pero sin limitación, productos químicos como organofosfatos, carbamatos y fumigantes, y productos microbianos tal 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

se aplican 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 reproducción y optimización de plantas, o mediante métodos biotecnológicos y de ingeniería genética, o combinaciones de estos métodos, incluidas plantas transgénicas y cultivares 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 brote, hoja, flor y raíz, siendo los ejemplos que se pueden mencionar hojas, acículas, pedúnculos, tallos, flores, cuerpos fructíferos, frutos, semillas, raíces, tubérculos y rizomas. Las partes de plantas también incluyen material cosechado y material de propagación vegetativa y generativa, por ejemplo, esquejes, tubérculos, rizomas, brotes 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 el entorno, hábitat o espacio de almacenamiento de la planta, por ejemplo, inmersión, pulverización, evaporación, nebulización, diseminación, pintura o inyección.

Las composiciones divulgadas en el presente documento también pueden aplicarse al suelo usando métodos conocidos en la técnica. Estos incluyen, pero sin limitación, (a) riego por goteo o quimigación; (b) incorporación al suelo; (c) inundación del suelo; (d) tratamiento y desinfección de semillas; y (e) inmersión de raíz desnuda.

20 **Tratamientos de Semillas**

Los tratamientos de semillas incluyen la aplicación de una composición como se divulga en el presente documento, 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 pueden aplicarse a las semillas como polvos secos, polvos en suspensión o pulverizarse sobre la semilla antes de plantar.

Las composiciones divulgadas en el presente documento pueden formularse para tratamientos de semillas en cualquiera de los siguientes modos: polvo seco, polvo en suspensión con 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, como aceite mineral, en lugar de un agente humectante. Por ejemplo, se mezclan un kg de polvo de talco purificado (esterilizado durante 12 h), 15 g de carbonato de calcio y 10 g de carboximetilcelulosa en condiciones asépticas siguiendo el método descrito por Nandakumar et al (Nandakumar, R., Babu, S., Viswanathan, R., Sheeka, J., Raguchander, T., Samiyappan, R. (2001), "A new bio-formulation containing plant growth promoting rhizobacterial mixture for the management of sheath blight and enhanced grain yield in rice" Bicontrol, 46:493-510). 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 %.

En realizaciones en las que las composiciones divulgadas en el presente documento se aplican a una semilla, se puede aplicar una composición como una o más capas antes de plantar la semilla usando uno o más agentes de recubrimiento de semillas que incluyen, pero sin limitación, etilenglicol, polietilenglicol, quitosano, carboximetil quitosano, turba, resinas y ceras. Las composiciones también se pueden aplicar a semillas en combinación con, por ejemplo, fungicidas o bactericidas químicos con un solo sitio, de múltiples sitios o con modo de acción desconocido, utilizando métodos conocidos en la técnica.

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

Las semillas pueden ser semillas convencionales o semillas genéticamente modificadas ta como Liberty Link (Bayer Crop-Science), semillas Roundup Ready (Monsanto) u otras semillas resistentes a herbicidas, y/o semillas modificadas por ingeniería para ser resistentes a los insectos, o semillas que están "pirimadas" con genes de resistencia a herbicidas e insectos.

55 **Promoción del Crecimiento de las Plantas**

Las interacciones entre plantas y bacterias en la rizosfera son determinantes importantes de la fertilidad del suelo y la salud de las plantas. Las bacterias de vida libre que son beneficiosas para el crecimiento de las plantas se conocen como rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas (PGPR, por sus siglas en inglés). En general, los promotores del crecimiento de las plantas funcionan de una de tres maneras: sintetizando los reguladores del crecimiento de las plantas, facilitando la absorción de los nutrientes del suelo y/o previniendo las enfermedades de las plantas. Por lo tanto, los efectos de las PGPR pueden ser tanto directos como indirectos. La promoción indirecta del crecimiento de las plantas puede implicar un efecto antagónico contra los fitopatógenos. Esto puede lograrse, por ejemplo, mediante la producción de sideróforos, síntesis de antibióticos y la producción de HCN y/o enzimas degradadoras de la pared celular. Los efectos directos de la promoción del crecimiento de las plantas se logran mediante la regulación de las fitohormonas (que ayudan en el desarrollo de las plantas y las raíces y la protección

contra el estrés) y la solubilización de fosfatos minerales y otros nutrientes.

5 Las composiciones divulgadas en el presente documento, en particular, el aislado F727 de *Bacillus sp.* y/o un sobrenadante, filtrado, extracto, compuesto, metabolito o fracción celular obtenidos de un cultivo de F727 de *Bacillus sp.*, pueden usarse para modular o, más particularmente, para promover el crecimiento de las plantas, p.ej. cultivos tales como frutas (por ejemplo, fresa), verduras (por ejemplo, tomate, calabaza, pimientos y berenjenas), legumbres o cultivos de granos (por ejemplo, soja, trigo, arroz, maíz), árbol, flor plantas ornamentales, arbustos (p. ej., algodón, rosas), hierba (p. ej., césped inglés anual, césped Bermuda, hierba del bisonte, agrostis colonial, agrostis rastrera, centavito, festuca dura, pasto azul de Kentucky, grama gruesa, césped inglés perenne, festuca roja, pasto azul áspero, 10 paspalum de la orilla del mar, hierba de San Agustín, festuca alta, grama zoysia, etc.), plantas 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(s) semilla(s) en una(s) planta(s).

15 Las composiciones divulgadas en el presente documento, o producto formulado, se pueden usar solos o en combinación con uno o más componentes como se describe a continuación, tales como agentes promotores del crecimiento y/o agentes anti-fitopatógenos en una mezcla de tanque o en un programa (aplicación secuencial llamada rotación) con orden predeterminado e intervalo de aplicación durante la temporada de crecimiento. Cuando se usa en combinación con los productos anteriormente mencionados, 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 20 en el presente documento) es, en determinadas realizaciones, mayor que la suma del efecto de cada componente individual. Por tanto, el efecto se potencia 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.

25 La composición se puede aplicar por 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 (de aproximadamente 0,25 a aproximadamente 1,5 % y más particularmente de aproximadamente 0,5 % a aproximadamente 1,0 % en volumen) antes de trasplantar la fruta o verdura al suelo.

30 Como alternativa, la composición se puede aplicar por goteo u otro sistema de riego. Específicamente, la composición puede inyectarse en un sistema de riego por goteo. En una realización particular, la composición se aplica a una concentración de 1×10^8 unidades formadoras de colonias (UFC)/ml en un volumen de aproximadamente 11 a aproximadamente 4 cuartos por 4046,86 m² (1 acre).

35 En otra realización más, la composición se puede añadir como una aplicación en surco. Específicamente, la composición se puede añadir como una pulverización en el surco en la siembra usando boquillas calibradas para suministrar una producción total de 0,007570822-0,02271246 m³(2-6 galones)/046,86 m² (1 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.

40 Las mezclas de las composiciones descritas con, por ejemplo, un adyuvante sólido o líquido se preparan de manera conocida. Por ejemplo, las mezclas pueden prepararse mezclando y/o moliendo homogéneamente los principios activos con extendedores tales como disolventes, transportadores sólidos y, cuando sea adecuado, compuestos tensoactivos (tensoactivos). Las composiciones también pueden contener ingredientes adicionales tales como estabilizantes, reguladores de la viscosidad, aglutinantes, adyuvantes, así como fertilizantes u otros principios activos 45 para obtener efectos especiales.

Combinaciones con Agentes Promotores del Crecimiento Vegetal

50 Las composiciones divulgadas en el presente documento pueden usarse en combinación con otros agentes promotores del crecimiento tales como fertilizantes sintéticos u orgánicos (por ejemplo, fosfato de diamonio, 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 con hormona de enraizamiento para trasplantes, ya sea solo o en combinación con reguladores del crecimiento vegetal, tal como IBA (ácido indol butírico) y NAA (ácido naftalén acético), y microbios promotores del crecimiento, tal como, por ejemplo, PPFM (metilotrofos facultativos de color rosa 55 pigmentado), *Bacillus spp.*, *Pseudomonads*, *Rhizobia*, y *Trichoderma*.

Agentes antifitopatógenos

60 La composición divulgada en el presente documento también se pueden usar en combinación con agentes antifitopatógenos, tales como extractos vegetales, bioplaguicidas, protectores de cultivos inorgánicos (tal como cobre), tensoactivos (como los rhamnolípidos; Gandhi et al., 2007) o aceites naturales como el aceite parafínico y el aceite de árbol de té que poseen propiedades plaguicidas o fungicidas o bactericidas químicos bien con un solo sitio, de múltiples sitios o con modo desconocido de acción. 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 65 causa enfermedades transmitidas por el suelo en una planta, o de manera alternativa, previene la infección de una planta por un patógeno vegetal. Un patógeno vegetal incluye, pero sin limitación, un hongo, bacteria, actinomiceto o

virus.

Como se ha indicado anteriormente, el agente antifitopatígeno 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 externo 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 (p. ej., bitertanol, miclobutanilo, penconazol, propiconazol, triadimefón, bromuconazol, ciproconazol, diniconazol, fenbuconazol, hexaconazol, tebuconazol, tetraconazol). En una realización más particular, el agente antifúngico es miclobutanil. En otra realización particular más, el agente antifúngico es un inhibidor externo de quinona (p.ej., estrobilurina). La estrobilurina puede incluir, pero sin limitación, azoxiestrobina, kresoxima-metilo o trofloxiestrobina. En otra realización particular más, el agente antifúngico es una quinona, p. ej., quinoxifeno (4-fluorofenil éter de 5,7-dicloro-4-quinolilo).

Aún en otra realización, 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.

Aún en otra realización, el agente antifitopatígeno puede ser estreptomycin, tetraciclina, oxitetraciclina, cobre o kasugamicina.

Ejemplos

25 **Ejemplo 1: Aislamiento y caracterización de aislado F727 de *Bacillus sp.* mediante secuencias de ARNr 16S, *recA* y *phoR***

La cepa F727 de *Bacillus sp.* se aisló de una muestra de suelo recogida en Jonesville, CA, utilizando métodos tradicionales de dilución en placa. El aislado se identificó como un *Bacillus sp.* mediante amplificación por PCR y secuenciación de los genes del ARNr 16S, *recA* y *phoR* utilizando cebadores bacterianos universales. Cerritos et al. (2008) Int. J. Sys. Evol. Microbiol. 58:919-923; Guo et al. (2012) Can. J. Microbiol. 58: 1295-1305.

El brote a partir de una placa de dextrosa con 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 MoBio Ultra Clean. Se comprobó la calidad/cantidad de extracto de ADN mediante electroforesis de una alícuota de 5 µl en un gel de agarosa al 1 %.

Secuencias de ARNr

Las reacciones de PCR para la amplificación del gen del ARNr 16S se establecieron combinando 2 µl del extracto de ADN limpio con 25 µl de GoTaq Green Mastermix, 1,5 µl de cebador directo (cebador FD1, 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG3' (SEQ ID NO: 4) y 1,5 µl de cebador inverso (cebador RD1, 5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3' (SEQ ID NO: 5)). El volumen de reacción se ajustó a 50 µl con agua estéril libre de nucleasas. La reacción de amplificación se realizó usando 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, calidad y cantidad del producto de amplificación se evaluó mediante electroforesis de una alícuota de 5 µl en un gel de agarosa al 1 %, y mediante la comparación de 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 de PCR MoBio. El producto de PCR limpio se sometió a secuenciación directa utilizando los cebadores descritos anteriormente.

Las secuencias directa e inversa se alinearon utilizando el programa informático BioEdit, y se creó una secuencia consenso de 1459 pb.

Secuencia FD1 16S de F727:

TATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGAC
GGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGG
GGCTAATACCGGATGCTTGTGTTGAACCGCATGGTTCAAACATAAAAGGTGGCTTCGG
CTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACC
AAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACA
CGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTC
TGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTT
AGGGAAGAACAAGTGCCGTTCGAATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAA
GCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCG
GAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCC
CGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGGGA ACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAG
TGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGA
AGGGCACTCTCTGGTCTGTA ACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAG
GATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTAGGGGGTTT
CCGCCCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCA
AGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTT
AATTCGAAGCAACGCNAGAACCTTACCANGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAG
ATAGGACGTCCCCTTCGGGGGCAGAGTGACNNNGGNGCATGGNNGTCGTCAGCTCGT
GTCGTGAGATGTTGGGTAAGTCCCGCACNAGCGCAACCCNTTGATCTTANTTGCCAG

CATTcanttggnnnnnnnnnnnnnnnnnnactgccnnnacnancnccgnnnaaggnnnggg
natnacgtnnannnatncnngcccnnnnntgacnnnnnnncacnccnnnnnnnnnn
nanngnnnnnnaannanngggncnnnnngnnnnnnnaaanncnncnncnncnncn
gngnn (SEQ ID NO:1)

Secuencia RD1 16S de F727:

TCATCTGTCCCACCTTCGGCGGCTGGCTCCATAAAGGTTACCTCACCGACTTCGGGTG
TTACAAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGAACGTATTCACC
GCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCAGCTTCACGCAGTCGAGTTGCAGAC
TGCGATCCGAACTGAGAACAGATTTGTGGGATTGGCTTAACCTCGCGGTTTCGCTGC
CCTTTGTTCTGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGAT
TTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACCGGCAGTCACCTTAGAGTGCCCAA
CTGAATGCTGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACAT
CTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTCTGCCCCGAAGGGGA
CGTCCTATCTCTAGGATTGTCAGAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTG
CTTCGAATTAAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCGTCAATTCTTTGAGT
TTCAGTCTTGCGACCGTACTCCCCAGGCGGAGTGCTTTAATGCGTTAGCTGCAGCACT
AAGGGGCGGAAACCCCTAACACTTAGCACTCATCGTTTTACGGCGTGGACTACCAG
GGTATCTAATCCTGTTTCGCTCCCCACGCTTTCGCTCCCTCAGCGTCAGTTACAGACC
CAGAGAGTCGCCTTCGCCCCACTGGTGTTCCTCCACATCCTCTACGCATTTACCCGG
CTACAACGTGGAATTCACACTCTCCTCTTCTGCACTCAAGTTTCCCAGTTTCCAATGA
CCCCTCCCCGGTTGAGCCCCGGGGCTTTCACATCAGACTTAAAGAAACCCGCCTGCGA
GCCCTTACGCCAATAATTCCGGACACGCTTGGCCACCTACGTATTACCGCGCTTGC
TTGGCACGTTAGTAGCCGTGGCTTTTCTGGTTAGTTAACCGTCAGTGCCGCCTATTTCG
GAACGGTACTTGTTCTTCCCTACACAGAGCTTTACGATCGAAACTCATCACCTCCACG
CGCGTGCTCGTCAGAACTTTCGTCATGCGAAGATCCTACTGCTGCCTCCGTAGGGTTG
GCGTTTCTCTCAGTCCAGTGGCCATACGTCAGTAGCTACCCATCGTGCCTAGTGAGCG
TTACCTCACCCACCTAGGC (SEQ ID NO:2)

Secuencia Consenso 16S de F727:

TATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGAC
GGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGG
GGCTAATACCGGATGCTTGTGTTGAACCGCATGGTTCAAACATAAAAGGTGGCTTCGG

5

CTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACC
AAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACA
CGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTC
TGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCCGATCGTAAAGCTCTGTTGTT
AGGGAAGAACAAGTGCCGTTTGAATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAA
GCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCCAAGCGTTGTCC
GGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGGTTTTCTTTAAGTCTGATGTGAAAGC
CCCCGGGCTCAACCGGGGAGGGGTCATTGGAAACTGGGGAACTTGAGTGCAGAAGA
GGAGAGTGAATTCACGTTGTAGCCGGGTGAAATGCGTAGAGGATGTGGAGGAACA
CCAGTGGGGCGAAGGCGACTCTCTGGGTCTGTAAGTACGCTGAGGGAGCGAAAGCG
TGGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACACGATGAGTGC
TAAGTGTTAGGGGTTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGC
CTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGCACAAG
CGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACA
TCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCCTTCGGGGGCAGAGTGACAGGTGGTG
CATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCA
ACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTGAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACA
AACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTAC
ACACGTGCTACAATGGACAGAACAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTTAAGCCAATCC
CACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAA
TCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACA
CCGCCGTCACACCAGAGAGTTTGTAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTATGG
AGCCAGCCGCCGAAGGTGGGACAGATGA (SEQ ID NO:3)

5 La secuencia consenso del gen del ARNr 16S de la cepa F727 se comparó con las secuencias disponibles de representantes del dominio bacteriano usando BLAST. La coincidencia de especie más cercana fue a *Bacillus sp.* (número de registro GU250449.1), con un 99 % de similitud. Ninguna secuencia única de 16S en las bases de datos disponibles públicamente mostró una similitud del 100 % con la cepa F727.

10 Adicionalmente, la secuencia consenso se analizó utilizando el servidor EzTaxon-e (eztaxon-e.ezbiocloud.net/; Kim et al., 2012) según datos de secuencia de ARNr 16S. Las coincidencias más cercanas (mostradas en la Tabla 1) incluyeron cepas tipo para varias especies del género *Bacillus* que no pueden diferenciarse basándose únicamente en secuencias de ARNr 16S.

Tabla 1

Orden	Nombre	Cepa	Autores	Registro	Similitud por pares (%)	nt Dif/Total	Completo (%)
1	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>inaquosorum</i>	BGSC 3A28 (T)	Rooney et al. 2009	EU138467	99,66	4/1168	79,3
2	<i>Brevibacterium halotolerans</i>	DSM 8802 (T)	Delaporte y Sasson 1967	AM747812	99,65	5/1442	100
3	<i>Bacillus mojavensis</i>	RO-H-1(T)	Roberts et al. 1994	JH600280	99,58	6/1442	100
4	<i>Bacillus vallismortis</i>	DV1-F-3(T)	Roberts et al. 1996	JH600273	99,51	7/1442	100
5	<i>Bacillus tequilensis</i>	10b(T)	Gatson et al. 2006	HQ223107	99,51	7/1427	98,5
6	<i>Bacillus siamensis</i>	KCTC 13613(T)	Sumpavap ol et al. 2010	AJVF01000043	99,45	8/1442	100
7	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	NCIB 3610 (T)	(Ehrenberg 1835) Cohn 1872	ABQL01000001	99,45	8/1442	100
8	<i>Bacillus</i> sp. subsp. <i>plantarum</i>	FZB42(T)	Borriß et al. 2011	CP000560	99,38	9/1442	100
9	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i>	NRRL B-23049(T)	Nakamura et al. 1999	CP002905	99,38	9/1442	100
10	<i>Bacillus atrophaeus</i>	JMC 9070 (T)	Nakamura 1989	AB021181	99,38	9/1442	100
11	<i>Bacillus</i> sp. subsp. <i>amyloliquefaciens</i>	DSM7(T)	Borris (ex Fukumoto 1943) Priest et al. 1987	FN597644	99,31	10/1442	100
12	<i>Bacillus methylotrophicus</i>	CBMB205(T)	Madhaya n et al. 2010	EU194897	99,09	13/1434	98,3
13	<i>Bacillus licheniformis</i>	ATCC14580(T)	(Weigman n 1898) Chester 1901	AE017333	98,06	28/1441	100
14	<i>Bacillus sonorensis</i>	NRRL 23154(T)	B- Palmisano et al. 2001	AF302118	97,7	32/1389	95,7
15	<i>Bacillus aerius</i>	24K(T)	Shivaji et al. 2006	AJ831843	97,36	38/1442	100
16	<i>Bacillus aerophilus</i>	28K(T)	Shivaji et al. 2006	AJ831844	97,15	41/1441	100
17	<i>Bacillus altitudinis</i>	41 KF2b(T)	Shivaji et al. 2006	AJ831842	97,15	41/1441	100
18	<i>Bacillus stratosphericus</i>	41 KF2a(T)	Shivaji et al. 2006	AJ831841	97,15	41/1441	100
19	<i>Bacillus safensis</i>	FO-036b(T)	Satomi et al. 2006	AF234854	97	43/1434	97,5

Secuencias de recA

Las reacciones de PCR para la amplificación del gen de *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'- GATCGTCARGCAGSCYTWGAT - 3', SEQ ID NO:6), y 1,5 µl de cebador inverso (*recAr*, 5'- TTWCCRACCATAACSCCRAC -3', SEQ ID NO:7). El volumen de reacción se ajustó a 50 µl usando agua estéril libre de nucleasas. La reacción de amplificación 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.

El tamaño, calidad y cantidad del producto de PCR se evaluó mediante electroforesis de una alícuota de 5 µl en un gel de agarosa al 1 %, y mediante la comparación de 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 de PCR MoBio. El producto de PCR limpio se sometió a secuenciación directa utilizando los cebadores descritos anteriormente.

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

Secuencia Directa de recA de F727:

AACATTCGGCAAGGTTCCATCATGAAACTCGGGGAAAAGACGGATACAA
 GAATTTCAACAGTTCCGAGCGGTTCCCTTGCACCTTGATACCGCTCTCGGAA
 TAGGCGGATACCCGCGCGGACGGATTATTGAAGTATACGGACCTGAAAGC
 TCAGGTAACGACTGTAGCGCTTCATGCGATTGCTGAAGTTCAGGAGAA
 AGGCGGACAAGCCGCATTTATTGATGCTGAGCATGCCCTTGACCCTGTTTA
 CGCGCAAAGCTCGGTGTAAATATTGAGGAGCTGCTGCTTTCTCAGCCTG
 ATACGGGAGAGCAGGCGCTTGAGATTGCCGAAGCGCTGGTACGAAGCGG
 AGCCGTCGATATCGTAGTTGTGCGACTCTGTTGCGGCGCTTGTCGCCGAAAGC
 TGAAATCGAAGGAGACATGGGGGATTCCCACGTCGGTTCAGGCCCCTT
 TGATGTCTCAAGCGCTCCGTAAGCTTTCCGGTGCCATCAATAAATCTAAAA

CAATCGCAATCTTTATTAACCAAATTCGTGAAAAAGTCGGCGTTAGGGTC
 GGAAAAAA (SEQ ID NO:8)

Secuencia Inversa de recA de F727:

GTATAAGATTGCGATTGTTTTAGATTTATTGATGGCACCGGAAAGCTTACG
 GAGCGCTTGAGACATCAAACGGGCTGCAAACCGACGTGGGAATCCCCA
 TGTCTCCTTCGATTTTCAGCTTTTCGGGACAAGCGCCGCAACAGAGTCGACA
 ACTACGATATCGACGGCTCCGCTTCGTACCAGCGCTTCGGCAATCTCAAG
 CGCCTGCTCTCCCGTATCAGGCTGAGAAAGCAGCAGCTCCTCAATATTTAC
 ACCGAGCTTTTTCGCGTAAACAGGGTCAAGGGCATGCTCAGCATCAATAA
 ATGCGGCTTGTCGCTTTCTCCTGAACCTTCAGCAATCGCATGAAGCGCTA
 CAGTCGTTTTACCTGAGCTTTCAGGTCCGTATACTTCAATAATCCGTCCGC
 GCGGGTATCCGCCTATTCCGAGAGCGGTATCAAGTGCAAGGGAACCGCTC
 GGAAGTGTGAAATTCTTGATCCGTCTTTTCCCGAGTTTCATGATGGAA
 CCTTTGCCGAATTGTTTTTCTATTTGCTTAAGAGCCATATCWAAGRCTGWA
 WTRAMRATCAA (SEQ ID NO:9)

Secuencia Consenso de recA de F727:

AAGGTTCCATCATGAAACTCGGGGAAAAGACGGATAACAAGAATTTCAAC
 AGTTCCGAGCGGTTCCCTTGCACCTTGATACCGCTCTCGGAATAGGCGGAT
 ACCCGCGCGGACGGATTATTGAAGTATACGGACCTGAAAGCTCAGGTAAA
 ACGACTGTAGCGCTTCATGCGATTGCTGAAGTTCAGGAGAAAGGCGGACA
 AGCCGCATTTATTGATGCTGAGCATGCCCTTGACCCTGTTTACGCGCAAAA
 GCTCGGTGTAAATATTGAGGAGCTGCTGCTTTCTCAGCCTGATACGGGAG
 AGCAGGCGCTTGAGATTGCCGAAGCGCTGGTACGAAGCGGAGCCGTCGAT
 ATCGTAGTTGTCGACTCTGTTGCGGCGCTTGTCCCGAAAGCTGAAATCGA
 AGGAGACATGGGGGATTCCCACGTCGGTTTGCAGGCCCGTTTGATGTCTC
 AAGCGCTCCGTAAGCTTTCCGGTGCCATCAATAAATCTAAAACAATCGCA
 ATCTT (SEQ ID NO:10)

5 La secuencia consenso del gen *recA* de la cepa F727 (SEQ ID NO: 10) se comparó con secuencias bacterianas representativas usando BLAST. La coincidencia de especie más cercana fue al genoma completo de *Bacillus amyloliquefaciens* (número de registro CP002927.1), con un 92 % de similitud.

Secuencias de *phoR*

10 Las reacciones de PCR para la amplificación del gen de *phoR* se establecieron combinando 2 µl del extracto de ADN limpio con 25 µl de GoTaq Green Mastermix, 1,5 µl de cebador directo (*phoR*-f: 5'- TTYARYTCATGRGAVACATT -3', SEQ ID NO:11) y 1,5 µl de cebador inverso (*phoR*-r: 5'- GGNTAYAAANARGAGGAGCC - 3', SEQ ID NO:12). El volumen de reacción se ajustó a 50 µl usando agua estéril libre de nucleasas. La reacción de amplificación se realizó en una máquina termocicladora en las siguientes condiciones: 5 minutos a 95 °C (desnaturalización inicial), 35 ciclos de 45 segundos a 95 °C, 45 segundos a 48 °C y 1 minuto a 72 °C, seguido de 10 minutos a 72 °C (extensión final) y 15 una temperatura de mantenimiento final de 4 °C.

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

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

Se obtuvo una secuencia de *phoR* de 998 nucleótidos usando el cebador inverso descrito anteriormente.

25 **Secuencia Inversa de *phoR* de F727:**

TCGTTGTCTGTATCATATTGGTTTTTCAGTGTTCTCGGCCTTTTCTTGCAGCAGCTCAT
 TTCTTCATCCGCCAAGGAAAGAACGGAGGGACAGCTTGAAAAGGAAGCCGCATACAT
 AGCCGGACTCCTTGACGCCGGCCAAGTAAACAATAAAAAGAAACGAAACGGTCATTAA
 AGATGCCAGCCGTACATTAGATATCGACGTGTCCGTATTAATGAAAAGGCCGCGG
 TTTATATCACTCAGGCAGACGCGCTGATGACTCGGCTATAAAGGAATTCGTCTCCCG
 TAATAAAAATGCGGCGGCGATTTCAGAACGGAGAGAAAGTATGGCATGGAACGGCCCT
 TAAAACGCCGCCGCAACGGCGGGATATGTGCTCGTTTCTCGCGGATCGATAA
 AGGTTCGAATATAACAGGGGAAATGTGGGGCATGCTGGCTGCAAGCCTTTGTAAGTGC
 TTTTATTATTATCGTTTTTCTTCTATACGAATATGACCTCCCGTTACAAAAGGTCAAT
 CGACTCCGCGACAAAAGTGGCCACTGAGCTGTCTAAGGGGAACTATGACGCCCGCTCC
 TACGGCGGGTACGCAAGACGCTCAGACCGTCTCGGGCGGCTATGAACAGCCTCGCTG
 TGGATTTGATGGAATGACGAGAACGCAGGATATGCAGCGGACCGCCTGCTGACCG
 TCATCGAAAATATCGGATCAGGTTTGATTTTAATAGACGGGAGAGGCTTTATTAATC
 TCGTGAACAGGTTCGTATACGAAGCAGTTCATACAAATCCTGAACGTCTGCTTCGGC
 GTCTCTACCATGACGCATTTGAGCATGAGGAAATCATTCGGCTGGTCAAGACATCT
 TTATGACAGAAACGAAGAAACGCCAGCTGCTCACGCTTCCCATCAAATCGAACGGC
 GCTATTTTGAGTTGACGGCGTCCCGATTATGGGCCCTGACGATGAATGGAAAAGGC
 ATTGTTCTCGTGTTCATGATATGAC (SEQ ID NO:13)

La secuencia inversa de *phoR* se comparó con secuencias bacterianas representativas usando BLAST. La

coincidencia de especie más cercana fue al genoma completo de varias cepas de *Bacillus amyloliquefaciens* únicamente con un 83 % de similitud.

Ejemplo 2: Composición de Ácidos Grasos de aislado F727

Se realizó un perfil de ácidos grasos del aislado F727 en MIDI Labs, Inc (Newark, DE), de acuerdo con los estándares comerciales. Los resultados se muestran en la Tabla 2. La comparación de su perfil de ácidos grasos con la base de datos de ácidos grasos RTSBA6 6.10 mostró que el aislado F727 tenía un índice de similitud de 0,885 con *Bacillus subtilis*.

Tabla 2

Ácido Graso	%	Ácido Graso	%
13:0 iso	0,44	16:0 iso	2,57
13:0 anteiso	0,32	16:1w11c	2,53
14:0 iso	1,09	16:0	2,99
14:0	0,45	17:1w10c	2,92
15:0 iso	26,19	Sum 4	0,82
15:0 anteiso	37,58	17:0 iso	12,59
16:1 w7c OH	0,56	17:0 anteiso	8,71
		18:0	0,23

Ejemplo 3: Caracterización del aislado F727 mediante perfil de proteínas MALDI-TOF

Se realizó una identificación genética de proteínas por espectroscopía de masas MALDI-TOF del aislado F727 en MIDI Labs, Inc. (Newark, DE). El aislado F727 mostró un perfil de proteínas MALDI-TOF a diferencia de cualquier otro microorganismo presente en la base de datos de espectros de masas. Se observaron algunas similitudes con los perfiles de proteínas de *Bacillus vallismortis*, *Bacillus mojavensis* y *Bacillus subtilis*; sin embargo, ninguna de las puntuaciones de similitud fue lo suficientemente alta como para ser indicativo de una coincidencia genérica.

Ejemplo 4: Caracterización Bioquímica de aislado F727 de *Bacillus sp.*

Tinción de Gram

La tinción de Gram es un método para diferenciar bacterias en función de las propiedades físicas de la pared celular, principalmente la composición de peptidoglicano. Los aislados bacterianos grampositivos tienen una capa gruesa de peptidoglicano dando como resultado una tinción púrpura/azul; mientras que los aislados bacterianos gramnegativos tienen una capa más delgada de peptidoglicano en la pared celular, dando como resultado una tinción roja/rosa. La inspección microscópica del aislado F727 después de la tinción de Gram reveló células de color púrpura, lo que indica que el aislado F727 de *Bacillus sp.* es una bacteria Gram-positiva.

Actividad Ureasa

La prueba de ureasa se utiliza para detectar la actividad de la enzima ureasa, que cataliza la conversión de urea en amoníaco y bicarbonato. El caldo de urea contiene urea y el indicador de pH rojo fenol. El indicador se vuelve de color amarillo en un ambiente ácido y rosado en un ambiente alcalino. Si hay actividad enzimática ureasa, la urea en el caldo se degrada para producir amoníaco, y el medio se vuelve rosado, lo que indica una prueba positiva.

Después de la inoculación con el aislado F727, el caldo de urea cambió de color de rojo a amarillo, lo que indica una prueba negativa para la actividad ureasa. Por tanto, el aislado F727 de *Bacillus sp.* creó en ambiente ácido, indicativo de la ausencia de actividad ureasa.

Actividad catalasa

La prueba de catalasa se utiliza para detectar la actividad de la enzima, catalasa. La catalasa descompone el peróxido de hidrógeno en oxígeno y agua. Los organismos que poseen actividad catalasa producen burbujas de gas cuando se tratan con peróxido de hidrógeno. Las burbujas se formaron segundos después de aplicar el reactivo a un cultivo de aislado F727 de *Bacillus sp.*, lo que indica que este organismo posee actividad catalasa.

Actividad oxidasa

La prueba de oxidasa se usa para detectar la presencia de actividad de citocromo c oxidasa. Las bacterias que contienen citocromo c como parte de su cadena respiratoria son oxidasa positivas y vuelven el reactivo de color morado. Por el contrario, las bacterias que son oxidasa negativas no oxidan el reactivo, dejándolo incoloro. El aislado F727 de *Bacillus sp.* cambió el reactivo a color morado, demostrando que poseía actividad oxidasa.

Agar TSI

5 El agar hierro triple azúcar (TSI, por sus siglas en inglés) se usa para determinar la capacidad de un microorganismo para fermentar glucosa, lactosa y/o sacarosa, así como la capacidad de las bacterias entéricas para producir sulfuro de hidrógeno. El medio contiene el indicador de pH rojo fenol y sulfato ferroso, que reacciona con sulfuro de hidrógeno para producir un precipitado negro. Cuando se probó el aislado F727, el medio inclinado permaneció roja mientras que el fondo cambió de rojo a amarillo, y no se observó color negro. Estos resultados indican que el aislado F727 no produce sulfuro de hidrógeno y fermenta solo glucosa, no lactosa ni sacarosa.

10 Susceptibilidad a antibióticos

15 Susceptibilidad a antibióticos de aislado F727 de *Bacillus sp.* se probó utilizando discos antibióticos en medio Muller-Hinton. Se resuspendió una carga completa de F727 en 1 ml de agua desionizada estéril, y se sembraron en estrías 100 µl de esta suspensión sobre una placa de agar Mueller-Hinton. Después de la absorción de la siembra en estrías en el agar, se colocaron discos antibióticos cargados previamente en la placa, y la placa se incubó a 25 °C durante 48 horas. Los resultados se presentan en la Tabla 3.

Tabla 3: Susceptibilidad de F727 de *Bacillus sp.* a diferentes antibióticos

	Concentración (ug)	Susceptibilidad*
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	+++

* +++ indica altamente susceptible (sin crecimiento); ++ indica moderadamente susceptible (crecimiento reducido);

- indica que no hay susceptibilidad

20 Tira API ZYM

La tira API ZYM (BioMerriex) proporciona un método para probar diversas actividades enzimáticas de un microbio. El ensayo se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante, y en la Tabla 4 se muestra un resumen de los resultados.

25 **Tabla 4**

N.º	Enzima analizada para	Sustrato	pH	Interpretación		Resultados
				Positivo	Negativo	
1	Control		8,5	Incoloro o color de la muestra si tiene una coloración intensa		-
2	Fosfatasa alcalina	2-naftil fosfato	6,5	Violeta	Incoloro o amarillo muy pálido	++
3	Esterasa (C 4)	2-naftil butirato	7,5	Violeta		++
4	Esterasa Lipasa (C 8)	2-naftil caprilato	7,5	Violeta		+
5	Lipasa (C 14)	2-naftil miristato	7,5	Violeta		-
6	Leucina arilamidasa	L-leucil-2-naftilamida	7,5	Naranja		+
7	Valina arilamidasa	L-valil-2-naftilamida	7,5	Naranja		+
8	Cisteína arilamidasa	L-cistil-2-naftilamida	7,5	Naranja		-

N.º	Enzima analizada para	Sustrato	pH	Interpretación		Resultados
				Positivo	Negativo	
9	Tripsina	N-benzoil-DL-arginina-2-naftilamida	8,5	Naranja		-
10	α-quimotripsina	N-glutaril-fenilalanina-2-naftilamida	7,5	Naranja		-
11	Fosfatasa ácida	2-naftil fosfato	5,4	Violeta		+++
12	Naftol-AS-BI-fosfohidrolasa	Naftol-AS-BI-fosfato	5,4	Azul		+++
13	α-galactosidasa	6-Br-2-naftil -αD-galactopiranosido	5,4	Violeta		-
14	β-galactosidasa	2-naftil -βD-galactopiranosido	5,4	Violeta		-
15	β-glucuronidasa	Naftol-AS-BI-βD-glucurónido	5,4	Azul		-
16	α -glucosidasa	2-naftil -αD-galactopiranosido	5,4	Violeta		-
17	β-glucosidasa	6-Br-2-naftil-βD-glucopiranosido	5,4	Violeta		-
18	N-acetil-β-glucosaminidasa	1 -naftil-N-acetil-βD-glucosaminidasa	5,4	Marrón		-
19	α-manosidasa	6-Br-2-naftil-αD-manopiranosido	5,4	Violeta		-
20	α-fucosidasa	2-naftil-αL-fucopiranosido	5,4	Violeta		-

Tira API 20 NE

5 La tira API @20 NE consta de 20 microtubos que contienen sustratos deshidratados. Las pruebas convencionales se inocularon con suspensión de aislado F727 de *Bacillus sp.* que reconstituye el medio. El metabolismo produjo cambios de color en los microtubos. Las pruebas de asimilación se inocularon con un medio mínimo y el aislado F727 de *Bacillus sp.* crece si la bacteria es capaz de utilizar el sustrato. Las reacciones se analizaron de acuerdo con la tabla de lectura del fabricante, y los resultados se resumen en la Tabla 5.

Tabla 5					
Positivo: + Negativo: - Débil: ±					
Prueba	Principio Activo	Reacción/Enzimas	Resultados		
			Negativo	Positivo	Sumario
NO ₃	Nitrato de Potasio	Reducción de nitratos a nitritos	NIT 1 + NIT 2, lectura después de 5 min		+
			Incoloro	Rosa-Rojo	
		Reducción de nitratos a nitrógeno	ZN, lectura después de 5 min		-
			Rosa	Incoloro	
TRP	L-triptófano	Producción de indol (triptófano)	JAMES, lectura inmediatamente		-
			Incoloro Verde/amarillo pálido	Rosa	
<u>GLU</u>	D-glucosa	Fermentación (glucosa)	Azul a verde	Amarillo	-
<u>ADH</u>	L-arginina	Arginina Dehidrolasa	amarillo	Naranja/rosa/rojo	-
<u>URE</u>	Urea	Ureasa	amarillo	Naranja/rosa/rojo	-
ESC	Citrato férrico de esculina	Hidrólisis (β-glucosidasa)(esculina)	amarillo	gris/marrón/negro	+
GEL	Gelatina origen bovino)	Hidrólisis (proteasa)(gelatina)	Sin difusión de pigmentos	Difusión de pigmento negro	+
PNG	4-nitrofenil-βD-galactopiranosido	B-galactosidasa (Para-nitrofenil-βD-galactopiranosidasa)	incoloro	Amarillo	-
<u>IGLU</u>	D-glucosa	Asimilación de glucosa	Trasparente	Opaco	+

ES 2 774 163 T3

<u>ARA</u>	L-arabinosa	Asimilación de arabinosa	Trasparente	Opaco	-
------------	-------------	--------------------------	-------------	-------	---

(continuación)

Tabla 5					
Positivo: + Negativo: - Débil: ±					
Prueba	Principio Activo	Reacción/Enzimas	Resultados		
[MNE]	D-manosa	Asimilación de manosa	Trasparente	Opaco	-
[MAN]	D-manitol	Asimilación de manitol	Trasparente	Opaco	+
[NAG]	N-acetilglucosamina	Asimilación de n-acetilglucosamina	Trasparente	Opaco	+
[MAL]	D-maltosa	Asimilación de maltosa	Trasparente	Opaco	+
[GNT]	Gluconato de potasio	Asimilación de gluconato de potasio	Trasparente	Opaco	-
[CAP]	Ácido cáprico	Asimilación de ácido cáprico	Trasparente	Opaco	-
[ADI]	Ácido adípico	Asimilación de ácido adípico	Trasparente	Opaco	-
[MLT]	Ácido málico	Asimilación de malato	Trasparente	Opaco	+
[CIT]	Citrato trisódico	Asimilación de citrato trisódico	Trasparente	Opaco	±
[PAC]	Ácido fenilacético	Asimilación de ácido fenilacético	Trasparente	Opaco	-

Ejemplo 5: Aislamiento y Caracterización de compuestos A, B y C

5 Procedimiento de purificación

El siguiente procedimiento (descrito en la Figura 1) se usó para la purificación de compuestos extraídos de un cultivo celular de aislado F727 de *Bacillus sp.*

- 10 El caldo de cultivo derivado de la fermentación de 1 l de aislado F727 de *Bacillus sp.* en medio de crecimiento se extrajo con resina Amberlite XAD-7 (Asolkar *et al.*, 2006) agitando la suspensión celular con resina a 155 rpm durante dos horas a temperatura ambiente. La resina y la masa celular se recogieron por filtración a través de estopilla y se lavan con agua desionizada para retirar las sales. La resina, la masa celular y la estopilla se remojaron durante 2 horas en acetona, después de lo cual la acetona se filtró y se secó al vacío, usando un evaporador rotatorio, para proporcionar un extracto en bruto.

15 El extracto en bruto se sometió a cromatografía líquida al vacío de fase inversa C18 (VLC, por sus siglas en inglés, H₂O/CH₃OH; gradiente 80:20 a 0:100 %) para producir 6 fracciones. Estas fracciones se concentraron hasta sequedad usando un evaporador rotativo, y los residuos secos resultantes se exploraron para determinar la actividad biológica usando un ensayo de disco de agar. Véase el Ejemplo 16 a continuación. Este ensayo identificó la fracción 3 de VLC C-18 como poseedor de actividad fungicida.

20 Se sometió a la fracción 3 activa a HPLC en fase inversa (Spectra System P4000 (Thermo Scientific)) para proporcionar compuestos puros, que después se evaluaron en los bioensayos anteriormente mencionados para localizar/identificar los compuestos activos.

25 La fracción 3 activa se purificó adicionalmente en una columna HPLC C-18 (Phenomenex, Luna 10u C18(2) 100 A, 250 x 30), usando un sistema de disolventes en gradiente de agua:acetonitrilo (que contenía TFA al 0,01 %) (0-10 min; 70 % de CF₃CN acuoso, 10-20 min; 70-45 % de CH₃CN acuoso, 20-40 min; 45 - 30 % de CH₃CN acuoso, 40-60 min; 30-0 % de CH₃CN, 60-65 min; 100 % de CH₃CN, 65-70 min; 0 - 30 % de CH₃CN acuoso) a un caudal de 8 ml/min y detección UV de 210 nm. Se obtuvieron tres compuestos purificados:

- 30 Compuesto **A** (F727F3H11), que tiene un tiempo de retención de 35,95 min,
 35 Compuesto **B** (F727F3H14), que tiene un tiempo de retención de 37,26 min, y
 Compuesto **C** (F727F3H17), que tiene un tiempo de retención de 38,11 min.

Espectroscopía de masas

40 El análisis de espectroscopía de masas de los compuestos A, B y C se realizó en un instrumento de electropulverizador Thermo Finnigan LCQ Deca XP Plus (ESI) utilizando modos de ionización tanto positivos como negativos en un modo de exploración completa (m/z 100-1500 Da) en un Espectrómetro de masas LCQ DECA XP^{plus} (Thermo Electron Corp., San Jose, CA). Se utilizó un 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 de 4,6 mm x 100 mm (Phenomenex). El sistema de disolventes 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 después se mantiene durante 4 minutos a 100 % del disolvente B, y finalmente se devuelve a 10 % de disolvente B durante 3 minutos y se mantiene a 10 % de disolvente B durante 3 minutos. El caudal fue de 0,5 ml/min. El volumen de inyección fue de 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 realizó 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 por 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.

Se determinó que el peso molecular del Compuesto A (F727F3H11) era 1044, basándose en un máximo de iones moleculares a 1043,84 (M - H) en el modo de ionización negativa (Figura 2). Esta determinación estuvo apoyada por el patrón de ionización en el modo positivo ESIMS, que mostró un máximo a 1045,48 (M + H) y un máximo de ion pseudomolecular a 1067,55 (M + Na) (Figura 3).

Se determinó que el peso molecular del Compuesto B (F727F3H14) era 1058, basándose en un máximo de iones moleculares a 1057,83 (M - H) en el modo de ionización negativa (Figura 4). Esta determinación estuvo apoyada por el patrón de ionización en el modo positivo ESIMS que mostró un máximo a 1059,56 (M + H) y un máximo de ion pseudomolecular a 1081,63 (M + Na) (Figura 5).

Se determinó que el peso molecular del Compuesto C (F727F3H17) era 1072, basándose en un máximo de iones moleculares a 1071,85 (M - H) en el modo de ionización negativa (Figura 6). Esta determinación estuvo apoyada por el patrón de ionización en el modo positivo ESIMS que mostró un máximo a 1073,57 (M + H) y un máximo de ion pseudomolecular a 1095,62 (M + Na) (Figura 7).

Método de ensayo de tapón para pruebas antifúngicas de fracción y compuestos puros

Las fracciones y los compuestos purificados se probaron para determinar la actividad antifúngica de la siguiente manera. Se colocó un disco de filtro en cada cuadrante de una placa de Petri de tamaño mediano (cuatro discos en total). Cada disco se colocó a 2 cm del centro de la placa. Se dispensaron 15 µl de fracción de columna o compuesto purificado (20 mg/ml) sobre la superficie de cada uno de los dos discos opuestos entre sí. Se dispuso etanol en los otros dos discos como control. Después de cargar los discos de filtro, se colocaron pequeños tapones (aproximadamente 1 x 1 cm) de hongos en el centro de la placa de Petri. Los hongos patógenos utilizados fueron *Bipolaris maydis*, *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia homeocarpa* y *Rhizoctonia solani*. Las placas se incubaron a 25 °C y, después de 48 horas, se midió la zona de inhibición alrededor de cada disco de filtro. Los resultados se muestran en la Figura 8 para la fracción 3 de VLC y para los compuestos **A**, **B** y **C**; e indican que los tres compuestos poseen actividad fungicida significativa.

Análisis de aminoácidos de los compuestos A, B y C

El compuesto A (F727F3H11, 0,05 mg) se hidrolizó usando hidrólisis en fase líquida (HCl 6 N, Fenol al 1 %, 110 °C, 24 horas, al vacío). Después del enfriamiento, la mezcla de reacción se secó y el producto hidrolizado se disolvió en tampón de dilución Norleu a un volumen de 1,0 ml. Se cargó una alícuota de 50 µl de la muestra en la columna de intercambio iónico para análisis.

Para los patrones y la calibración, se usó la solución patrón de aminoácidos para hidrolizado de proteínas en el dispositivo Hitachi 8800 a base de Na (Sigma, A-9906) para determinar los factores de respuesta y de este modo calibrar el analizador Hitachi 8800 para todos los aminoácidos. Cada inyección contenía norleucina como patrón interno, para permitir la corrección de los resultados para variaciones en el volumen de muestra y de las variables de cromatografía. El sistema utilizó tampones de Na de Pickerin, HCl de grado secuencial de Pierce (hidrólisis), una columna de intercambio iónico de Transgenomic y un método optimizado desarrollado por Molecular Structure Facility (MSF), UC Davis. Se indican los aminoácidos individuales presentes en cada muestra. Se encontró que los aminoácidos presentes en el compuesto **A** eran glutamina (1 unidad), prolina (1 unidad), serina (1 unidad), tirosina (1 unidad) y asparagina (3 unidades).

Las composiciones de aminoácidos de los compuestos **B** y **C** se analizaron de manera similar. Se encontró que los compuestos **B** y **C** tenían los mismos aminoácidos, en la misma proporción, que el compuesto **A**.

Ejemplo 6: Efecto del aislado F727 de *Bacillus sp.* sobre *Botrytis* en Plantas de Tomate

Se trataron plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) var. Roma con sobrenadante de una fermentación de F727. Cada planta se pulverizó con aproximadamente 3 ml de sobrenadante de fermentación libre de células. Las plantas se dejaron secar y después se inocularon con 2 ml de una suspensión de esporas de *Botrytis cinere* a una concentración de $6,67 \times 10^7$ esporas/ml. Una planta de control se pulverizó con agua desionizada, dos plantas de control negativo se pulverizaron solo con esporas (a concentraciones de 1×10^7 esporas/ml y $6,67 \times 10^7$ esporas/ml), y una planta de control positivo se pulverizó con SWITCH® 65,2 WG (Cypronidil y Fludioxonil, comercializado por Bayer Crop Sciences, Inc.), en una relación de 396,89 gr/ 0,378541 m³/4046,86 m² (14 oz/100 gal/acre). Los tratamientos se realizaron por triplicado. Las plantas se colocaron en un recipiente de plástico transparente en una sala de crecimiento con luces y control de temperatura constante. La valoración de la enfermedad se realizó 8 días después del tratamiento. Las plantas se evaluaron para determinar la gravedad de la enfermedad mediante la evaluación visual de

un área foliar sintomática de la enfermedad y se obtuvo una valoración de la enfermedad. Véase, por ejemplo, WC James (1971) "A Manual of Assessment Keys in Plant Diseases." American Phytopathological Society. ISBN 978-0-89054-081-7. Los resultados, mostrados en la Figura 9, muestran que la gravedad de la enfermedad se redujo del 65 % (control infectado, no tratado) al 40 % en plantas infectadas tratadas con sobrenadante de F727.

5 En experimentos adicionales, se probaron diluciones de dos veces, cuatro veces y diez veces de WCB de F727. Usando WCB de dos fermentaciones por separado, se observó una reducción en la gravedad de la enfermedad en las tres diluciones.

10 **Ejemplo 7: Efecto del aislado F727 de *Bacillus sp.* sobre Mildiu Velloso en Lechuga**

Se plantaron plantas de lechuga (*Lactuca sativa*) var. Celtuce, a una densidad de cuatro plántulas por maceta. Cada maceta se pulverizó con 2 ml de sobrenadante de fermentación de F727.

15 Las plantas se dejaron secar y después se inocularon con 2 ml de una suspensión de esporas de *Bremia lactuca* (mildiu velloso) (1×10^5 esporas/ml). Los tratamientos se realizaron en 5 repeticiones. Las plantas tratadas se incubaron en bandejas selladas con una cubierta de plástico, a 15 ° C en una cámara de crecimiento con un fotoperíodo de 12 horas. 10 días después del tratamiento, se evaluó la gravedad de la enfermedad como se describe en el Ejemplo 6.

20 Los resultados se muestran en la Figura 10. La gravedad promedio de la enfermedad en el control no tratado fue del 54,47 %, mientras que las plantas tratadas con F727 mostraron una gravedad de la enfermedad solamente del 14,64 %. La gravedad de la enfermedad en las plantas tratadas con F727 fue comparable a la obtenida después del tratamiento de plantas con el control químico RIDOMIL® GOLD EC (4% p/p de metalaxil-M y 64 % p/p de mancozeb) (150 ppm a.i.) Syngenta, que proporcionó una gravedad del 11,67 %.

25 En experimentos adicionales, se probaron diluciones de dos veces, cuatro veces y diez veces de WCB de F727. Usando WCB de dos fermentaciones por separado, se observó una reducción en la gravedad de la enfermedad en las tres diluciones.

30 **Ejemplo 8: Comparación del efecto del aislado F727 de *Bacillus sp.* con ELEVATE**

35 Se trataron plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) var. Roma con 3 ml de sobrenadante de fermentación de F727 y se dejaron secar. Después se inocularon las plantas con aproximadamente 2 ml de suspensión de esporas de *Botrytis cinerea* ($2,8 \times 10^7$ esporas/ml). Un subconjunto de las plantas infectadas se pulverizó por segunda vez con F727, después de 2 horas o después de que el primer tratamiento estuviera seco. Las plantas inoculadas también se trataron con agua (control negativo) y ELEVATE® 50 WDG (Fenhexamid, Bayer Crop Science, Inc.) como control positivo.

40 Los tratamientos se realizaron en repeticiones de 4. Nueve días después del tratamiento, se evaluó la gravedad de la enfermedad como se describe en el Ejemplo 6. Los resultados se muestran en la Figura 11. La gravedad de la enfermedad para el control con agua fue del 38,3 %, mientras que el control positivo (ELEVATE® 50 WDG, Fenhexamid, Bayer Crop Science, Inc.) redujo la gravedad de la enfermedad al 13,33 %. Las plantas tratadas con 1x y 2x sobrenadante de F727 tuvieron una gravedad de la enfermedad de 8,3 y 5 % respectivamente.

45 **Ejemplo 9: Efecto del sobrenadante de F727 sobre la infección por *B. cinerea* en pimientos**

50 Se pulverizaron plantas de pimiento (*Capsicum annuum*) var. Serrano con aproximadamente 2 ml de sobrenadante de F727 y se dejaron secar. Después se inocularon las plantas con 2 ml de una suspensión de esporas de *Botrytis cinerea* ($2,7 \times 10^7$ esporas/ml). Las plantas se trataron por triplicado. Trece días después del tratamiento, se evaluó la gravedad de la enfermedad y se comparó con un control no tratado (pulverizado con agua) y un control positivo (pulverizado con Elevate® 50 WDG (Fenhexamid, Bayer Crop Science, Inc.) aplicado a la relación de etiqueta.

55 Los resultados, mostrados en la Figura 12, indican que el control de la enfermedad en plantas infectadas por *Botrytis cinerea* que habían sido tratadas con F727 fue comparable al obtenido mediante el tratamiento de plantas con Elevate®.

60 **Ejemplo 10: Evaluación de caldo de células completas, sobrenadante y células de F727, producidos por fermentación en tres medios contra mildiu polvoriento en pepino.**

65 Las células de F727 se fermentaron en tres medios de crecimiento diferentes (SPY, SMP y TSB). Se pulverizaron plantas de pepino de dos semanas (*Cucumis sativus*) var. SMR58 con aproximadamente 3 ml de caldo de células completas de F727, sobrenadante de F727 o células F727 obtenidos de cada una de estas tres fermentaciones. Las células se sedimentaron, después se resuspendieron en sulfato de magnesio 10 mM para pulverización. Se realizaron cuatro repeticiones por tratamiento. Las plantas se dejaron secar durante dos horas antes de pulverizarse con aproximadamente 2 ml de una suspensión de esporas de mildiu polvoriento a una concentración de $3,0 \times 10^5$

esporas/ml, que se había preparado a partir de una planta infectada. Después, se incubaron las plantas en una sala de crecimiento hasta el desarrollo de la enfermedad, y se evaluó la gravedad de la enfermedad como se describe en el Ejemplo 6.

- 5 Los resultados, expresados como porcentaje de control de enfermedad, se muestran en la Figura 13. Se observó actividad antifúngica en pepino con células completas, caldo de células completas y sobrenadantes celulares obtenidos de los tres medios.

10 **Ejemplo 11: Evaluación de la eficacia de caldo de células completas, sobrenadante y células de F727, producidos por fermentación en tres medios contra *Botrytis cinerea* en tomate.**

15 Se pulverizaron plantas de tomate de dos semanas (*Solanum lycopersicum*) var. Stupice con aproximadamente 2 ml de caldo de células completas de F727, sobrenadante de F727 o células F727, cada uno preparado a partir de tres fermentaciones por separado en diferentes medios de crecimiento (SPY, SMP y TSB). Las células se sedimentaron y se resuspendieron en sulfato de magnesio 10 mM para pulverización. Se realizaron tres repeticiones por tratamiento. Las plantas se dejaron secar durante una hora, después se colocaron en condiciones húmedas para abrir los estomas. Se pulverizó aproximadamente 1 ml de una suspensión de esporas de *Botrytis cinerea* preparada a partir de una placa de agar cultivada de diez días de antigüedad a $1,0 \times 10^7$ esporas/ml en caldo de maltosa Sabouraud al 2 % sobre cada planta. Se incubaron las plantas en una cámara de crecimiento con un fotoperíodo de 12 horas hasta el desarrollo de la enfermedad, y se evaluó la gravedad de la enfermedad como se describe en el Ejemplo 6.

25 Los resultados, expresados como porcentaje de control de enfermedad, se muestran en la Figura 14. Se observó actividad antifúngica en tomate con células completas, caldo de células completas y sobrenadantes celulares obtenidos de los tres medios.

30 **Ejemplo 12: Evaluación de la eficacia del caldo de células completas de F727, productos comerciales basados en *Bacillus* y caldo de células completas de F727 mezclados con Regalia® contra el mildiu polvoriento en pepino.**

35 Se pulverizaron plantas de pepino de dos semanas (*Cucumis sativus*) var. SMR58 en la primera hoja verdadera con aproximadamente 3 ml de: Regalia® al 5 % (*Renoutria sachalinensis*, Marrone Bio Innovation, Inc., Davis, CA) a 1:2000, Regalia® al 5 % a 1:200, caldo de células completas de F727, caldo de células completas de F727 + Regalia® al 5 % a 1:2000, Serenade® (Bayer Crop Science, Inc.) a 1:200, Sonata® (Bayer Crop Science, Inc.) a 1:200, Vacciplant® (Laboratoires Goemar S.A.) a 40 µl/50 ml, Companion® (Growth Products, Ltd.) a 1:200 y Double Nickel 55® (Certis USA, L.L.C.) a 0,06 g/50 ml. Se prepararon cuatro repeticiones por tratamiento. Las plantas se dejaron secar durante dos horas antes de que se pulverizara sobre cada planta aproximadamente 2 ml de una suspensión de esporas de mildiu polvoriento a una concentración de $3,0 \times 10^5$ esporas/ml. Las plantas se incubaron en una sala de crecimiento hasta el desarrollo de la enfermedad.

40 Los resultados, mostrados en la Figura 15, indican que el caldo de células completas de una fermentación de aislado F727 de *Bacillus sp.* (identificado como WCB MBI-110 en la Figura) es más eficaz contra el mildiu polvoriento que muchos fungicidas existentes. Los resultados para Regalia® con y sin sobrenadante de F727 se muestran en la Tabla 6. El coeficiente de sinergia de Colby indica que existe sinergia entre el caldo de células completas de F727 y Regalia® al 5 % a 1:2000.

45

Tabla 6

Tratamiento	Gravedad Media	% de Control	Colby Esperado	Coefficiente de Sinergia de Colby
WCB de F727	92,5	2,6	-	-
Regalia 1:2000 (v/v)	30	68,4	-	-
Regalia 1:2000 9v/v) en WCB de F727	8	91,6	69,3	1,32

50 **Ejemplo 13: Evaluación de la eficacia del caldo de células completas de F727, Regalia® y Double Nickel 55® contra *Phytophthora infestans* en tomate**

55 Se pulverizaron plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) var. Stupice en una etapa de dos hojas verdaderas con aproximadamente 2 ml de caldo de células completas de F727, Regalia® a 1:200 (Marrone Bio Innovations, Inc.) y Double Nickel 55® a 0,06 g/50 ml (Certis USA, L.L.C.). Se dejó secar las plantas antes de pulverizarlas hasta cubrir las con una solución de esporas de *Phytophthora infestans*, a una concentración de 10^4 esporas/ml, preparadas a partir de hojas de tomate infectadas. Las plantas se incubaron en una cámara de crecimiento a 20 °C con luz artificial. Tres días después del tratamiento, se evaluó la gravedad de la enfermedad en las plantas como se describe en el Ejemplo 6.

Los resultados, mostrados en la Figura 16, indican que el caldo de células completas de una fermentación de aislado

F727 de *Bacillus sp.* (identificado como WCB MBI-110 en la Figura) proporciona una protección más fuerte contra infección de tomates con *P. infestans*.

Ejemplo 14: Evaluación del control de F727 de *Sclerotium rolsii* in vitro

5 El aislado F727 se fermentó en medio líquido y el sobrenadante se eliminó por centrifugación. La mitad del sobrenadante se filtró a través de un filtro de 0,2 µm. Se colocaron esclerocios individuales de *Sclerotium rolsii* en los centros de placas de Petri de 10 cm y se colocaron cuatro discos de 0,5 cm de diámetro por placa a una distancia de 2 cm del hongo y a distancias iguales entre sí. Se añadieron sobrenadante de F727, sobrenadante de F727 filtrado y Pristine® (BASF) a 0,5 ml/l a los discos en partes alícuotas de 12,5 µl, hasta que dos discos opuestos contenían un total de 25 µl y los otros dos contenían 50 µl. Se prepararon dos placas por tratamiento. Las placas se incubaron a 25 °C durante tres días.

15 El porcentaje de inhibición para cada sustancia de prueba se determinó midiendo el crecimiento micelial desde el esclerocio hasta el borde más alejado de la colonia hacia cada disco. Los resultados, mostrados en la Figura 17, indican que los sobrenadantes tanto filtrados como no filtrados de F727 fueron eficaces para inhibir el crecimiento de *S. rolsii* en el ensayo de disco. El sobrenadante sin filtrar fue consistentemente más eficaz que el filtrado y su eficacia fue comparable a la del patrón comercial.

20 Ejemplo 15: Evaluación del control de F727 de *Rhizoctonia solani* en soja

Los granos de cebada estériles se inocularon con *Rhizoctonia solani* y se incubaron durante 1-2 semanas. Los granos se secaron, se entremezclaron y se mezclaron con arena en una proporción uno a uno para generar un inóculo de *R. solani*. El suelo se mezcló completamente con este inóculo hasta un volumen de 500 ml de suelo por maceta, se regó con 100 ml de agua y se incubó en una sala de crecimiento durante 24 horas. El caldo de células completas de aislado de F727 se preparó a una dosificación del 100 %, 50% y 25%. Después se inundó el suelo con 40 ml de cada dilución de caldo, y se sembraron nueve semillas de soja en cada maceta. Para cada repetición, había tres macetas y tres repeticiones por tratamiento. Las plantas se incubaron en una sala de crecimiento durante 14 días. Se evaluaron la germinación, la altura de la planta, el peso del brote fresco y el peso de la raíz fresca.

30 Se determinaron las medidas de los rodales (Tabla 7), la emergencia (Tabla 8), el peso promedio del brote (Tabla 9) y la altura media del brote (Tabla 10). Los resultados indican que el caldo de células completas de F727 aumentó la emergencia, el peso y la altura de los brotes en plantas de soja infectadas con *R. solani*.

35

Tabla 7

Tratamiento	N	Patrones (Media de 3 rep)	Dev. típica	Agrupación de Fisher
Control 1 no inoculado; tratado con agua	3	24,7	1,16	A
Control 2 no inoculado; caldo de células completas de F727 al 100 %	3	25,0	1,00	A
3- tasa de inoc 1:1600; caldo de células completas de F727 al 100 %	3	11,0	3,61	B
4- tasa de inoc 1:1600; caldo de células completas de F727 al 50 %	3	11,7	2,52	B
5- tasa de inoc 1:1600; caldo de células completas de F727 al 25 %	3	8,0	3,61	B
6- tasa de inoc 1:1600; control con agua	3	12,0	1,00	B
ANOVA p < 0,0005				LSD α =0,05

Tabla 8

Tratamiento	N	Emergencia (Media de 3 rep)	Dev. típica	Agrupación de Fisher
Control 1 no inoculado; tratado con agua	3	24,7	1,16	A
Control 2 no inoculado; WCB de F727 al 100 %	3	25,0	1,00	A
3- tasa de inoc 1:1600; caldo de células completas de F727 al 100 %	3	18,0	2,65	B
4- tasa de inoc 1:1600; caldo de células completas de F727 al 50 %	3	18,3	1,16	B

(continuación)

Tratamiento	N	Emergencia (Media de 3 rep)	Dev. típica	Agrupación de Fisher
5- tasa de inoc 1:1600; caldo de células completas de F727 al 25 %	3	14,7	3,21	B
6- tasa de inoc 1:1600; control con agua	3	15,3	1,16	B
		ANOVA p < 0,0005		LSD α =0,05

Tabla 9

Tratamiento	N	Peso Promedio del Brote (g) (Media de 3 repeticiones)	Dev. típica	Agrupación de Fisher
Control 1 no inoculado; tratado con agua	3	22,4	0,87	A
Control 2 no inoculado; WCB de F727 al 100 %	3	24,8	2,09	A
3- tasa de inoc 1:1600; WCB de F727 al 100 %	3	11,2	3,23	B
4- tasa de inoc 1:1600; WCB de F727 al 50 %	3	12,0	1,71	B
5- tasa de inoc 1:1600; WCB de F727 al 25 %	3	8,9	2,88	B
6- tasa de inoc 1:1600; control con agua	3	10,5	1,21	B
		ANOVA p < 0,0005		LSD α =0,05

Tabla 10

Tratamiento	N	Altura del Brote (cm) (Media de 3 repeticiones)	Dev. típica	Agrupación de Fisher
Control 1 no inoculado; tratado con agua	74	13,1	3,27	A
Control 2 no inoculado; WCB de F727 al 100 %	75	14,0	3,132	A
3- tasa de inoc 1:1600; WCB de F727 al 100 %	54	7,9	3,641	B
4- tasa de inoc 1:1600; WCB de F727 al 50 %	55	7,3	5,052	B C
5- tasa de inoc 1:1600; WCB de F727 al 25 %	44	6,1	5,52	C
6- tasa de inoc 1:1600; control con agua	46	6,0	5,144	C
		ANOVA p < 0,0005		LSD α =0,05

5

Ejemplo 16: Evaluación del control de F727 de patógenos de plantas bacterianos *in vitro*

Se inoculó un ml de agua estéril con un asa de cada uno de los patógenos de las plantas bacterianos, *Erwinia amylovora*, *Pseudomonas syringae*, *Bacillus cereus*, *Erwinia carotovora*, *Xanthomonas campestris*, *Xanthomonas arboricola* o *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, de placas de agar dextrosa de patata (PDA) cultivadas. Las bacterias se resuspendieron y se sembraron en estrías 100 µl de resuspensión del patógeno en una placa de agar PDA y se dejaron absorber en la placa durante 10-15 minutos. Se aplicaron discos de filtro estériles al agar y se cargaron con 20 µl de fracciones de VLC de F727 (10 mg/ml en metanol) o combinaciones de las fracciones de VLC. Las fracciones se obtuvieron de una fermentación de aislado F727 de *Bacillus sp.* en medio V8 como se describe en el Ejemplo 5, anterior.

Las placas se incubaron 24-48 horas y después se inspeccionaron para detectar la aparición de una zona de inhibición alrededor del disco del filtro, lo que indica la susceptibilidad del patógeno a la fracción de F727. Los resultados se muestran en la Tabla 11.

20

Tabla 11: Susceptibilidad de patógenos bacterianos a fracciones de F727

Muestra de F727	<i>Erwinia amylovora</i>	<i>Pseudomonas syringae</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Erwinia carotovora</i>	<i>Xanthomonas campestris</i>	<i>Xanthomonas arboricola</i>	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>
1. F727-F1	-	+	-	-	-	+	+
2. F727-F2	++	-	-	-	+	-	++
3. F727-F3	++	+	-	-	+	+	+
4. F727-F4	++	+	-	+	-	-	-
5. F727-F5	+	-	+++	+++	-	+	+++
6. F727-F6	+	-	+	-	-	-	+
7. F727-F2+F3	-	-	-	+	-	+	++
8. F727-F3+F5	-	-	+	++	-	-	+++
9. F727-F2+F6	-	-	-	-	-	-	+
10. F727-F4+F5	+	-	++	+++	-	-	+++
11. F727-F4+F6	-	-	++	-	-	-	-
12. F727-F5+F6	-	-	+++	+	-	-	++

Clave: +++ muy susceptible, ++ susceptible, - resistente

La inhibición del mayor número de especies bacterianas se observó con la Fracción 3. En consecuencia, esta fracción se sometió a un fraccionamiento adicional, tal como se describe en el Ejemplo 5, anterior. Adicionalmente, la fracción 5 muestra actividad antibacteriana contra *Bacillus cereus*, *Erwinia carotovora* y *Clavibacter*.

Ejemplo 17: Evaluación de sobrenadante y extracto en bruto de F727, preparado en diferentes medios, para el control de la germinación de patógenos fúngicos *in vitro*

- 10 El aislado F727 se fermentó en 12 medios líquidos diferentes. Las muestras de sobrenadante y extracto en bruto se analizaron en un ensayo de germinación de esporas dosis-respuesta. En una placa de 48 pocillos, se combinaron 100 µl de sobrenadante o muestra de extracto en bruto con 200 µl de agar dextrosa de patata (PDA) 1,5x y se dejó solidificar. Se prepararon suspensiones de esporas de hongos fitopatógenos a las concentraciones mostradas en la Tabla 12, y se dispensaron 50 µl de suspensión de esporas sobre la parte superior de la mezcla de PDA/tratamiento.
- 15 Las placas se incubaron a 25 °C durante 3-5 días, y se realizó una evaluación visual de la germinación de esporas de hongos.

Los resultados se muestran en la Tabla 13. Todos los sobrenadantes probados inhibieron la germinación de todos los patógenos a la concentración más baja probada (3,13 %). La actividad de los extractos en bruto varió dependiendo de los medios utilizados para cultivar las células F727 (una dilución al 0,4 % del extracto en bruto fue la concentración más baja probada). Esto indicó que la actividad de los extractos de F727 puede depender del medio en el que crecen las células y, por lo tanto, la actividad óptima contra un patógeno particular puede ajustarse en función del medio en el que crecen las células. Por ejemplo, El medio M24 se puede utilizar para cultivar células cuyos extractos se dirijan a *Fusarium*.

Tabla 12

Patógeno	Concentración de esporas usada
<i>Fusarium oxysporum f. sp. fragariae</i>	10 ⁴ esporas/ml
<i>Botrytis cinerea</i>	10 ⁴ esporas/ml
<i>Verticillium dahliae</i>	10 ⁵ esporas/ml
<i>Alternaria japonica</i>	10 ⁴ esporas/ml

Tabla 13: Concentración inhibitoria mínima del extracto en bruto de F727 de diferentes medios necesarios para prevenir la germinación de esporas de hongos

Media	<i>Botrytis cinerea</i>	<i>Fusarium oxysporum f. sp. fragariae</i>	<i>Verticillium dahliae</i>	<i>Alternaria japonica</i>
M1	0,40 %	1,56 %	0,40 %	0,40 %
M2	1,56 %	3,13 %	1,56 %	0,78 %

(continuación)

Media	<i>Botrytis cinerea</i>	<i>Fusarium oxysporum f. sp. fragariae</i>	<i>Verticillium dahliae</i>	<i>Alternaria japonica</i>
M3	0,40 %	0,78 %	0,40 %	0,40 %
M4	0,40 %	0,78 %	0,40 %	0,40 %
M5	1,56 %	Sin inhibición	3,13 %	0,40 %
M6	6,25 %	Sin inhibición	6,25 %	3,13 %
M7	25,00 %	Sin inhibición	12,50 %	0,78 %
M8	Sin inhibición	Sin inhibición	50,00 %	Sin inhibición
M11	0,40 %	1,56 %	0,40 %	0,40 %
M12	0,40 %	3,13 %	0,40 %	0,40 %
M23	0,40 %	1,56 %	0,40 %	0,40 %
M24	0,40 %	0,40 %	0,40 %	0,40 %

Ejemplo 18: Evaluación de las características de crecimiento de las plantas de F727 *in vitro*

- 5 El aislado F727 se evaluó para determinar las características de crecimiento de las plantas *in vitro*, incluyendo la capacidad de solubilizar fosfato, la producción de ACC-desaminasa, la producción de ácido indol-3-acético (IAA), la producción de sideróforos (agar CAS) y la capacidad de crecer con metanol como la única fuente de carbono (agar AMS). La solubilización de fosfato se evaluó en agar azul de bromofenol-fosfato, la actividad ACC-desaminasa se evaluó en placas de agar con ACC como única fuente de carbono y nitrógeno, la producción de sideróforos se evaluó en agar CAS y la metilotropía se evaluó en un agar de sales minerales enriquecido con metanol como la única fuente de carbono. Tal como se muestra en la Tabla 14, El aislado de F727 dio positivo en todos estos rasgos de promoción del crecimiento de las plantas.

Tabla 14

	Solubilización de Fosfato	ACC-deaminasa	IAA	agar CAS	agar AMS
F727	+++	+++	+	++	++

Clave: +++: respuesta positiva muy fuerte, ++: respuesta positiva, +: respuesta positiva débil

15

Ejemplo 19: Análisis de vigor de semillas tratadas con F727

- 20 Se esterilizaron en superficie semillas de maíz, soja, trigo, arroz, sorgo y tomate durante seis minutos con lejía al 1 % y se enjuagaron con agua estéril cinco veces. Las semillas se sumergieron durante 24 horas en una suspensión de F727 preparada en sulfato de magnesio 10 mM. Las semillas se secaron durante 30 minutos para el Experimento número 1 y durante la noche para el Experimento número 2. Se permitió que las semillas germinaran en toallas de papel húmedas durante varios días, y se midió el peso total fresco de las semillas.

- 25 Los resultados se muestran en la Tabla 15 e indican que el aislado F727 de *Bacillus sp.* promovió el crecimiento del maíz, soja, sorgo y tomate.

Tabla 15

	Experimento n.º 1		Experimento n.º 2	
	Control	F727	Control	F727
Peso fresco total (gramos)				
Maíz n.º	14,06	13,81	Maíz*	22,96
Soja	5,46	12,22	Soja	18,65
Trigo	3,83	3,61	Trigo	3,19
Arroz	1,47	1,32	Arroz	1,31
Sorgo	0,89	2	Sorgo	1,12
Tomate	0,38	0,58	Tomate	0,34

n.º var. Kandy Korn
* var. Trucker's Favorite Yellow, Boone County White y Silver King.

30

Ejemplo 20: Actividad antifúngica contra *Aspergillus niger*

- Se evaluó caldo de células completas (WCB) de una fermentación de aislado F727 de *Bacillus sp.* para determinar su efecto inhibitorio sobre el patógeno posterior a la cosecha *Aspergillus niger*, en un ensayo de inmersión de fruta. Se usó WCB sin diluir y diluido en agua estéril a concentraciones de 5 %, 20 % y 50 %.

Las uvas verdes esterilizadas se sumergieron durante cinco segundos en cada una de las concentraciones de WCB, y después se colocaron en un estante dentro de una caja de verduras. Una vez que la fruta estaba seca, cada caja recibió 24 pulverizaciones de inóculo de *A. niger* ajustado a 3×10^3 esporas/ml. Se añadieron 100 ml de agua desionizada a cada caja debajo del estante para aumentar la humedad, y las cajas se sellaron y se incubaron a temperatura ambiente. Se incluyeron en el experimento dos cajas de verduras, cada una con 5 uvas por tratamiento. Se usó un tratamiento con agua como control negativo y se usó el producto comercial Switch como control positivo.

El porcentaje de enfermedad de cada fruta se determinó observando la cobertura micelial en cada uva. Los resultados se muestran en la Tabla 16 e indican que WCB de F727 muestra una actividad *anti-Aspergillus* significativa.

Tabla 16. Porcentaje de enfermedad de *A. niger* en uvas después de un tratamiento de inmersión con WCB de F727 después de 12 días de crecimiento.

Tratamiento	% de Enfermedad Promedio	Agrupación
Agua	71	A
5 % de WCB	77,5	A
20 % de WCB	34	B
50 % de WCB	20,5	BC
100 % de B. WCB	10	C
Switch @ 104,85 gr/l (14 oz/gal)	3,5	C

Ejemplo 21: Promoción del crecimiento en maíz

Las semillas de maíz se plantaron en una mezcla de tierra para macetas, en macetas con un diámetro de 10,16 cm (4 pulgadas), a una densidad de 10 semillas por maceta. Las macetas sembradas se inundaron en el momento de la siembra y una semana después con caldo de células completas de F727. Las macetas se incubaron en un invernadero. Se evaluaron un total de 10 plantas por maceta y 9 macetas por tratamiento.

Se registró el peso fresco total después de 2 semanas de crecimiento. Las plantas de control (inundadas con agua) tenían un peso fresco promedio de $21,48 \pm 4,02$ g, mientras que las plantas que habían se habían inundado con WCB de F727 tenían un peso fresco promedio de $26,5 \pm 3,55$ g. Estas diferencias son estadísticamente significativas, según lo determinado por Minitab ANOVA Tukey's. Estos resultados proporcionan evidencia adicional de la actividad de promoción del crecimiento de WCB de F727.

Ejemplo 22: Control de Mildiu Velloso *Bremia lactucae* sobre lechuga mediante inundación de suelo con caldo de células completas de F727

Las esporas de mildiu velloso (*Bremia lactucae*) se obtuvieron cortando hojas que contienen esporas de plantas infectadas cultivadas en cajas de cultivo y agitando las hojas en 50 ml de agua desionizada. Después se filtró el líquido a través de una malla de nailon de 100 μ m. El número de esporas en el líquido filtrado se contó en un hemocitómetro, y el líquido se ajustó con agua desionizada para contener 5×10^4 esporas/ml.

Para la preparación del caldo de células completas (WCB), la cepa F727 de *Bacillus* se cultivó en medio SPY durante 24-72 horas a 25 °C.

Se plantó lechuga (c.V. Celtuce) en macetas de 63,5 cm (2,5 pulgadas) a una densidad de seis plantas por maceta. Las plantas se llevaron a una cámara de crecimiento a 16 °C con un fotoperíodo de 12 horas. Después de 10 días de crecimiento, el suelo se inundó con 20 ml de WCB de F727.

Una hora después de inundar, se pulverizó aproximadamente 1 ml de la suspensión de esporas de Mildiu Velloso descrita anteriormente en cada maceta de plantas de lechuga. Durante las primeras 48 horas después de la inoculación, las macetas se incubaron en bandejas de plástico cubiertas. Posteriormente, se incubaron durante 8 días a 16 °C con un fotoperíodo de 12 horas.

Para cada cotiledón, la gravedad de la enfermedad se calificó como porcentaje de la superficie de la hoja que estaba enferma, y se determinó la gravedad promedio para cada maceta de plantas. Los resultados para las plantas tratadas (inundación del suelo) y de control no tratadas (UTC) se compararon usando una prueba t, y se muestran en la Tabla 17 y la Figura 18. Los resultados muestran una reducción estadísticamente significativa ($p = 0.0036$) de la gravedad de la enfermedad Mildiu Velloso en plantas de lechuga que recibieron una inundación de suelo con caldo de células completas de F727.

Tabla 17: Efecto de la inundación del suelo con WCB de F727 en la infección de lechuga por mildiu velloso (prueba t de dos muestras suponiendo varianzas iguales)

	UTC	Inundación con MBI-110
Gravedad media de la enfermedad (%)	69,49306	32,125
Varianza	342,5953	345,2292
Observaciones	12	4
Varianza agrupada	343,1597	
Diferencia Media Hipotética	0	
df	14	
Stat t	3,49392	
P(T<=t) dos colas	0,003578	
t crítica de dos-colas	2,144787	

Ejemplo 23: Sinergia entre el caldo de células completas de F727 y *Bacillus amyloliquefaciens* en el control de Mildiu polvoriento *Sphaerotheca fuliginea* en pepino

5 Se preparó un inóculo de *Sphaerotheca fuliginea* enjuagando las hojas de pepino infectadas con agua desionizada y filtrando el enjuague a través de dos capas de estopilla.

10 Las plantas de pepino en la etapa de dos hojas verdaderas se pulverizaron con 2 ml de tratamiento (véase más adelante) y se dejaron secar durante tres horas, después de lo cual las plantas se inocularon cepillando las hojas con 2 ml de inóculo de *S. fuliginea* a una concentración de $2,5 \times 10^5$ conidios/ml.

Los tratamientos fueron los siguientes (con tres repeticiones por tratamiento):

- 15 1. Agua (control negativo)
2. caldo de células completas de F727 (máxima fuerza)
3. caldo de células completas de F727 (fuerza del 50 %)
- 20 4. caldo de células completas de F727 (máxima fuerza) + Double Nickel 55 (0,3362 gr/m², 3 lbs./acre)
5. caldo de células completas de F727 (fuerza del 50 %) + Double Nickel 55 (0,3362 gr/m², 3 lbs./acre)
- 25 6. Double Nickel 55 (0,3362 gr/m², 3 lbs./acre)

Para la preparación del caldo de células completas, se dejó crecer F727 en medio SPY durante 5 días. Double Nickel 55 es una preparación comercial de *B. amyloliquefaciens* (Certis USA, Columbia, MD), que tiene actividad fungicida de amplio espectro, incluida la actividad contra Mildiu Polvoriento.

30 Después de la inoculación, las plantas se incubaron en una sala de crecimiento a una temperatura de aproximadamente 25 °C durante diez días, en ese momento se evaluaron visualmente para determinar la gravedad de la enfermedad, que se evaluó como porcentaje de la superficie de la hoja que estaba enferma. Los resultados, que se muestran en la Tabla 18, se analizaron utilizando el programa informático estadístico Minitab 16 (Minitab, State College, PA) y se evaluó la posible sinergia calculando el coeficiente de sinergia de Colby. Colby (1967) "Calculating synergistic and antagonistic responses of herbicide combinations." *Weeds* 15:20-22.

Tabla 18: Efecto del caldo de células completas de F727 y mezclas con Double Nickel 55, en el control del mildiu polvoriento sobre el pepino.

Tratamiento	Gravedad de la enfermedad (%)*	% de Control (E)	Ee [#]	E/Ee
Control con agua	83,3 ± 2,9 (A)	0,0		
WCB MBI-110 al 100 %	77,5 ± 8,7	7,0		
WCB MBI-110 al 50 %	61,3 ± 22,9	26,5		
WCB MBI-110 al 100 % + DoubleNickel 55	25,0 ± 0,0 (B)	70,0	0,12	5,6
WCB MBI-110 al 50 % + DoubleNickel 55	33,6 ± 25,0 (B)	59,5	0,32	1,8
DoubleNickel 55	78,8±13,2 (A)	5,5		

(continuación)

Tratamiento	Gravedad de la enfermedad (%)*	% de Control (E)	Ee#	E/Ee
Los datos para la gravedad de la enfermedad se presentan como medias y desviaciones típicas. Las medias que no tienen la misma letra son significativamente diferentes ($p < 0,05$) usando la prueba LSD de Fisher. N.º Ee es la eficacia esperada de la fórmula de Colby (Colby, 1967): $Ee=A+B-AB/100$, donde A y B son las eficacias de los productos individuales; existe una sinergia si la eficacia de la combinación (% control, E) es mayor que Ee ($E/Ee > 1,0$).				

5 Los resultados en la Tabla 18 indican que el caldo de células completas de F727 sinergiza fuertemente con Double Nickel en el control de Mildiu Polvoriento, con coeficientes de sinergia Colby de 5,6 y 1,8, respectivamente, para caldos de células completas de fuerza completa y media fuerza.

Ejemplo 24: Promoción del crecimiento de las plantas utilizando formulaciones de talco de caldo de células completas de F727

10 Se preparó una formulación de talco mezclando un transportador seco hecho de talco (1 kg), carboximetilcelulosa (10 g), carbonato de calcio (15 g) y caldo de células completas de F727 en una proporción 1:1 (p/v) de mezcla de transportador seco: WCB. La mezcla se secó durante la noche y después se sometió a molienda fina. Esta formulación se aplicó de dos maneras. En el primer método, se aplicó al suelo en la siembra, debajo de la semilla (maíz de campo) como una aplicación en surco. En el segundo método, la formulación de talco se disolvió en agua y se usó para cebar las semillas durante la noche antes de plantar. Se usó agua como control. Las plantas se cultivaron durante dos semanas en un invernadero y se pesaron.

20 Los resultados de estos análisis se muestran en las Tablas 19 y 20. La aplicación en surcos dio como resultado un aumento del 16 % en el peso fresco promedio (Tabla 19), mientras que el cebado dio como resultado un aumento del 15 % en el peso fresco promedio (Tabla 20). Por tanto, WCB de F727 posee actividad de promoción del crecimiento.

Tabla 19: Aplicación en surco de formulación de talco de WCB de F727

	Peso fresco promedio (g)	DT	%
Control	25,8	2,63	100
F727	30,18	1,03	116,98

Tabla 20: Imprimación de semillas con formulación de talco de WCB de F727

	Peso fresco por planta (g)	%
Control	0,65	100
F727	0,75	115

25 **Ejemplo 25: Fraccionamiento del caldo de células completas de F727**

30 La cepa F727 se cultivó en un litro de un medio de fermentación adecuado (por ejemplo, SPM, SPY, TSB, V8) durante 48-72 horas a 25 °C. Se extrajo un litro de caldo de células completas con resina Amberlite XAD-7 agitando la suspensión celular con la resina a 155 rpm durante dos horas a temperatura ambiente. La resina y la masa celular se recogieron por filtración a través de estopilla y se lavan con agua desionizada para retirar las sales. La resina, la masa celular y la estopilla se remojaron durante 2 horas en acetona, después de lo cual la acetona se filtró y se secó al vacío, usando un evaporador rotatorio, para proporcionar un extracto en bruto.

35 El extracto en bruto se fraccionó por cromatografía líquida al vacío C-18 en fase inversa. En un esquema de fraccionamiento previo (Ejemplo 5 y Figura 1), se encontró actividad plaguicida en las Fracciones 3 (corte de metanol al 40-60 %) y 4 (corte de metanol al 60-80 %). Para maximizar la cantidad de actividad en una sola fracción, el procedimiento de VLC C-18 de fase inversa se alteró, como se muestra en la Tabla 21, para proporcionar un corte de metanol al 50-80 % (Fracción 4). Los Compuestos A, B y C se purificaron después, de la Fracción 4 por HPLC C-18 como se describe en el Ejemplo 5.

Tabla 21: Fracciones de VLC de extracto de F727 en Amberlite

Fracción:	Eluatos a:
1	20 % de metanol
2	40 % de metanol
3	50 % de metanol
4	80 % de metanol
5	100 % de metanol

(continuación)

Fracción:	Eluatos a:
6	50 % de metanol:acetonitrilo

Ejemplo 26: Estructura del Compuesto A determinada por análisis MS/MS

5 El compuesto de PM 1044 de la Fracción 4 (Compuesto A) se analizó por espectroscopía de masas por ionización por electropulverización/espectroscopía de masas (ESIMS/MS, por sus siglas en inglés) para obtener la secuencia de sus aminoácidos constituyentes. Los resultados se muestran en la Figura 19. Basándose en estos resultados, se determinó que el compuesto A tenía la estructura de péptido cíclico que se muestra en la Figura 20.

Ejemplo 27: Actividad bactericida de compuestos y fracciones de VLC

10 *Erwinia carotovora*, *Pseudomonas syringae*, *Xanthomonas arboricola*, *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* y *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* se sembraron en placa en agar dextrosa de patata. Después de la acumulación de suficiente biomasa, se retiró una carga completa de cada patógeno de su placa y se suspendió en agua estéril. Se sembraron en estrías 100 µl de cada suspensión sobre una placa de agar dextrosa de patata y se dejaron absorber en la placa durante 10-15 minutos.

15 Las muestras de las fracciones 4 y 5 de VLC, como se describe en el Ejemplo 25, y de los compuestos **A** (PM = 1044), **B** (PM= 1058) y **C** (PM = 1072) de la Fracción 4 de VLC descrita en el Ejemplo 25 se prepararon a 5 mg/ml en metanol, y se realizaron 5 series de diluciones en serie de dos veces de cada muestra en agua (es decir, se probaron concentraciones entre 0,15625 mg/ml y 5 mg/ml, en incrementos de concentración de dos veces). Se aplicaron discos de filtro estériles a las placas de agar y los discos se cargaron con 20 µl de cada muestra. Las placas se incubaron a 25 °C durante 3 días y después se observaron para determinar zonas de inhibición del crecimiento alrededor de los discos de filtro, lo que indica la susceptibilidad del patógeno a la muestra. Si se detectó inhibición, se determinó la concentración mínima de muestra que muestra actividad inhibitoria. Los resultados se muestran en la Tabla 21. Las fracciones 4 y 5 poseen actividad inhibitoria contra *Erwinia carotovora* y *Clavibactermichagensis*, mientras que los Compuestos **A** y **B** inhiben el crecimiento de *Acidovorax avenae*.

Tabla 21: Concentración mínima de la muestra que inhibe el crecimiento del patógeno

Patógeno	Compuesto A	Compuesto B	Compuesto C	Fracción 4	Fracción 5
<i>Erwinia carotovora</i>	Sin inhibición	Sin inhibición	Sin inhibición	1,25 mg/ml	1,25 mg/ml
<i>Pseudomonas syringae</i>	Sin inhibición				
<i>Xanthomonas arboricola</i>	Sin inhibición				
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	Sin inhibición	Sin inhibición	Sin inhibición	2,5 mg/ml	0,15625 mg/ml
<i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>citrulli</i>	5 mg/ml	5 mg/ml	Sin inhibición	Sin inhibición	Sin inhibición

30 Ejemplo 28: Actividad fungicida de compuestos y fracciones de VLC

Las muestras de las fracciones 4 y 5 de VLC, como se describe en el Ejemplo 25, y de los compuestos **A** (PM = 1044), **B** (PM = 1058) y **C** (PM = 1072) de la Fracción 4 de VLC descrita en el Ejemplo 25 se prepararon a 5 mg/ml en metanol. Las diluciones en serie de cada muestra se prepararon en una placa de 48 pocillos. La concentración más alta de cada muestra analizada fue de 500 µg/ml (10% de la concentración original) y las muestras se diluyeron posteriormente en serie en agua en incrementos de dos veces a una concentración de 3,9062 µg/ml. Se añadieron 100 µl de muestra de dilución a cada pocillo, seguido de 200 µl de agar dextrosa de patata (PDA) 1,5X, y la mezcla se dejó solidificar después, durante 10-15 minutos.

40 *Colletotrichum cereale*, *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea*, and *Verticillium dahliae* se sembraron en placa sobre PDA y se incubaron a temperatura ambiente hasta que el crecimiento de micelios cubrió toda la placa. Se añadió agua estéril a cada placa y se usó un esparcidor estéril para desplazar los micelios y las esporas. La suspensión se pasó a través de un filtro para separar el micelio y las esporas. Las esporas se contaron con un hemocitómetro y se ajustaron, diluyendo con agua, a una concentración de 10³ - 10⁴ esporas/ml.

45 *Phytophthora capsici* se colocó en placas sobre agar PARP y se cultivó a temperatura ambiente hasta que se observó un crecimiento micelial suficiente. Se añadió agua estéril a la placa y se usó un esparcidor para desplazar las esporas. La placa se incubó en una cámara Conviron a 16 °C durante 1-2 horas hasta que el esporangio liberó las zoosporas. Las esporas se recogieron después en un tubo, se contaron con un hemocitómetro, y la suspensión de esporas se ajustó, con agua, a una concentración de 10⁻³-10⁴ esporas/ml.

50

Se inocularon 50 µl de la solución de esporas de cada patógeno en cada pocillo de muestra. Las placas se incubaron a 25 °C durante 4-5 días, y se observó después, para determinar la inhibición de la germinación de esporas en los pocillos, lo que indica la susceptibilidad del patógeno a la muestra. Si se detectó inhibición, se determinó la concentración mínima de muestra que muestra actividad inhibitoria. Los resultados se muestran en la Tabla 22.

Tabla 22: Concentraciones mínimas de muestras que inhiben la germinación de las esporas

Patógeno	Comp. A	Comp. B	Comp. C	Fracción 4	Fracción 5
<i>Botrytis cinerea</i>	500 µg/ml	250 µg/ml	62,5 µg/ml	125 µg/ml	Sin inhibición
<i>Phytophthora capsici</i>	Sin inhibición				
<i>Fusarium oxysporum</i>	500 µg/ml	500 µg/ml	500 µg/ml	500 µg/ml	Sin inhibición
<i>Verticillium dahliae</i>	500 µg/ml	125 µg/ml	125 µg/ml	125 µg/ml	Sin inhibición
<i>Colletotrichum cereale</i>	125 µg/ml	62,5 µg/ml	31,25 µg/ml	62,5 µg/ml	Sin inhibición

Los Compuestos **A**, **B**, y **C** y la Fracción 4 inhibieron la germinación de esporas de todos los patógenos fúngicos probados, excepto *P. capsici*. El Compuesto **C** y la Fracción 4 mostraron las actividades inhibitorias más altas.

DEPÓSITO DE MATERIAL BIOLÓGICO

El siguiente material biológico se depositó conforme a los términos del Tratado de Budapest depositados en la Colección de Cultivos del Servicio de Investigación Agrícola (NRRL), 1815 N. University Street, Peoria, Illinois 61604 USA, y se le dio el siguiente número:

Depósito	Número de registro	Fecha del depósito
cepa F727 de <i>Bacillus</i> sp.	NRRL B-50768	1 de agosto de 2012

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 a la cual tiene derecho bajo 37 C.F.R. §1.14 y 35 U.S.C. §122. El depósito representa un cultivo sustancialmente puro de la cepa depositada. El depósito está disponible según lo 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.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Marrone Bio Innovations, Inc
 Asolkar, Ratnakar
 Cordova-Kreylos, Ana-Lucia
 McCort, Christopher
 Wilk, Debora
 Todd, Carly
 Su, Hai
 Marrone, Pamela

<120> Cepa de *Bacillus* sp. con Actividad Antifúngica, Antibacteriana y de Promoción del Crecimiento

<130> MOI-42034-PCT

<150> 61683174
 <151> 14/08/2012

<150> 13835677
 <151> 15/03/2013

<160> 13

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
 <211> 1250
 <212> ADN

<213> Secuencia de 16S FD1 de cepa F727 de *Bacillus* sp.

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (931)..(931)
 <223> n es a, c, g o t
 5
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (944)..(944)
 <223> n es a, c, g o t
 10
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1003)..(1005)
 <223> n es a, c, g o t
 15
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1008)..(1008)
 <223> n es a, c, g o t
 20
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1015)..(1016)
 <223> n es a, c, g o t
 25
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1058)..(1058)
 <223> n es a, c, g o t
 30
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1069)..(1069)
 <223> n es a, c, g o t
 35
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1079)..(1079)
 <223> n es a, c, g o t
 40
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1093)..(1093)
 <223> n es a, c, g o t
 45
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1098)..(1110)
 <223> n es a, c, g o t
 50
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1117)..(1119)
 <223> n es a, c, g o t
 55
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1122)..(1122)
 <223> n es a, c, g o t
 60
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1124)..(1124)
 <223> n es a, c, g o t
 65
 <220>

<221> misc_feature
 <222> (1128)..(1130)
 <223> n es a, c, g o t

5

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1135)..(1137)
 <223> n es a, c, g o t

10

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1141)..(1141)
 <223> n es a, c, g o t

15

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1144)..(1144)
 <223> n es a, c, g o t

20

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1149)..(1150)
 <223> n es a, c, g o t

25

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

30

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1157)..(1157)
 <223> n es a, c, g o t

35

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

40

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1165)..(1168)
 <223> n es a, c, g o t

45

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1173)..(1178)
 <223> n es a, c, g o t

50

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1182)..(1182)
 <223> n es a, c, g o t

55

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1185)..(1194)
 <223> n es a, c, g o t

60

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1196)..(1197)
 <223> n es a, c, g o t

65

<220>
 <221> misc_feature

<222> (1199)..(1204)
<223> n es a, c, g o t

5 <220>
<221> misc_feature
<222> (1207)..(1208)
<223> n es a, c, g o t

10 <220>
<221> misc_feature
<222> (1210)..(1211)
<223> n es a, c, g o t

15 <220>
<221> misc_feature
<222> (1215)..(1215)
<223> n es a, c, g o t

20 <220>
<221> misc_feature
<222> (1217)..(1221)
<223> n es a, c, g o t

25 <220>
<221> misc_feature
<222> (1223)..(1228)
<223> n es a, c, g o t

30 <220>
<221> misc_feature
<222> (1232)..(1234)
<223> n es a, c, g o t

35 <220>
<221> misc_feature
<222> (1236)..(1238)
<223> n es a, c, g o t

40 <220>
<221> misc_feature
<222> (1240)..(1240)
<223> n es a, c, g o t

45 <220>
<221> misc_feature
<222> (1242)..(1245)
<223> n es a, c, g o t

50 <220>
<221> misc_feature
<222> (1247)..(1247)
<223> n es a, c, g o t

55 <220>
<221> misc_feature
<222> (1249)..(1250)
<223> n es a, c, g o t

60 <400> 1

ES 2 774 163 T3

tatacatgca agtcgagcgg acagatggga gcttgctccc tgatgttagc ggcggacggg	60
tgagtaacac gtgggtaacc tgcctgtaag actgggataa ctccgggaaa ccgggggctaa	120
taccggatgc ttgtttgaac cgcattggtc aaacataaaa ggtggcttcg gctaccactt	180
acagatggac ccgcggcgca ttagctagtt ggtgaggtaa cggctcacca aggcaacgat	240
gcgtagccga cctgagaggg tgatcggcca cactgggact gagacacggc ccagactcct	300
acgggaggca gcagtaggga atcttccgca atggacgaaa gtctgacgga gcaacgccgc	360
gtgagtgatg aaggttttcg gatcgtaaag ctctgttggt agggaagaac aagtgccgtt	420
cgaatagggc ggcaccttga cggtaacctaa ccagaaagcc acggctaact acgtgccagc	480
agccgcggta atacgtaggt ggcaagcgtt gtccggaatt attgggcgta aagggctcgc	540
aggcggtttc ttaagtctga tgtgaaagcc cccggctcaa ccggggaggg tcattggaaa	600
ctggggaact tgagtgcaga agaggagagt ggaattccac gtgtagcggg gaaatgcgta	660
gagatgtgga ggaacaccag tggcgaaggc gactctctgg tctgtaactg acgctgagga	720
gcgaaagcgt ggggagcgaa caggattaga taccctggta gtccacgccg taacgatgag	780
tgctaagtgt tagggggttt ccgccctta gtgctgcagc taacgcatta agcactccgc	840
ctggggagta cggtcgcaag actgaaactc aaaggaattg acgggggccc gcacaagcgg	900
tggagcatgt ggtttaattc gaagcaacgc nagaacctta ccangtcttg acatcctctg	960
acaatcctag agataggacg tccccttcgg gggcagagtg acnnngngc atggnngtcg	1020
tcagctcgtg tcgtgagatg ttgggtaagt cccgcacnag cgcaaccnt tgatcttant	1080
tgccagcatt canttggnnn nnnnnnnnn actgccnna cnanccgnnn aaggnnnggg	1140
natnacgtnn annatncnn gccnnntg acnnnnnca cncnnnnnn nnnnanngnn	1200
nnnnaannan ngggncnnnn ngnnnnnnaa annncnnncn cnnnngngnn	1250

<210> 2

<211> 1231

5 <212> ADN

<213> Secuencia de 16S RD1 de cepa F727 de Bacillus sp.

<400> 2

ES 2 774 163 T3

tcatctgtcc caccttcggc ggctggctcc ataaaggta cctcaccgac ttcgggtggt	60
acaaactctc gtggtgtgac gggcgggtg tacaaggccc gggaacgtat tcaccgcggc	120
atgctgatcc gcgattacta gcgattccag cttcacgcag tcgagttgca gactgcgatc	180
cgaactgaga acagatttgt gggattggct taacctcgcg gtttcgctgc cctttgttct	240
gtccattgta gcacgtgtgt agcccaggtc ataaggggca tgatgatttg acgtcatccc	300
caccttcctc cggtttgtca ccggcagtca ccttagagtg cccaactgaa tgctggcaac	360
taagatcaag ggttgcgctc gttgcgggac ttaacccaac atctcacgac acgagctgac	420
gacaaccatg caccacctgt cactctgccc ccgaagggga cgtcctatct ctaggattgt	480
cagaggatgt caagacctgg taaggttctt cgcggtgctt cgaattaaac cacatgctcc	540
accgcttgtg cgggcccccg tcaattcctt tgagtttcag tcttgcgacc gtactcccca	600
ggcggagtgc tttaatgcgt tagctgcagc actaaggggc ggaaaccccc taacacttag	660
cactcatcgt tttacggcgt ggactaccag ggtatctaata cctgttcgct cccccacgct	720
ttcgctccct cagcgtcagt tacagacca gagagtcgcc ttcgccccac tgggtttcct	780
ccacatcctc tacgcatttc acccggctac aacgtggaat tccactctcc tcttctgcac	840
tcaagtttcc ccagtttcca atgaccctc cccggttgag cccgggggct ttcacatcag	900
acttaaagaa acccgcctgc gagcccttta cgcccaataa ttccggacac gcttggccac	960
ctacgtatta ccgcgcttgc ttggcacggt agtagccgtg gcttttctgg ttagttaacc	1020
gtcagtgccg cctattcgga acggtacttg ttcttcctta cacagagctt tacgatcgaa	1080
actcatcacc tccacgcgcg tgctcgtcag aactttcgtc atgcgaagat cctactgctg	1140
cctccgtagg gttggcgttt ctctcagtc agtggccata cgtcagtagc taccatcgt	1200
gcctagtgag cgttacctca cccacctagg c	1231

<210> 3

<211> 1459

<212> ADN

<213> Secuencia consenso de 16S de cepa F727 de Bacillus sp.

<400> 3

5

ES 2 774 163 T3

tatacatgca agtcgagcgg acagatggga gcttgctccc tgatgtagc ggcggacggg 60
 tgagtaacac gtgggtaacc tgccgtgaag actgggataa ctccgggaaa ccgggggctaa 120
 taccggatgc ttgtttgaac cgcattggtc aaacataaaa ggtggcttcg gctaccactt 180
 acagatggac ccgcggcgca ttagctagtt ggtgaggtaa cggctcacca aggcaacgat 240
 gcgtagccga cctgagaggg tgatcggcca cactgggact gagacacggc ccagactcct 300
 acgggaggca gcagtaggga atcttccgca atggacgaaa gtctgacgga gcaacgccgc 360
 gtgagtgatg aaggttttcg gatcgtaaag ctctgttggt agggaagaac aagtgccgtt 420
 cgaatagggc ggcaccttga cggtaacctaa ccagaaagcc acggctaact acgtgccagc 480
 agccgcggta atacgtaggt ggccaagcgt tgtccggaat tattgggcgt aaagggctcg 540
 caggcgggtt tctttaagtc tgatgtgaaa gccccgggc tcaaccgggg aggggtcatt 600
 ggaaactggg gaaacttgag tgcagaagag gagagtggaa ttccacgttg tagccgggtg 660
 aatgcgtag aggatgtgga ggaacaccag tggggcgaag gcgactctct gggctctgtaa 720
 ctgacgctga gggagcgaaa gcgtggggga gcgaacagga ttagataccc tggtagtcca 780
 cgccgtaaaa cgatgagtgc taagtgttag ggggtttccg ccccttagtg ctgcagctaa 840
 cgcattaaag cactccgcct ggggagtacg gtgcgaagac tgaaactcaa aggaattgac 900
 gggggcccgc acaagcgggtg gagcatgtgg ttttaattcg agcaacgcga agaaccttac 960
 caggtcttga catcctctga caatcctaga gataggacgt ccccttcggg ggcagagtga 1020
 caggtggtgc atggttgcg tcagctcgtg tcgtgagatg ttgggttaag tcccgcaacg 1080
 agcgcgaacc ttgatcttag ttgccagcat tcagttgggc actctaaggt gactgccggt 1140
 gacaaaccgg aggaaggtgg ggatgacgtc aatcatcat gcccttatg acctgggcta 1200
 cacacgtgct acaatggaca gaacaaaggg cagcgaacc gcgaggttaa gccaatccca 1260
 caaatctggt ctcagttcgg atcgcagtct gcaactcgac tgcgtgaagc tggaatcgct 1320
 agtaatcgcg gatcagcatg ccgcggtgaa tacgttcccg ggccttgtag acaccgccg 1380
 tcacaccacg agagtttgta acaccgaag tcggtgaggt aacctttatg gagccagccg 1440
 ccgaaggtgg gacagatga 1459

5 <210> 4
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Cebador FD1, producido de forma sintética en laboratorio

<400> 4
 agagttgat cctggctcag 20

15 <210> 5
 <211> 17

ES 2 774 163 T3

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 5 <223> Cebador RD1, producido de forma sintética en laboratorio

 <400> 5
 aaggaggtga tccagcc 17

 10 <210> 6
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 15 <220>
 <223> cebador recAf, producido de forma sintética en laboratorio

 <400> 6
 20 gatcgtcarg cagscytwga t 21

 <210> 7
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 25 <220>
 <223> cebador recAr, producido de forma sintética en laboratorio

 <400> 7
 30 ttwccracca taacsccrac 20

 <210> 8
 <211> 560
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia de recA directa de cepa F727 de Bacillus sp.

 <400> 8

 aacattcggc aaggttccat catgaaactc ggggaaaaga cggatacaag aatttcaaca 60
 gttccgagcg gttcccttgc acttgatacc gctctcggaa taggcggata cccgcgcgga 120
 cggattattg aagtatacgg acctgaaagc tcaggtaaaa cgactgtagc gcttcatgcg 180
 attgctgaag ttcaggagaa aggcggacaa gccgcattta ttgatgctga gcatgccctt 240
 gaccctgttt acgcgcaaaa gctcggtgta aatattgagg agctgctgct ttctcagcct 300
 gatacgggag agcagggcgt tgagattgcc gaagcgtgg tacgaagcgg agccgtcgat 360
 atcgtagttg tcgactctgt tgcggcgctt gtcccgaaag ctgaaatcga aggagacatg 420
 ggggattccc acgtcggttt gcaggcccgt ttgatgtctc aagcgtccg taagctttcc 480
 40 ggtgccatca ataaatctaa aacaatcgca atctttatta accaaattcg tgaaaaagtc 540
 ggcgttaggg tcggaaaaaa 560

 <210> 9
 <211> 567
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia de recA inversa de cepa F727 de Bacillus sp.

 <400> 9

ES 2 774 163 T3

gtataagatt gcgattgttt tagatattatt gatggcaccg gaaagcttac ggagcgcttg 60
 agacatcaaa cgggcctgca aaccgacgtg ggaatcccc atgtctcctt cgatttcagc 120
 tttcgggaca agcgccgcaa cagagtcgac aactacgata tcgacggctc cgcttcgtac 180
 cagcgcttcg gcaatctcaa ggcctgctc tcccgtatca ggctgagaaa gcagcagctc 240
 ctcaatattt acaccgagct tttgcgcgta aacagggctc agggcatgct cagcatcaat 300
 aatgctggct tgtccgcctt tctcctgaac ttcagcaatc gcatgaagcg ctacagtcgt 360
 tttacctgag ctttcaggct cgtatacttc aataatccgt ccgcgcggggt atccgcctat 420
 tccgagagcg gtatcaagtg caagggaaacc gctcggaact gttgaaattc ttgtatccgt 480
 cttttccccg agtttcatga tggaaccttt gccgaattgt ttttctattt gcttaagagc 540
 catatcwaag rctgwawtra mratcaa 567

5

<210> 10
 <211> 505
 <212> ADN
 <213> Secuencia Consenso de recA de cepa F727 de Bacillus sp.

<400> 10

aaggttccat catgaaactc ggggaaaaga cggatacaag aatttcaaca gttccgagcg 60
 gttcccttgc acttgatacc gctctcggaa taggcggata cccgcgcgga cggattattg 120
 aagtatacgg acctgaaagc tcaggtaaaa cgactgtagc gttcatgcg attgctgaa 180
 ttcaggagaa aggcggacaa gccgcattta ttgatgctga gcatgccctt gacctgttt 240
 acgcgcaaaa gctcgggtga aatattgagg agctgctgct ttctcagcct gatacgggag 300
 agcagggcgt tgagattgcc gaagcgctgg tacgaagcgg agccgtcgat atcgtagttg 360
 tcgactctgt tgcggcgctt gtcccgaag ctgaaatcga aggagacatg ggggattccc 420
 acgtcggttt gcaggcccgt ttgatgtctc aagcgctccg taagctttcc ggtgccatca 480
 10 ataaatctaa aacaatcgca atctt 505

15

<210> 11
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador phoR-f, producido de forma sintética en laboratorio

20

<400> 11
 ttyarytcat grgavacatt 20

25

<210> 12
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador phoR-r, producido de forma sintética en laboratorio

ES 2 774 163 T3

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(3)
 5 <223> n es a, c, g o t

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

<400> 12
 ggntayaaan argaggagcc 20

15 <210> 13
 <211> 998
 <212> ADN
 <213> Secuencia de phoR inversa de cepa F727 de Bacillus sp.

20 <400> 13

tcgttgtctg tatcatattg gttttcagtg ttctcggcct tttcttgcaag cagctcattt 60
 cttcatccgc caaggaaaga acggagggac agcttgaaaa ggaagccgca tacatagccc 120
 gactccttga cgccggccaa gtaaacaata aaagaaacga aacgggcatt aaagatgcc 180
 gccgtacatt agatatcgac gtgtccgtat taaatgaaaa aggccgcggt ttatatcact 240
 caggcagacg cgctgatgac tcggctataa aggaattcgt ctcccgtaat aaaaatgcgg 300
 cggcgattca gaacggagag aaagtatggc atggaacggc ccttaaaaaac gccgccggcc 360
 aaacggcggg atatgtgctc gtttcctcgc ggatcgataa aggttcgaat ataacagggg 420
 aatgtgggg catgctggct gcaagccttt gtactgcttt tattattatc gttttcttct 480
 atacgaatat gacctccgt taaaaagggt caatcgactc cgcgacaaaa gtggccactg 540
 agctgtctaa ggggaactat gacgcccgt cctacggcgg gtacgcaaga cgctcagacc 600
 gtctcgggcg cgctatgaac agcctcgtg tggatttgat ggaaatgacg agaacgcagg 660
 atatgcagcg cgaccgcctg ctgaccgtca tcgaaaatat cggatcaggt ttgattttaa 720
 tagacgggag aggctttatt aatctcgtga acaggtcgta tacgaagcag ttccatacaa 780
 atcctgaacg tctgcttcgg cgtctctacc atgacgcatt tgagcatgag gaaatcattc 840
 ggctggtcga agacatcttt atgacagaaa cgaagaaacg ccagctgctc acgcttccca 900
 tcaaaatcga acggcgctat tttgaggttg acggcgtccc gattatgggc cctgacgatg 960
 aatggaaaag gcattgttct cgtgtttcat gatatgac 998

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende:
 - 5 (a) un sobrenadante, filtrados, extractos o caldo de células completas recogido del cultivo de la cepa F727 de *Bacillus* (N.º de registro NRRL B-50768), en donde el sobrenadante, los filtrados, los extractos o el caldo de células completas tiene actividad plaguicida o de promoción de crecimiento; y
 - (b) al menos uno de un transportador, diluyente, tensioactivo o adyuvante.
- 10 2. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además un plaguicida químico o biológico o agente promotor del crecimiento.
3. Un método para modular la infestación de plagas en una planta que comprende:
 - 15 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.
4. El método de la reivindicación 3, en donde el plaguicida es un hongo o una bacteria.
5. El método de la reivindicación 4, en donde el hongo se selecciona del grupo que consiste en *Aspergillus*, *Alternaria*,
20 *Bremia*, *Sphaerotheca*, *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Verticillium*, *Botrytis*, *Sclerotinia*, *Sclerotium*, *Rhizoctonia* y *Bipolaris*.
6. El método de la reivindicación 5, en donde la composición inhibe la germinación de esporas.
7. El método de la reivindicación 4, en donde la bacteria se selecciona del grupo que consiste en *Bacillus*, *Erwinia*,
25 *Acidovorax* y *Clavibacter*.
8. El método de la reivindicación 3, en donde el plaguicida es *Phytophthora*.
9. El método de la reivindicación 3 aplicando una composición de la reivindicación 2, en donde la plaga es un hongo
30 y el plaguicida se selecciona del grupo que consiste en extracto de *Reynoutria sachalinensis* (centáurea negra) y cepa D747 de *Bacillus amyloliquefaciens*.
10. Un método para modular el crecimiento de una planta o la germinación de una semilla que comprende poner en
35 contacto dicha planta, su sustrato de cultivo o una semilla de dicha planta con una cantidad de la composición de las reivindicaciones 1-2, eficaz para modular el crecimiento de dicha planta o germinación de dicha semilla.
11. El método de la reivindicación 10, en donde la formulación es una formulación de *talco*.

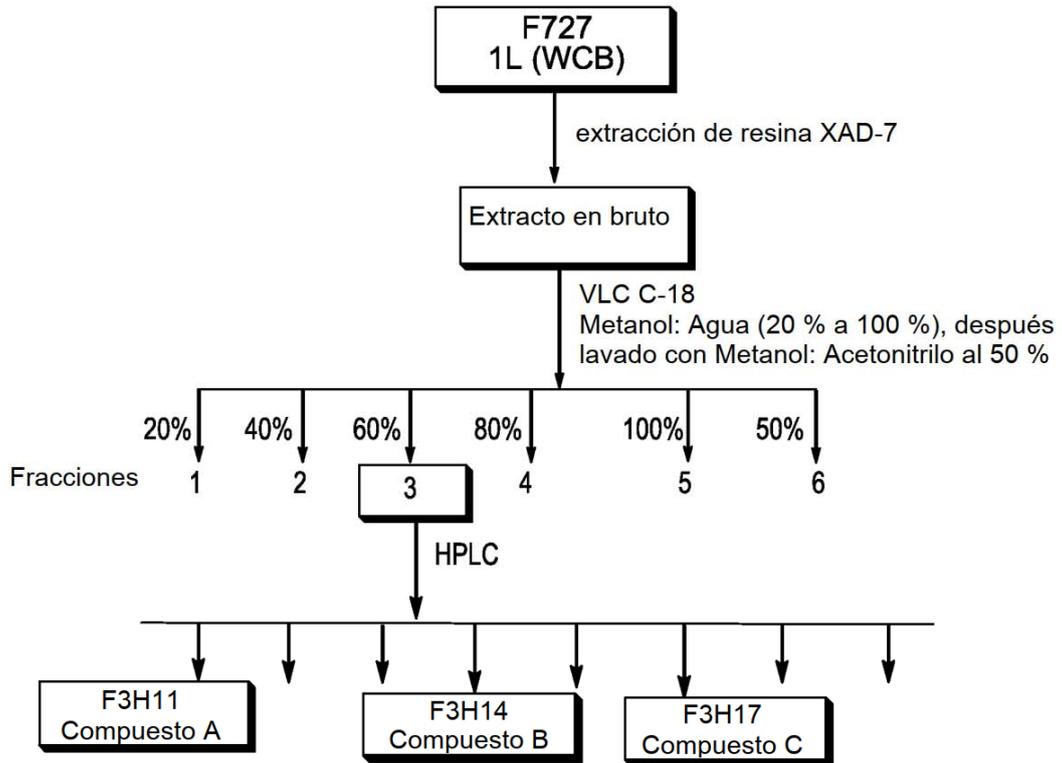


FIG. 1

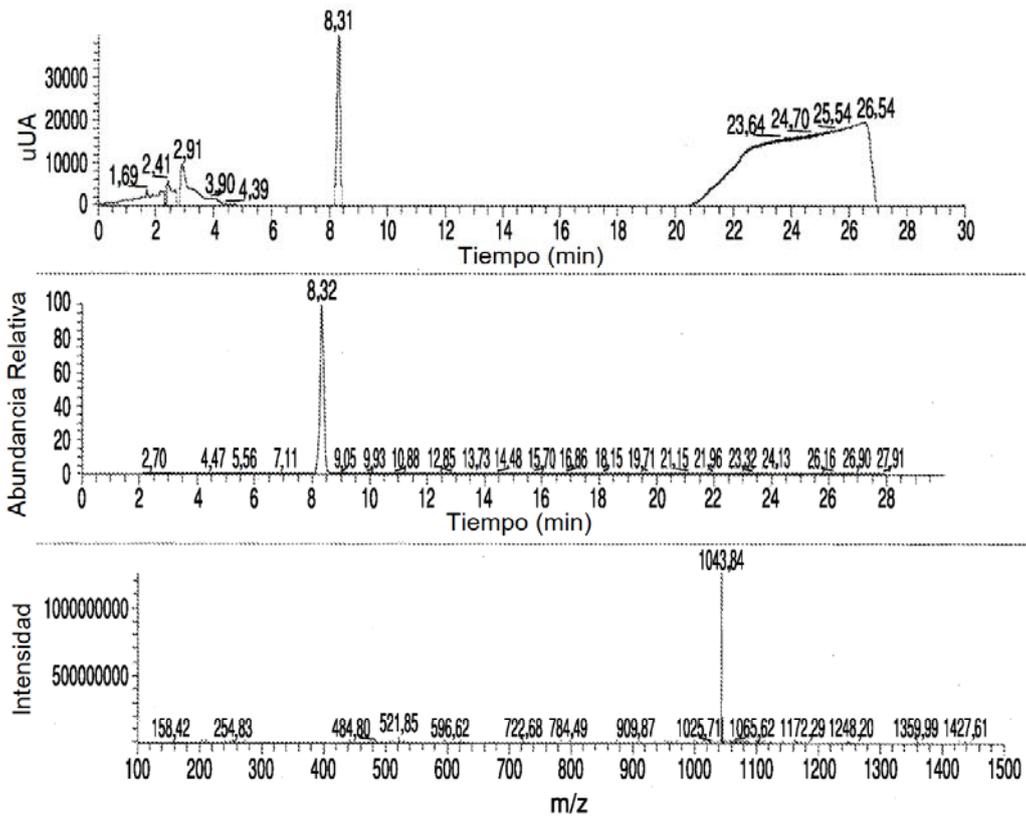


FIG. 2

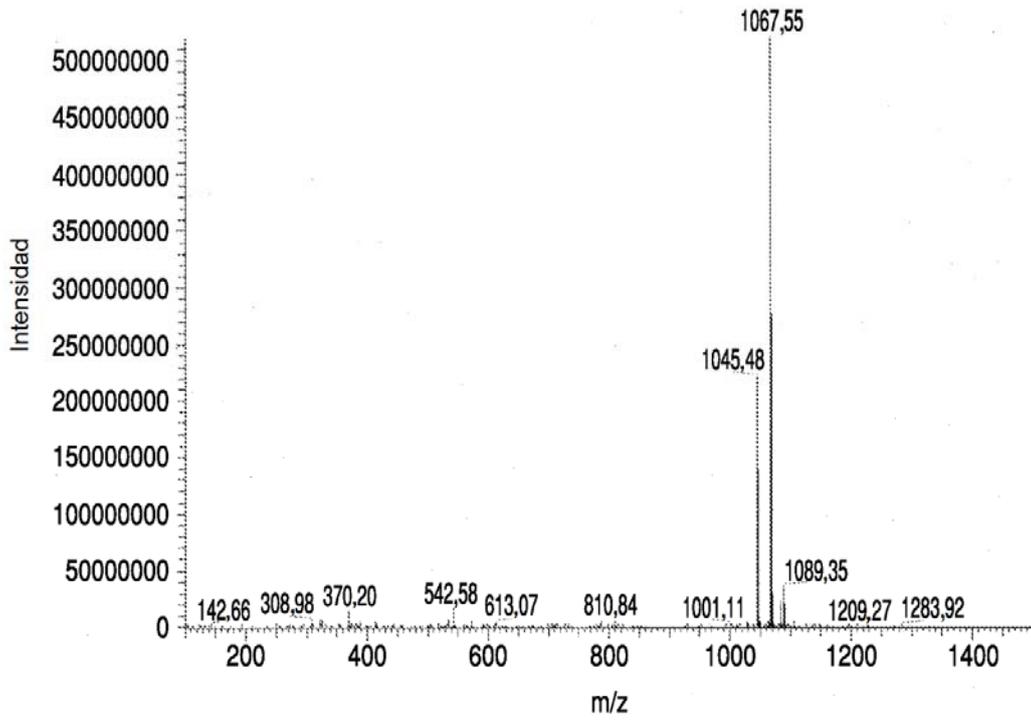


FIG. 3

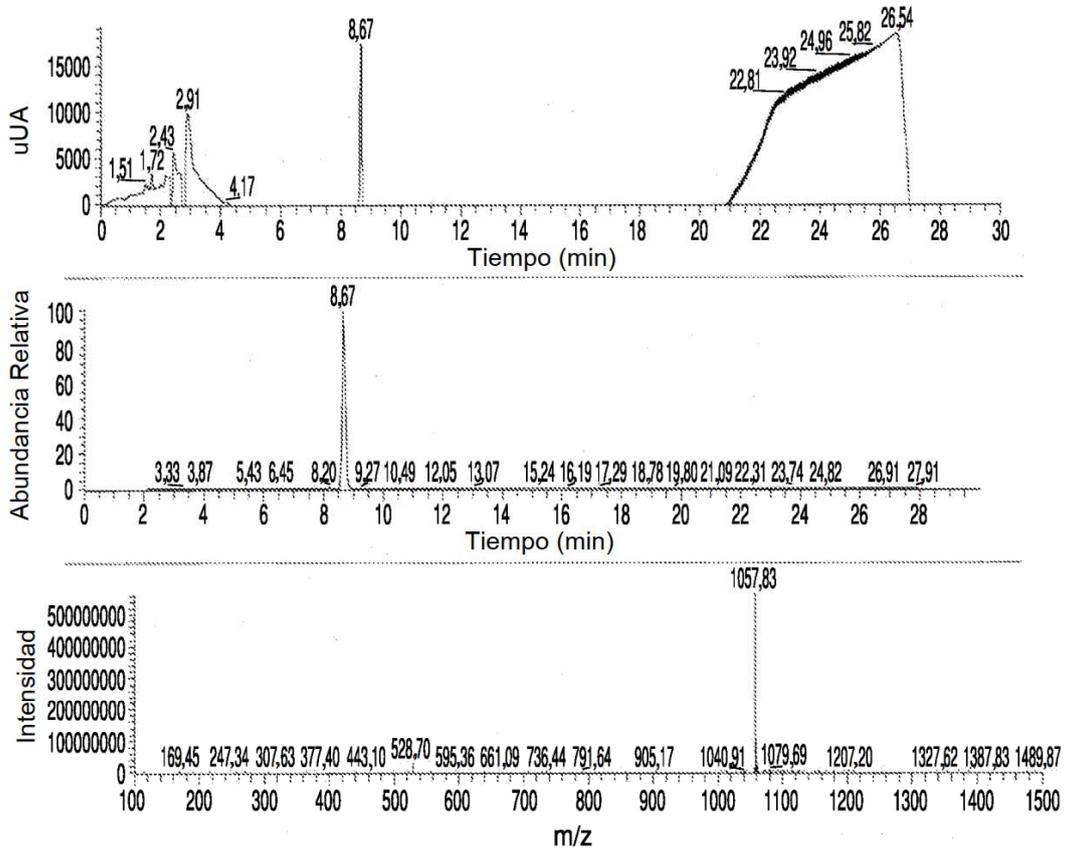


FIG. 4

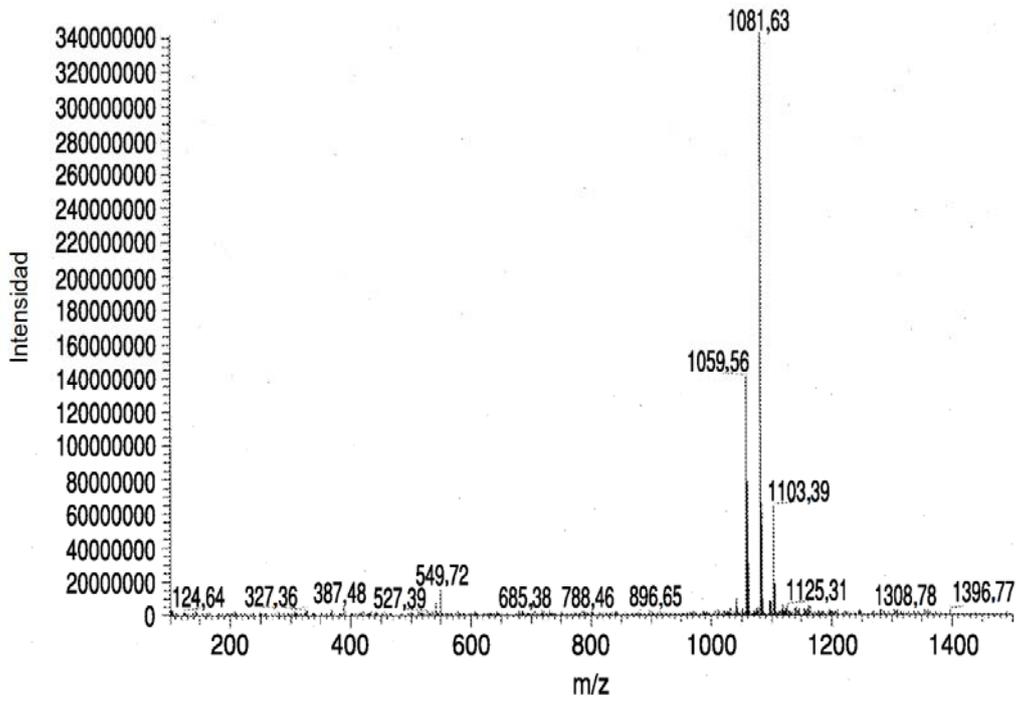


FIG. 5

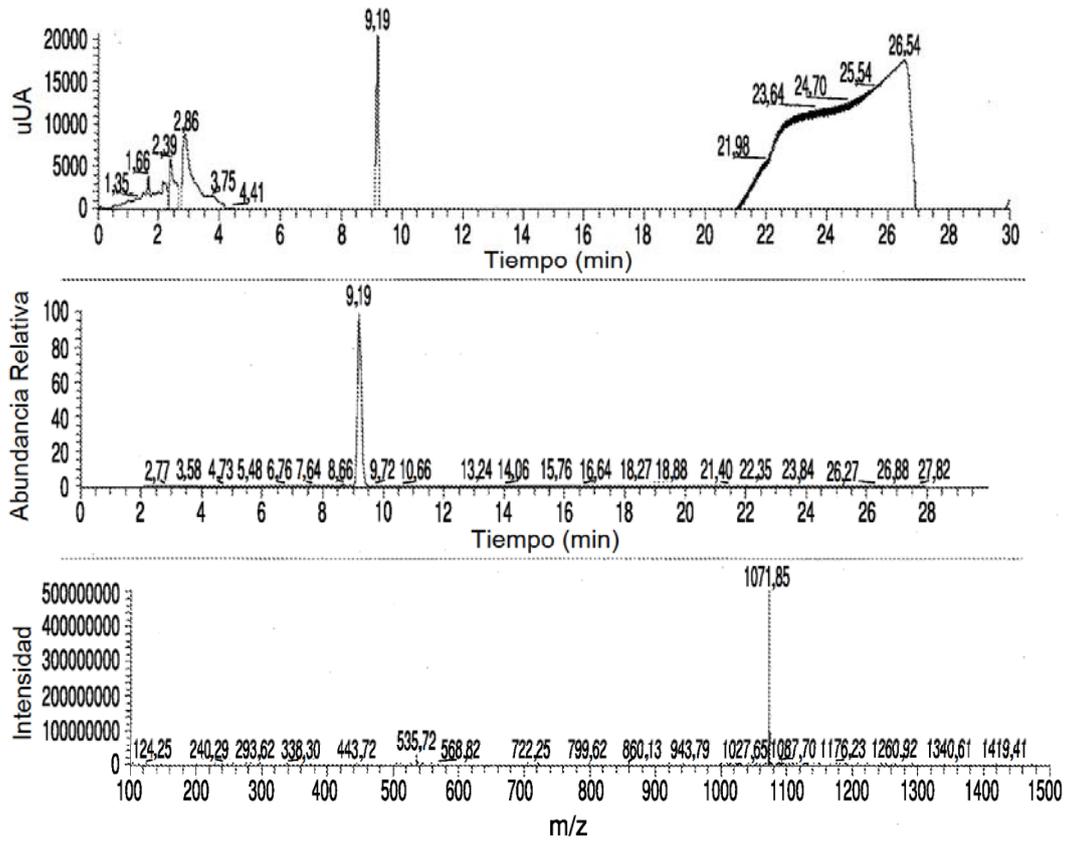


FIG. 6

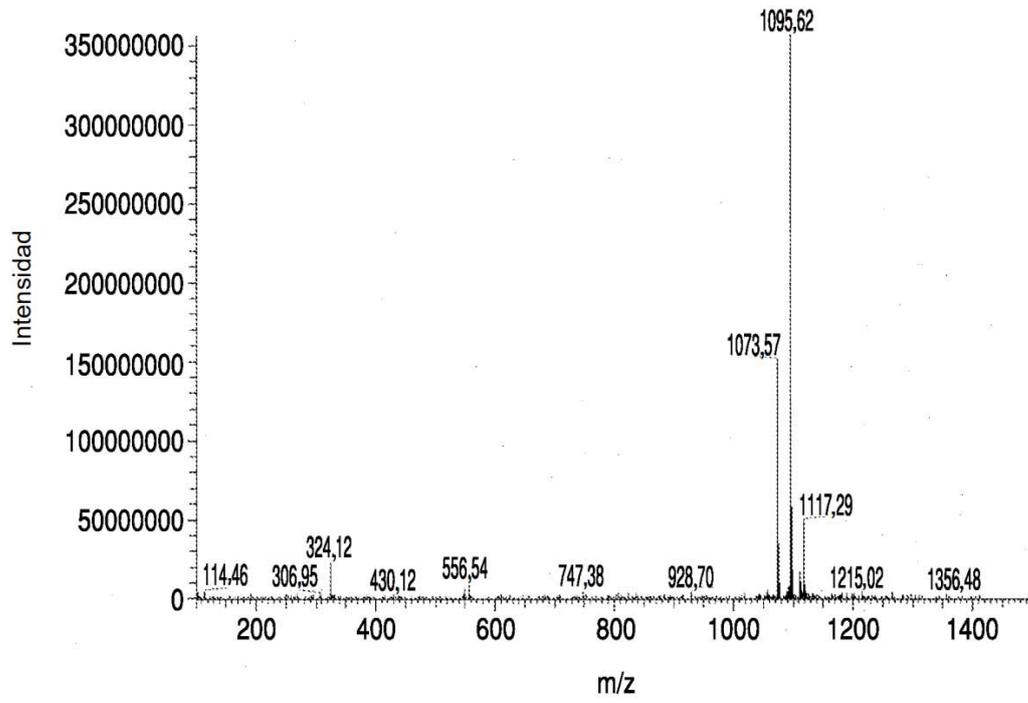


FIG. 7

Resultados del bioensayo fungicida

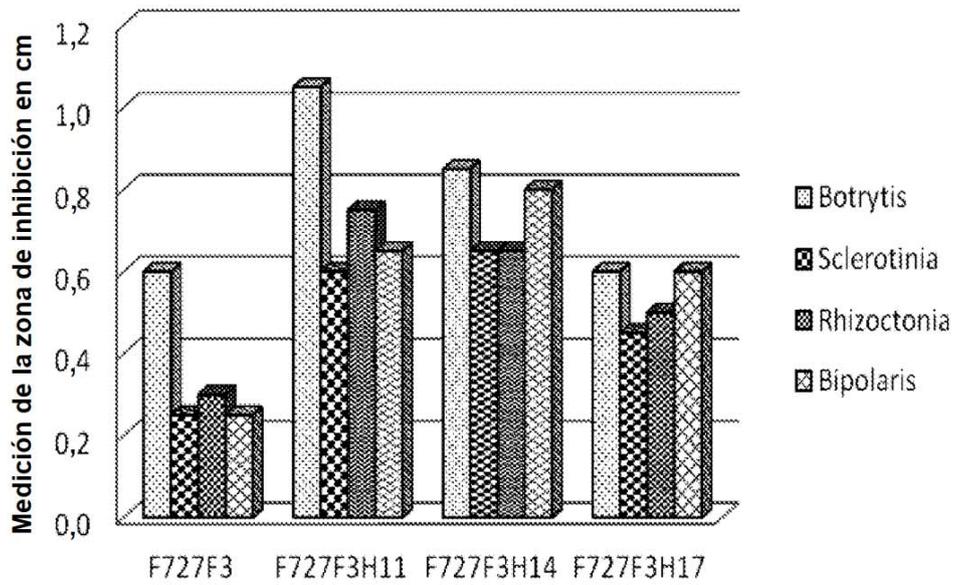


FIG. 8

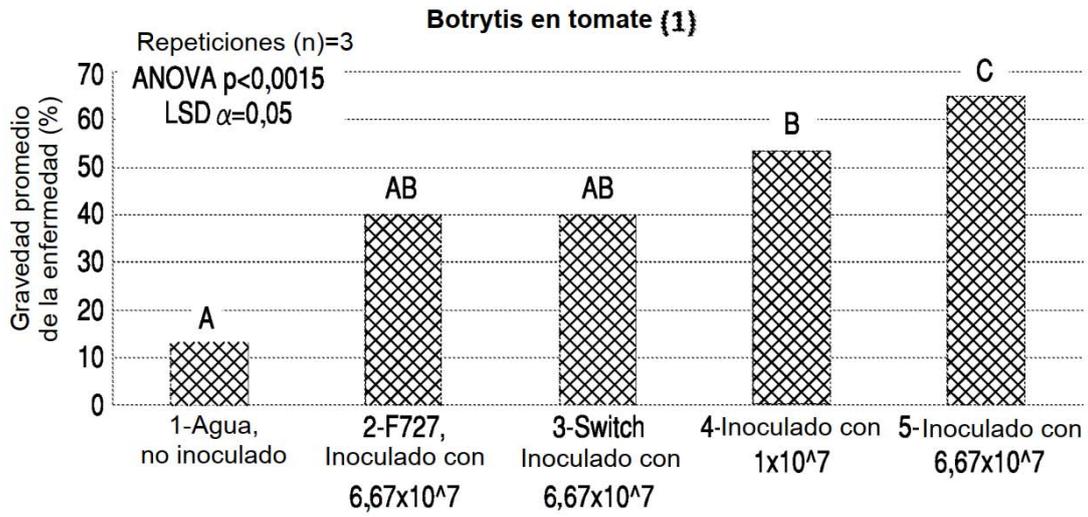


FIG. 9

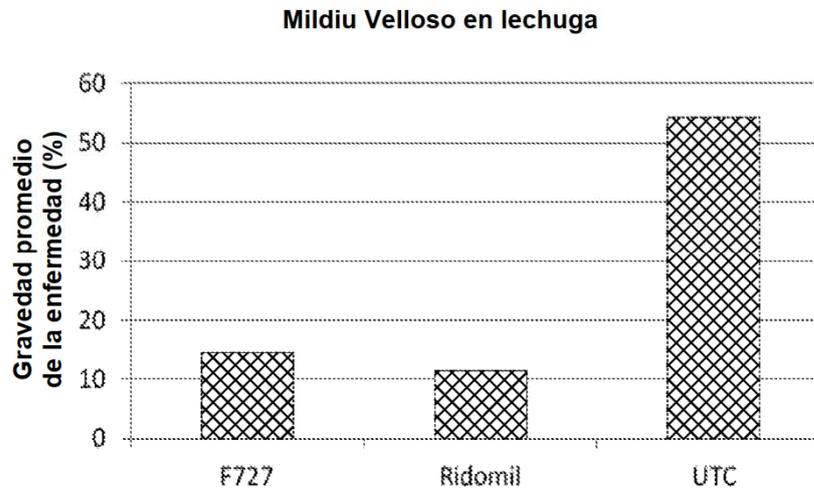


FIG. 10

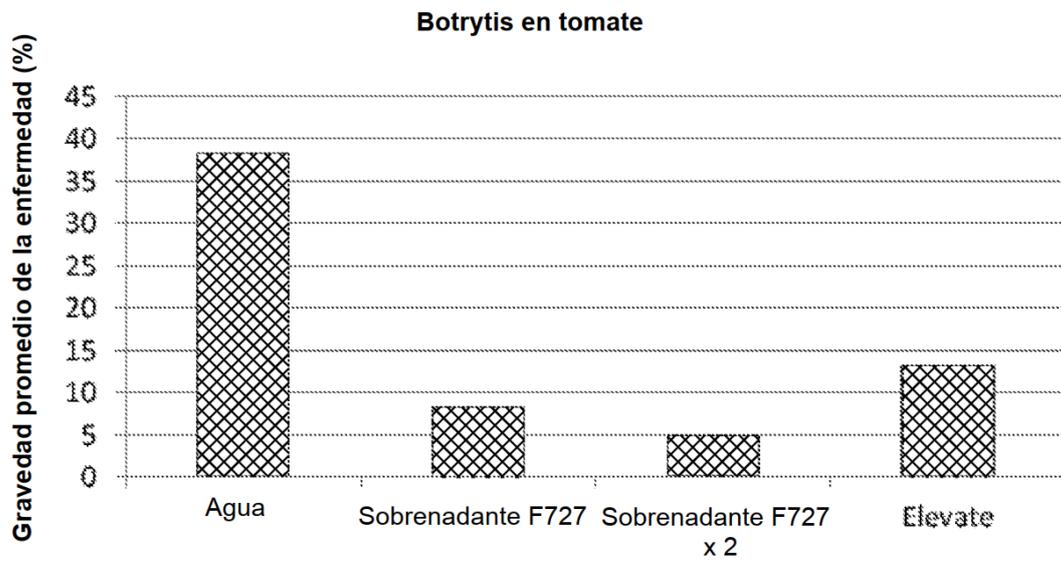


FIG. 11

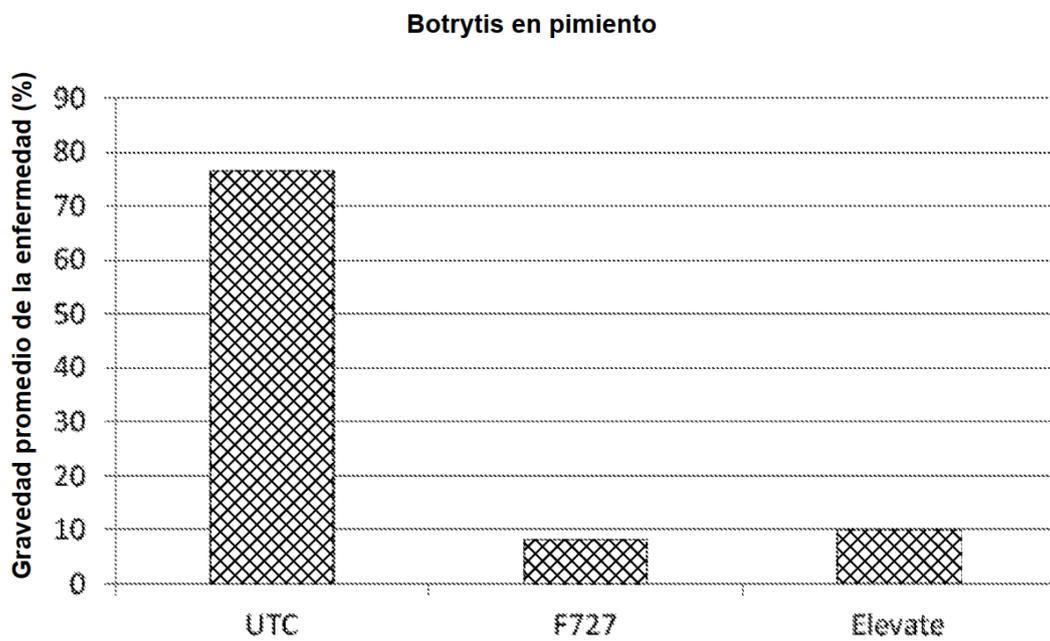


FIG. 12

% de control de Mildiu polvoriento en pepino

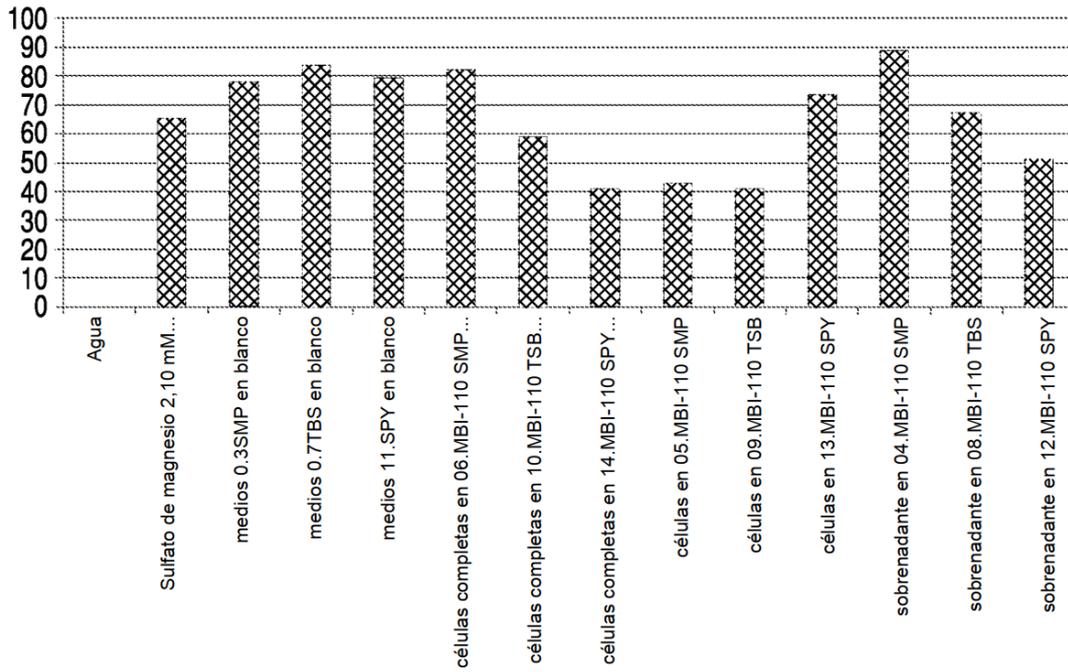


FIG. 13

Botrytis cinerea en tomate

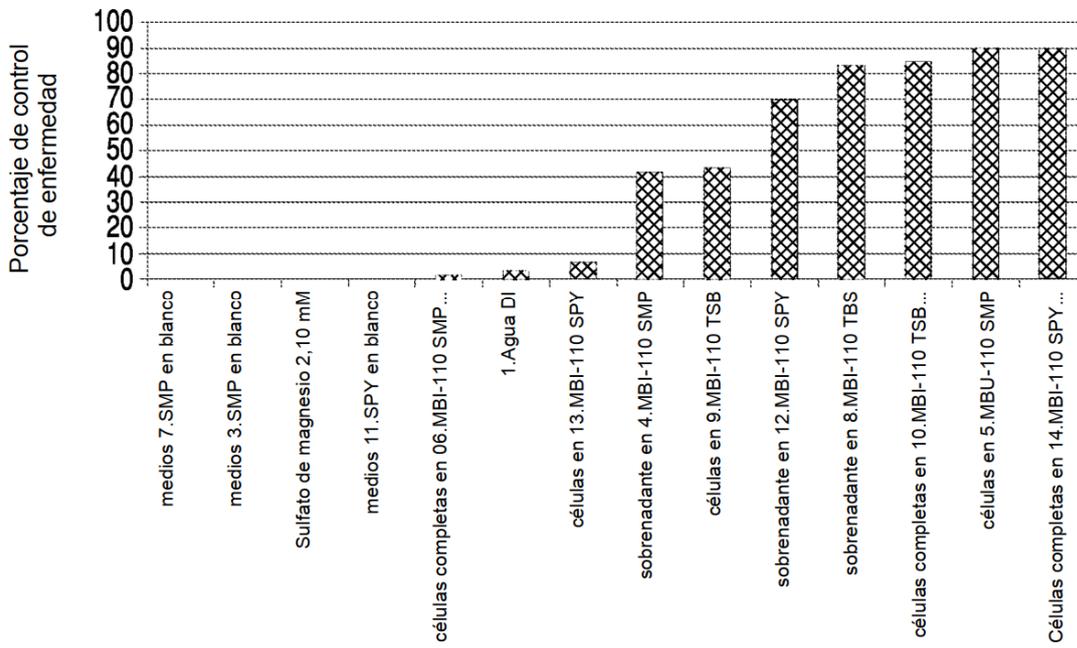


FIG. 14

Mildiu polvoriento en pepino

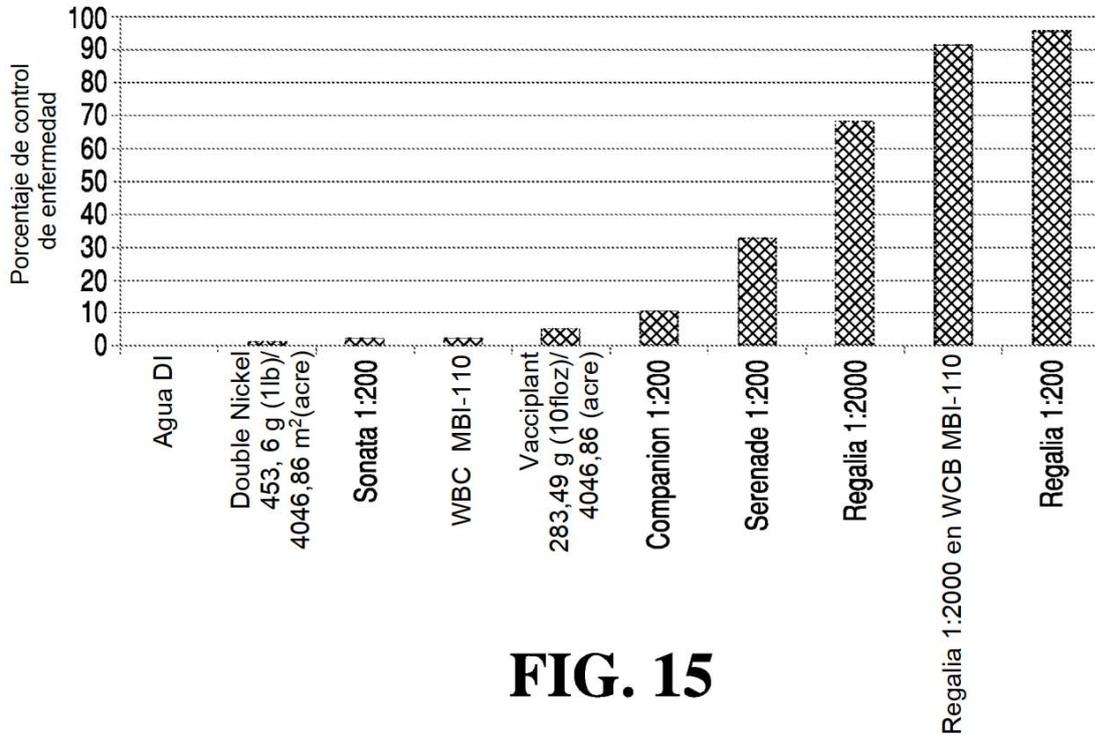


FIG. 15

***Phytophthora infestans* en tomate**

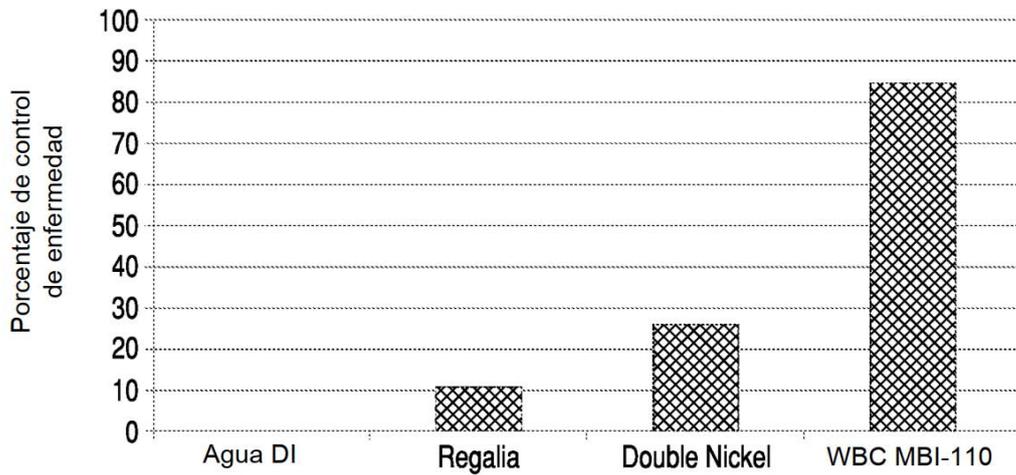


FIG. 16

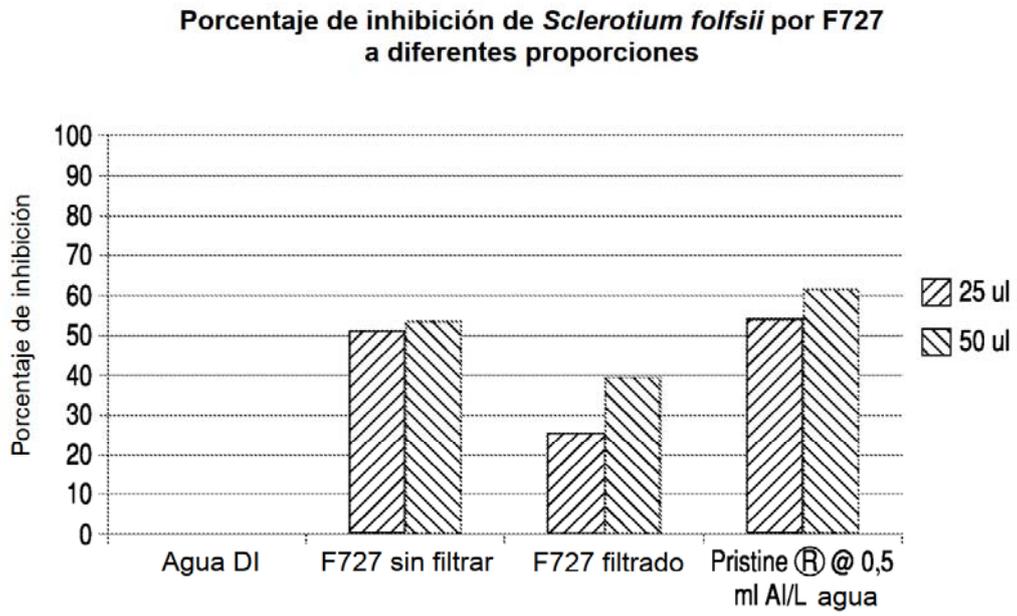


FIG. 17

**Inundación con MBI-110
frente a Lechuga con Mildiu Velloso**

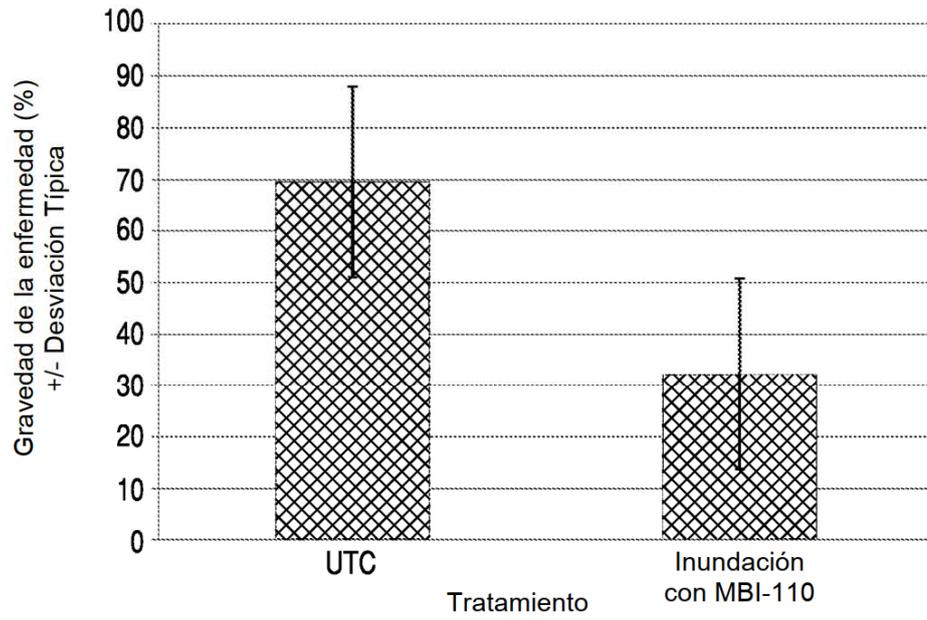


FIG. 18

Análisis MS/MS de F4H11 (PM 1044)

Ac012_1067 #828-849 TR:7,09-7,28 AV:22 NL:1,16E6
 T:FTMS + p NSI ms2 Completa 1045,00@hcd25,00 [100,00-1200,00]

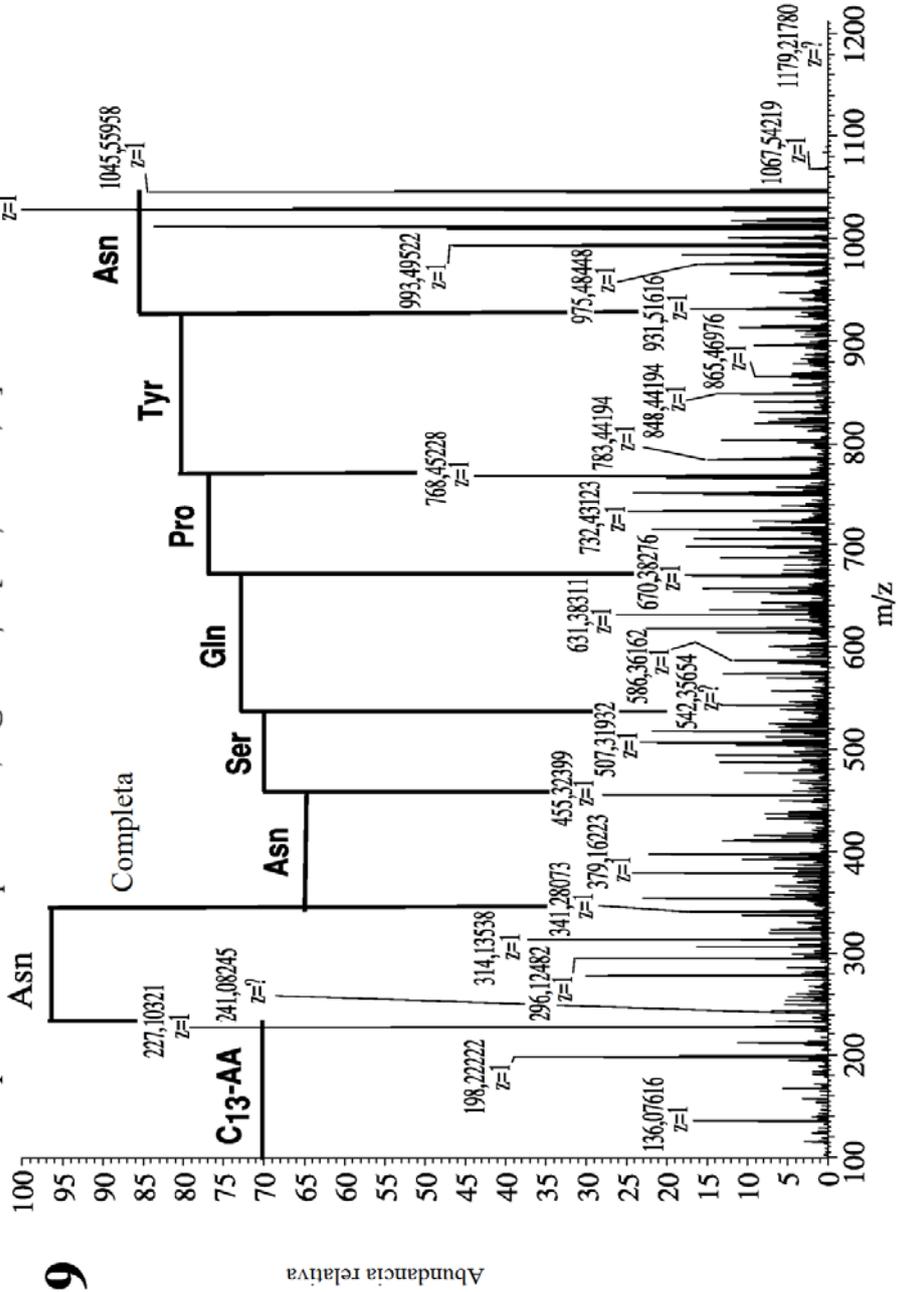


FIG. 19

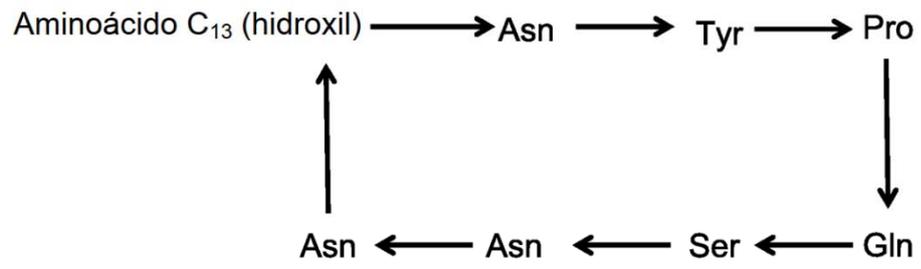


FIG. 20