

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 804 732**

51 Int. Cl.:

<b>C12N 1/20</b>	(2006.01)
<b>C12N 9/90</b>	(2006.01)
<b>A01N 63/00</b>	(2010.01)
<b>C07K 7/06</b>	(2006.01)
<b>C07K 7/50</b>	(2006.01)
<b>C12R 1/01</b>	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.03.2016 PCT/US2016/023760**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.09.2016 WO16154297**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.03.2016 E 16713716 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.04.2020 EP 3274443**

54 Título: **Una nueva cepa de Paenibacillus, compuestos antifúngicos y procedimientos para su uso**

30 Prioridad:

**26.03.2015 US 201562138765 P**  
**24.09.2015 US 201562232205 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**09.02.2021**

73 Titular/es:

**BAYER CROPSCIENCE LP (100.0%)**  
**800 North Lindbergh Boulevard**  
**St. Louis MO 63167, US**

72 Inventor/es:

**BEAU, JEREMY;**  
**JOO, DANIEL, M.;**  
**SCHWIENSTEK, PATRICK;**  
**TAYLOR, COLLEEN, S. y**  
**TRAAG, BJORN, A.**

74 Agente/Representante:

**GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo**

**ES 2 804 732 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

Una nueva cepa de *Paenibacillus*, compuestos antifúngicos y procedimientos para su uso

**Referencia al listado de secuencias presentado de forma electrónica**

5 La copia oficial del listado de secuencias se presenta de forma electrónica mediante EFS-Web como un listado de secuencias en formato ASCII, con un archivo con el nombre "BCS159002WO\_ST25.txt", creado el 21 de marzo de 2016, y cuyo tamaño es de 68 kilobytes y se presenta en forma simultánea con la memoria descriptiva. El listado de secuencias contenido en este documento con formato ASCII forma parte de la memoria descriptiva y se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad.

**Campo técnico**

10 La presente invención se refiere al campo de cepas bacterianas y su capacidad para controlar enfermedades de plantas. En particular, la presente invención se refiere a una cepa de *Paenibacillus* sp. con un nivel relativamente alto de actividad antifúngica de amplio espectro.

**Antecedentes**

15 Los fungicidas tienen múltiples usos, incluso en la protección de cultivos; como conservantes de alimentos, piensos y cosméticos; y como agentes terapéuticos en aplicaciones tanto en seres humanos como en veterinaria. La reducción del rendimiento de los cultivos, las enfermedades de origen alimentario y las infecciones fúngicas en seres humanos y en animales son un problema tanto en países desarrollados como países en desarrollo.

20 A menudo, los insecticidas o fungicidas sintéticos no son específicos y por lo tanto pueden actuar sobre organismos distintos de los organismos diana, incluyendo otros organismos beneficiosos de origen natural. Debido a su naturaleza química, también pueden ser tóxicos y no biodegradables. Los consumidores en todo el mundo se han vuelto cada vez más conscientes de los potenciales problemas ambientales y sanitarios asociados con los restos de las sustancias químicas, en particular en los productos alimenticios. Esto ha dado como resultado una creciente presión por parte de los consumidores para reducir el uso o al menos la cantidad de plaguicidas químicos (es decir, sintéticos). Por lo tanto, persiste la necesidad de manejar los requerimientos de la cadena de producción de alimentos permitiendo al mismo tiempo un control de plagas eficaz.

25 Un problema adicional que surge con el uso de insecticidas o fungicidas sintéticos es que la aplicación repetida y exclusiva de un insecticida o de fungicidas a menudo conduce a la selección de microorganismos patógenos resistentes. Normalmente, dichas cepas también presentan una resistencia cruzada contra otros principios activos que tienen el mismo modo de acción. Entonces, ya no será posible un control eficaz de los patógenos con dichos compuestos activos. Sin embargo, el desarrollo de principios activos con mecanismos de acción nuevos es difícil y costoso.

30 El riesgo de desarrollar resistencia en las poblaciones de patógenos, así como la preocupación respecto al medio ambiente y la salud humana han fomentado el interés en la identificación de alternativas a los insecticidas y fungicidas sintéticos para el manejo de enfermedades en plantas. El uso de agentes de control biológico es una alternativa.

35 Los péptidos no ribosómicos, tales como las fusaricidinas, son bien reconocidos por sus propiedades antimicrobianas y se han utilizado en el campo de la protección de cultivos. Debido a su modo de acción, también tienen usos potenciales en aplicaciones biofarmacéuticas y otras aplicaciones de biotecnología. Las fusaricidinas se pueden aislar a partir de *Paenibacillus* sp. y tienen una estructura en anillo compuesta por 6 restos de aminoácidos además de ácido 15-guanidin-3-hidroxipentadecanoico. Las fusaricidinas aisladas de *Paenibacillus polymyxa* incluyen LI-F03, LI-F04, LI-F05, LI-F07 y LI-F08 (Kurusu K, Ohba K, Arai T y Fukushima K., *J. Antibiotics*, 40: 1506-1514, 1987) y se han descrito fusaricidinas adicionales A, B, C y D (Kajimura Y Kaneda M., *J. Antibiotics*, 49: 129-135, 1996; Kajimura Y y Kaneda M., *J. Antibiotics*, 50: 220-228, 1997).

45 Se sabe que determinadas fusaricidinas tienen actividad germicida contra hongos patógenos de plantas tales como *Fusarium oxisporum*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae* y *Penicillium thomii*. Algunas fusaricidinas también tienen actividad germicida contra bacterias grampositivas, incluyendo *Staphylococcus aureus* (Kajimura Y y Kaneda M., *J. Antibiotics*, 49: 129-135, 1996; Kajimura Y y Kaneda M., *J. Antibiotics*, 50: 220-228, 1997). Además, se ha encontrado que algunas fusaricidinas específicas tienen actividad antifúngica contra *Leptosphaeria maculans*, que provoca la podredumbre negra de la raíz en canola (Beatty PH y Jensen SE., *Can. J. Microbiol.*, 48: 159-169, 2002). Hay una necesidad de caracterizar adicionalmente los compuestos de fusaricidina y de identificar cepas de *Paenibacillus* sp. que produzcan las fusaricidinas que proporcionen un amplio espectro de actividad antifúngica a índices de aplicación relativamente bajos.

50 El documento WO2007/086645 desvela la cepa E681 de *Paenibacillus polymyxa*, Jae Woo Han y col. (Biotechnology Letters 34 (7): 1327-1334), la cepa DBB1709 de *Paenibacillus polymyxa*, ambas con fusaricidina sintetas modificadas. Sea Hyeon Lee y col. (Phytoparasitica 41 (1): 49-58) desvelan una fusaricidina expresada por E681.

Las fusaricidinas y otros metabolitos antifúngicos se pueden obtener por fermentación de *Paenibacillus* sp. Sin embargo, muchas cepas de *Paenibacillus* sp. también producen antibióticos conocidos como polimixinas. Las polimixinas son selectivamente tóxicas para bacterias gramnegativas y pueden tener un efecto neurotóxico o nefrotóxico cuando son las administra a pacientes humanos. El problema global del avance de la resistencia antimicrobiana y la toxicidad relativa de las polimixinas requieren de un uso y administración cuidadosos de estos antibióticos. Por este motivo, resulta muy conveniente que una cepa de *Paenibacillus* sp. desarrollada para su uso en la agricultura exprese niveles relativamente altos de las fusaricidinas y polimixinas no detectables. Una cepa tal representaría poco o ningún riesgo para los trabajadores y consumidores. Además, persiste la necesidad de identificar cepas de *Paenibacillus* sp. que presenten un amplio espectro de actividad. Resulta muy conveniente lograr mejoras en la eficacia de los fungicidas existentes, en especial de los que no son susceptibles al desarrollo de resistencia fúngica.

### **Sumario**

La presente invención se refiere a una composición que comprende un cultivo biológicamente puro de una cepa fungicida de *Paenibacillus* sp. que comprende una variante de la fusaricidina sintasa que carece de un dominio de adenilación funcional en el tercer módulo (FusA-A3), en la que la falta de un FusA-A3 funcional inhibe la síntesis de fusaricidinas con una tirosina y una fenilalanina en el resto de aminoácido 3 en comparación con la síntesis de fusaricidinas por una cepa de *Paenibacillus* sp. que comprende una fusaricidina sintasa de tipo silvestre como se caracteriza en las reivindicaciones.

En una realización, la variante de la fusaricidina sintasa comprende la SEQ ID NO: 10.

La presente invención también proporciona una composición que comprende un cultivo biológicamente puro de una cepa fungicida de *Paenibacillus* sp. como se caracteriza en las reivindicaciones, que comprende al menos una Paeniserina y al menos una Paeniprolixina.

En determinados aspectos, la al menos una Paeniserina se selecciona del grupo que consiste en Paeniserina A1, Paeniserina A2, Paeniserina A3, Paeniserina A4, Paeniserina B1, Paeniserina B2, Paeniserina B3, Paeniserina B4, Paeniserina C1, Paeniserina C2 y Paeniserina C3.

En otros aspectos, la al menos una Paeniprolixina se selecciona del grupo que consiste en Paeniprolixina A1, Paeniprolixina A2, Paeniprolixina B1, Paeniprolixina B2, Paeniprolixina C1, Paeniprolixina D1, Paeniprolixina E1, Paeniprolixina E2, Paeniprolixina F1, Paeniprolixina F2, Paeniprolixina G1 y Paeniprolixina G2.

En determinadas realizaciones, la composición comprende fusaricidina A, LiF08a, Paeniserina A1, Paeniserina B1, Paeniprolixina A2 y Paeniprolixina B2.

En algunas realizaciones, la composición no comprende LiF03a, LiF03b, LiF03c, LiF03d, LiF07a, LiF07b, LiF07c y/o LiF07d. En otras realizaciones, la composición comprende Paeniserina A1, Paeniserina B1, Paeniprolixina A2, y Paeniprolixina B2 en una cantidad sinérgicamente eficaz.

En determinados aspectos, la presente invención se refiere a una composición en la que la cepa de *Paenibacillus* sp. es la cepa NRRL B-50972 de *Paenibacillus* sp. o la cepa NRRL B-67129 de *Paenibacillus* sp. La composición puede comprender un producto de fermentación de la cepa NRRL B-50972 de *Paenibacillus* sp. o la cepa NRRL B-67129 de *Paenibacillus* sp.

En algunas realizaciones, el producto de fermentación no comprende una polimixina.

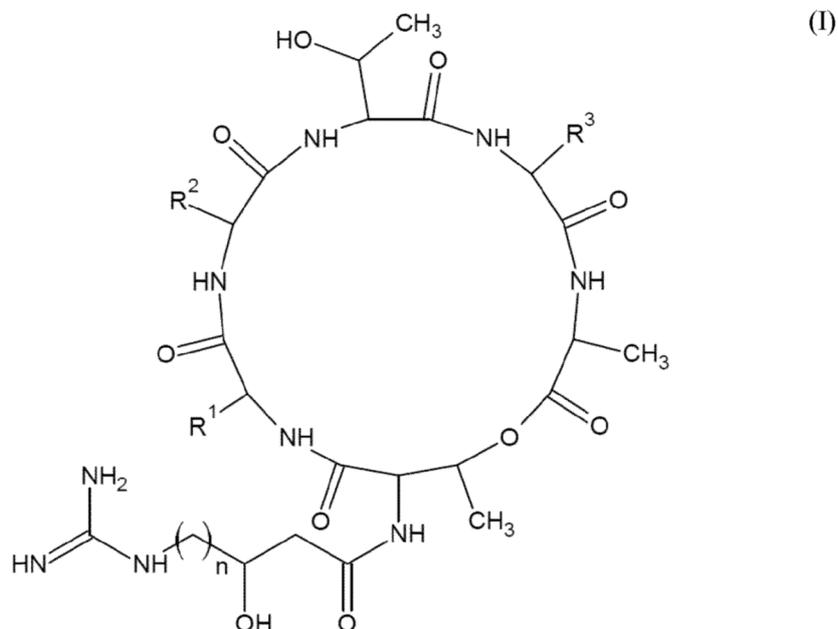
En algunos aspectos, el producto de fermentación es una formulación líquida. La formulación líquida puede ser una suspensión concentrada o una dispersión oleosa. En una realización, la composición comprende al menos aproximadamente  $1 \times 10^4$  UFC de la cepa/ml de la formulación líquida. En otra realización, la composición comprende entre aproximadamente un 1 % y aproximadamente un 25 % de sólidos de fermentación.

Además, en el presente documento se describe una composición que comprende: a) al menos una fusaricidina; y b) al menos una Paeniserina o al menos una Paeniprolixina en una cantidad sinérgicamente eficaz. La Paeniserina puede ser al menos una de Paeniserina A1, Paeniserina A2, Paeniserina A3, Paeniserina A4, Paeniserina B1, Paeniserina B2, Paeniserina B3, Paeniserina B4, Paeniserina C1, Paeniserina C2 y Paeniserina C3. La Paeniprolixina puede ser al menos una de Paeniprolixina A1, Paeniprolixina A2, Paeniprolixina B1, Paeniprolixina B2, Paeniprolixina C1, Paeniprolixina D1, Paeniprolixina E1, Paeniprolixina E2, Paeniprolixina F1, Paeniprolixina F2, Paeniprolixina G1 y Paeniprolixina G2.

En particular, en una realización la relación sinérgica de la al menos una fusaricidina y la al menos una Paeniserina o al menos una Paeniprolixina se encuentra en el intervalo de entre 1:1000 y 1000:1, preferentemente en el intervalo de entre 1:500 y 500:1, más preferentemente en el intervalo de entre 1:250 y 250:1. En otra realización, la relación en peso sinérgica de la al menos una fusaricidina y la al menos una Paeniserina o al menos una Paeniprolixina se encuentra en el intervalo de entre 1:100 y 100:1, preferentemente en el intervalo de entre 1:100 y 10:1 o incluso en el intervalo de entre 1:50 y 25:1. En un aspecto, la fusaricidina es fusaricidina A. En otro aspecto, la Paeniserina es

Paeniserina A1. En aún otro aspecto, la Paeniprolixina es Paeniprolixina C1.

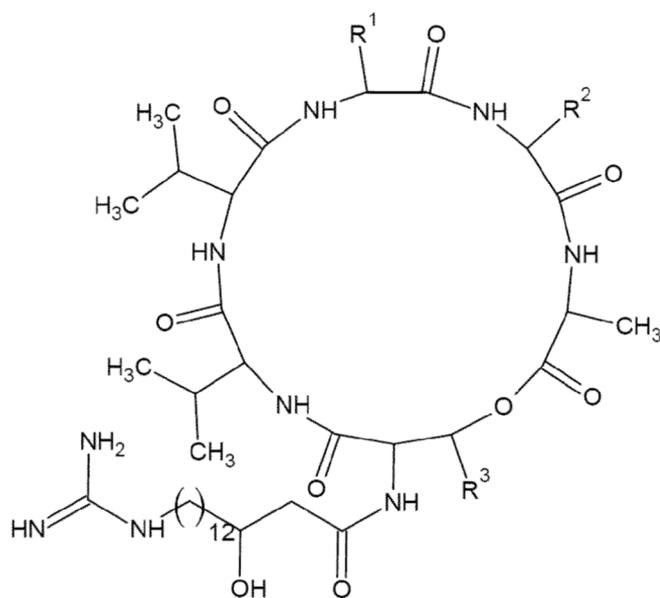
Además, en el presente documento se describe un compuesto aislado que tiene la estructura (I):



en la que

- 5 R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> son, cada uno de manera independiente, -CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> o -CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>; R<sup>3</sup> es -CH<sub>2</sub>C(O)NH<sub>2</sub> o -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>C(O)NH<sub>2</sub>; y n es un número entero entre 13 y 20; incluyendo sales, hidratos, solvatos, polimorfos, isómeros ópticos, isómeros geométricos, enantiómeros, diastereómeros, análogos acíclicos y mezclas de los mismos.
- 10 R<sup>3</sup> puede ser -CH<sub>2</sub>C(O)NH<sub>2</sub>. R<sup>3</sup> también puede ser -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>C(O)NH<sub>2</sub>. R<sup>1</sup> puede ser -CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>. R<sup>1</sup> también puede ser -CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>. R<sup>2</sup> puede ser -CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>. R<sup>2</sup> también puede ser -CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>.

En el presente documento se describe un compuesto aislado que tiene la estructura (II):



en la que

- 15 R<sup>1</sup> es -CH<sub>2</sub>OH o -CH(OH)CH<sub>3</sub>;

R<sup>2</sup> es -CH<sub>2</sub>C(O)NH<sub>2</sub> o -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>C(O)NH<sub>2</sub>; y

R<sup>3</sup> es H o CH<sub>3</sub>;

siempre que si R<sup>1</sup> es -CH<sub>2</sub>OH y R<sup>2</sup> es -CH<sub>2</sub>C(O)NH<sub>2</sub> entonces R<sup>3</sup> es H;

5 incluyendo sales, hidratos, solvatos, polimorfos, isómeros ópticos, isómeros geométricos, enantiómeros, diastereómeros, análogos acíclicos y mezclas de los mismos.

R<sup>3</sup> puede ser -CH<sub>3</sub>. R<sup>3</sup> también puede ser H. R<sup>1</sup> puede ser -CH<sub>2</sub>OH. R<sup>1</sup> también puede ser -CH(OH)CH<sub>3</sub>. R<sup>2</sup> puede ser -CH<sub>2</sub>C(O)NH<sub>2</sub>. R<sup>2</sup> también puede ser -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>C(O)NH<sub>2</sub>.

10 En el presente documento se describe una solución que comprende un compuesto de estructura (I), en la que la concentración del compuesto es de al menos 0,001 mg/ml, al menos 0,01 mg/ml o al menos 0,1 mg/ml o una solución que comprende un compuesto de estructura (II), en la que la concentración del compuesto es de al menos 0,001 mg/ml, al menos 0,01 mg/ml o al menos 0,1 mg/ml. Las soluciones desveladas pueden comprender además un vehículo agrónomicamente aceptable.

15 En aún otra realización, la presente invención se refiere a un procedimiento de tratamiento de una planta para controlar una enfermedad, en el que el procedimiento comprende aplicar una cantidad eficaz de una composición como se caracteriza en las reivindicaciones a la planta, a una parte de la planta y/o a un lugar donde se encuentra la planta. En determinados aspectos descritos en el presente documento, la composición es un producto de fermentación de la cepa NRRL B-50972 de *Paenibacillus* sp, la cepa NRRL B-67129 de *Paenibacillus* sp. o una cepa mutante fungicida de las mismas. En otros aspectos, el procedimiento comprende aplicar la composición a las partes foliares de la planta. En aún otros aspectos, la composición se aplica a entre aproximadamente 1 × 10<sup>10</sup> y aproximadamente 1 × 10<sup>12</sup> unidades formadoras de colonias (UFC) de la cepa NRRL B-50972 de *Paenibacillus* sp, la cepa NRRL B-67129 de *Paenibacillus* sp. o una cepa mutante fungicida de las mismas por hectárea. En una realización, la composición se aplica a entre aproximadamente 0,5 kg y aproximadamente 5 kg de sólidos de fermentación por hectárea.

25 En algunos aspectos, la enfermedad de la planta está provocada por un hongo. En otros aspectos, la enfermedad de la planta es una enfermedad de mildiú o de roya. En una realización, el mildiú es un mildiú pulverulento o un mildiú veloso. En otra realización, la enfermedad de roya se selecciona del grupo que consiste en roya de la hoja de trigo, roya de la hoja de cebada, roya de la hoja de centeno, roya de las hojas marrones, roya coronada y roya de los tallos.

30 En algunas realizaciones, el hongo se selecciona del grupo que consiste en *Alternaria alternata*, *Alternaria solani*, *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum lagenarium*, *Fusarium culmorum*, *Phaeosphaeria nodorum*, *Zymoseptoria tritici*, *Phytophthora cryptogea*, *Phytophthora infestans*, *Pythium ultimum*, *Magnaporthe oryzae*, *Thanatephorus cucumeris*, *Ustilago segetum* var. *avenae*, *Uromyces appendiculatus* y *Puccinia triticina*.

En otras realizaciones, la enfermedad de la planta es provocada por bacterias. En un aspecto, las bacterias se seleccionan del grupo que consiste en *Xanthomonas campestris*, *Pseudomonas syringae* y *Erwinia carotovora*.

35 La presente invención también se refiere al uso de las composiciones como se caracteriza en las reivindicaciones para el control de un organismo fitopatógeno en plantas útiles. En determinados aspectos, el organismo fitopatógeno se selecciona del grupo que consiste en *Alternaria alternata*, *Alternaria solani*, *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum lagenarium*, *Fusarium culmorum*, *Phaeosphaeria nodorum*, *Zymoseptoria tritici*, *Phytophthora cryptogea*, *Phytophthora infestans*, *Pythium ultimum*, *Magnaporthe oryzae*, *Thanatephorus cucumeris*, *Ustilago segetum* var. *avenae*, *Uromyces appendiculatus* y *Puccinia triticina*. En otros aspectos, el organismo fitopatógeno se selecciona del grupo que consiste en *Xanthomonas campestris*, *Pseudomonas syringae* y *Erwinia carotovora*.

40 En aún otros aspectos, las plantas útiles se seleccionan del grupo que consiste en manzanas, bananas, cítricos, kiwi, melones, melocotones, peras, piña, frutas con pipas, granada, col, coliflor, pepinos, curcubitáceas, tomates, patatas, trigo, arroz y soja.

### **Descripción breve de los dibujos**

45 La **FIG. 1** representa la actividad fungicida *in planta* de caldos completos de cepas de *Paenibacillus* sp. contra el tizón tardío de tomate (PHYTIN), el moho gris (BOTRCI) y la roya de la hoja de trigo (PUCCRT).

50 La **FIG. 2** representa la actividad antifúngica *in vitro* de extractos de fusaricidina a partir de caldos completos de cepas de *Paenibacillus* sp. contra *Alternaria alternata* (ALTEAL), *Botrytis cinerea* (BOTRCI), *Fusarium culmorum* (FUSACU), *Phaeosphaeria nodorum* (LEPTNO), *Zymoseptoria tritici* (SEPPTR), *Phytophthora cryptogea* (PHYTCR), *Phytophthora infestans* (PHYTIN), *Pythium ultimum* (PYTHUL), *Magnaporthe oryzae* (PYRIOR), *Thanatephorus cucumeris* (RHIZSO), *Ustilago segetum* var. *avenae* (USTIAV) y *Uromyces appendiculatus* (UROMAP).

La **FIG. 3** muestra la apertura de estructura del anillo en LiF04a (también conocida como fusaricidina A) para producir el análogo acíclico, LiF04c. Los análogos acíclicos de cada una de las fusaricidinas y de los compuestos tipo fusaricidina se producen de manera similar.

55 La **FIG. 4A** presenta un diagrama que presenta la estructura de las fusaricidinas conocidas con los aminoácidos conservados en las posiciones (1), (4) y (6) identificados y los aminoácidos que varían se indican como AA (aminoácido). La cola de ácido 15-guanidin-3-hidroxipentadecanoico (GHPD) forma un enlace amida con el extremo N de la L-treonina en la posición (1). El extremo C de la D-alanina en la posición (6) forma un enlace éster

con el grupo hidroxilo de la L-treonina en la posición (1), indicado con flechas que apuntan a una "O". La **FIG. 4B** muestra un cromatograma de HPLC/MS TOF de un extracto de células de *Paenibacillus* sp. en el cual se identifican fusaricidinas conocidas. La **FIG. 4C** representa las fusaricidinas conocidas detectables en un extracto de células de la cepa NRRL B-50972 de *Paenibacillus* sp. y/o de cepas procedentes de la misma.

La **FIG. 5A** presenta un diagrama que presenta la estructura de las Paeniserinas. Esta clase de compuestos es similar a las fusaricidinas excepto que una o ambas treoninas conservadas en las posiciones (1) y (4) están sustituidas por una serina.

La **FIG. 5B** muestra un cromatograma de HPLC/MS TOF de un extracto de células de la cepa NRRL B-50972 de *Paenibacillus* sp. y/o de cepas procedentes de la misma, en el cual se identifican las Paeniserinas. La **FIG. 5C** representa las Paeniserinas detectables en un extracto de células de la cepa NRRL B-50972 de *Paenibacillus* sp. y/o de cepas procedentes de la misma. Se muestran los valores de m/z y los tiempos de retención (RT) para todos los compuestos detectados.

La **FIG. 6A** representa la estructura química de la Paeniserina A1 obtenida del espectro UPLC/MS Triple TOF que se muestra en la **FIG. 6B**.

La **FIG. 7A** representa la estructura química de la Paeniserina B1 obtenida del espectro UPLC/MS Triple TOF que se muestra en la **FIG. 7B**.

La **FIG. 8A** presenta un diagrama que presenta la estructura de las Paeniprolixinas. Esta clase de compuestos es similar a las fusaricidinas excepto que la longitud de la cola GHPD se extiende de  $-(CH_2)_{12}-$  a  $-(CH_2)_{14}-$  o  $-(CH_2)_{16}-$ .

La **FIG. 8B** muestra un cromatograma de HPLC/MS TOF de un extracto de células de la cepa NRRL B-50972 de *Paenibacillus* sp. y/o de cepas procedentes de la misma, en el cual se identifican las Paeniprolixinas. La **FIG. 8C** representa las Paeniprolixinas detectables en un extracto de células de la cepa NRRL B-50972 de *Paenibacillus* sp. y/o de cepas procedentes de la misma. Se muestran los valores de m/z y los tiempos de retención (RT) para todos los compuestos detectados.

La **FIG. 9A** representa la estructura química de la Paeniprolixina C1 obtenida del espectro UPLC/MS Triple TOF que se muestra en la **FIG. 9B**.

La **FIG. 10A** representa la estructura química de la Paeniprolixina D1 obtenida del espectro UPLC/MS Triple TOF que se muestra en la **FIG. 10B**.

La **FIG. 11** representa un ensayo de difusión de discos de antibióticos de Kirby-Bauer con fusaricidinas A y B ("AB"), Paeniserinas A1 y B1 ("868"), las Paeniprolixinas A2 y B2 ("938") o una combinación de 868 y 938 aplicadas a una capa de esporas de *Colletotrichum lagenarium* (COLLLA) sobre una placa de agar. Se indica el diámetro de cada disco con su zona de inhibición del crecimiento fúngico en milímetros.

La **FIG. 12A** se muestra la estructura química de la fusaricidina A y una representación simplificada de esta estructura. Las **FIG. 12B-12E** representan representaciones simplificadas de combinaciones de las fusaricidinas, Paeniserinas y/o Paeniprolixinas producidas por la cepa NRRL B-50972 de *Paenibacillus* sp. y de cepas procedentes de la misma. Las combinaciones, tales como las mencionadas, pueden producir un efecto antifúngico sinérgico y son responsables de la eficacia relativamente alta y la actividad antifúngica de amplio espectro observadas con la cepa NRRL B-50972 de *Paenibacillus* sp. y las cepas procedentes de la misma.

La **FIG. 13** presenta un alineamiento de múltiples secuencias de un segmento de la FusA fusaricidina sintasa expresada por las siguientes cepas de *Paenibacillus*: *Paenibacillus peoriae* A (SEQ ID NO: 1); *Paenibacillus polymyxa* A (SEQ ID NO: 2); *Paenibacillus polymyxa* PKB1 (GenBank ABQ96384.2; SEQ ID NO: 3); *Paenibacillus polymyxa* E681 (GenBank ADM67985.1; SEQ ID NO: 4); *Paenibacillus polymyxa* B (SEQ ID NO: 5); *Paenibacillus polymyxa* SQR (GenBank AHM63812.1; SEQ ID NO: 6); *Paenibacillus polymyxa* C (SEQ ID NO: 7); *Paenibacillus polymyxa* M1 (GenBank CCC83015.1; SEQ ID NO: 8); *Paenibacillus polymyxa* SC2 (GenBank ACA09733.2; SEQ ID NO: 9); la cepa NRRL B-50972 de *Paenibacillus* sp. (SEQ ID NO: 10) y la cepa A de *Paenibacillus* sp. (SEQ ID NO: 11). Los restos de aminoácidos que determinan la especificidad de sustrato están identificados con un recuadro negro (véase también la **Tabla 1**). Estos restos de aminoácidos están ubicados en las posiciones 3203, 3204, 3207, 3246, 3267, 3269, 3290, 3298, 3299 y 3486 de las SEQ ID NO: 1-5 y 11 y en las posiciones 3204, 3205, 3208, 3247, 3268, 3270, 3291, 3299, 3300 y 3487 de las SEQ ID NO: 6-9.

La **FIG. 14** representa la agrupación de genes de fusaricidina en la cepa NRRL B-50972 de *Paenibacillus* sp. y la cepa A de *Paenibacillus* sp. ("Cepa A"). Las flechas representan genes individuales dentro de la agrupación (es decir, *fusG* está representado por la flecha "G", *fusF* está representado por la flecha "F", etc.). La flecha más grande representa el gene de la *fusA* fusaricidina sintasa con las siguientes abreviaturas y símbolos: A = dominio de adenilación (reconocimiento del sustrato y activación); C = dominio de condensación (formación de enlaces peptídicos); E = dominio de epimerización (racemización del sustrato); TE = dominio tioesterasa (liberación del producto); óvalo sin letra = dominio de tiolación (T) (proteína transportadora de péptido). El gen *fusA* tiene seis módulos responsables de la incorporación de los aminoácidos indicados en los cuadros arriba o debajo de cada agrupación de genes. La cepa A tiene una típica agrupación de genes de fusaricidina mientras que a la agrupación de genes de fusaricidina de la cepa NRRL B-50972 de *Paenibacillus* sp. le falta un dominio A funcional en el módulo 3. Como resultado de ello, las fusaricidinas producidas por la cepa NRRL B-50972 de *Paenibacillus* sp. carecen de tirosina y fenilalanina en la posición (3) y solamente incorporan valina o isoleucina.

La **FIG. 15** representa un alineamiento de secuencias del gen *spoOA* en la cepa NRRL B-50972 de *Paenibacillus* sp. (SEQ ID NO: 12) y de la cepa NRRL B-67129 de *Paenibacillus* sp. (SEQ ID NO: 13).

La **FIG. 16** representa un alineamiento de secuencias de ortólogos de *SpoOA* de bacterias formadoras de endosporas que indica que el cambio de nucleótidos en la secuencia codificante de la cepa NRRL B-67129 de *Paenibacillus* sp. da como resultado una sola sustitución de aminoácidos en una región conservada. Las

secuencias alineadas de ortólogos de SpoOA son: SpoOA de *Paenibacillus terrae* (SEQ ID NO: 14), SpoOA de la cepa NRRL B-50972 de *Paenibacillus* sp. (SEQ ID NO: 15), SpoOA de la cepa NRRL B-67129 de *Paenibacillus* sp. (SEQ ID NO: 16), SpoOA de *Paenibacillus polymyxa* (SEQ ID NO: 17), SpoOA de *Bacillus subtilis* (SEQ ID NO: 18), SpoOA de *Bacillus cereus* (SEQ ID NO: 19) y SpoOA de *Clostridium pasteurianum* (SEQ ID NO: 20).

5 La FIG. 17 representa las concentraciones inhibitoras mínimas para los valores de 80 % (CIM80) de varias fusaricidinas, Paeniserinas y Paeniprolinxinas con los patógenos fúngicos *Alternaria solani* (ALTESO) y *Colletotrichum lagenarium* (COLLLA).

### **Descripción detallada**

10 La presente invención proporciona la cepa NRRL B-50972 de *Paenibacillus* sp. o un mutante (cepa) fungicida procedente de la misma de acuerdo con las reivindicaciones. Se ha descubierto que la cepa NRRL B-50972 de *Paenibacillus* sp. tiene un amplio espectro de actividad contra fitopatógenos.

15 Los microorganismos y las cepas particulares que se describen en el presente documento, a menos que específicamente se indique de otra manera, se separaron todos de la naturaleza y se cultivaron en condiciones artificiales, tal como en cultivos en frascos con agitación, o mediante procedimientos de fabricación con aumento de escala, tal como en biorreactores para maximizar, por ejemplo, la producción de metabolitos bioactivos. El cultivo en dichas condiciones conduce a la "domesticación" de cepas. En general, tal cepa "domesticada" difiere de sus homólogos encontrados en la naturaleza en cuanto a que se cultiva como una población homogénea que no está sometida a las presiones de selección encontradas en el entorno natural sino más bien a presiones de selección artificiales.

20 Como se usa en el presente documento, el término "aislado" se refiere a un compuesto que se ha enriquecido o concentrado en un caldo completo o un producto de fermentación o que se ha purificado parcial o sustancialmente a partir de un caldo completo o de un producto de fermentación.

25 En una realización, se proporciona una cepa mutante de la cepa NRRL B-50972 de *Paenibacillus* sp. El término "mutante" se refiere a una variante genética procedente de la cepa NRRL B-50972 de *Paenibacillus* sp. En una realización, el mutante tiene una o más o todas las características identificatorias (funcionales) de la cepa NRRL B-50972 de *Paenibacillus* sp. En un caso particular, el mutante o un producto de fermentación del mismo controla (como una característica identificatoria funcional) hongos, Oomycetos y/o bacterias al menos tan bien como la cepa parental NRRL B-50972 de *Paenibacillus* sp. Dichos mutantes pueden ser variantes genéticas que tienen una secuencia genómica que tiene más que aproximadamente un 85 %, más que aproximadamente un 90 %, más que aproximadamente un 95 %, más que aproximadamente un 98 % o más que aproximadamente un 99 % de identidad de secuencia con la cepa NRRL B-50972 de *Paenibacillus* sp. Los mutantes se pueden obtener mediante tratamiento de células de la cepa NRRL B-50972 de *Paenibacillus* sp. con sustancias químicas o irradiación o mediante selección de los mutantes espontáneos de una población de células de la cepa NRRL B-50972 de *Paenibacillus* sp. (tales como mutantes resistentes a fagos o resistentes a antibióticos) o mediante otros medios bien conocidos por los expertos en la materia.

35 La cepa NRRL B-50972 de *Paenibacillus* sp. y mutantes de la misma tienen actividad contra una amplia gama de patógenos de plantas. En un aspecto, la cepa tiene actividad contra hongos, tal como antracnosa de pepino, el mildiú pulverulento de pepino, la roya de la hoja de trigo, mildiú pulverulento y botritis de cebada; Oomycetos, tales como el tizón tardío de tomate, el mildiú veloso de pepino y el mildiú veloso de *Brassica*; y/o bacterias, tales como *Pseudomonas*, *Xanthomonas* y *Erwinia*.

40 La cepa de *Paenibacillus* sp. comprende una secuencia de ADN que presenta al menos un 90 % de identidad de secuencia, al menos un 95 % de identidad de secuencia, al menos un 96 % de identidad de secuencia, al menos un 97 % de identidad de secuencia, al menos un 98 % de identidad de secuencia o al menos un 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 10.

45 En determinados aspectos, la divulgación se refiere a un producto de fermentación que comprende una cepa de *Paenibacillus* sp. en la que la cepa de *Paenibacillus* sp. produce fusaricidinas, Paeniserinas y/o Paeniprolinxinas. Las fusaricidinas son una familia de depsipéptidos con una cola de ácido 15-guanidin-3-hidroxipentadecanoico (GHPD), así como sus equivalentes lineales. Las características conservadas específicas de las fusaricidinas son esta cola de GHPD, así como tres de los seis aminoácidos en la secuencia: (1) treonina, (4) treonina y (6) alanina.

50 Originalmente las fusaricidinas fueron descubiertas, pero no caracterizadas, por Nakajima y col., (*J. Antibiot.* 1972, 25, 243-247) a mediados de la década de los años 70, fueron descritas por Kurusu y col. (*J. Antibiot.*, 1987, 40, 1506-1514) hacia fines de la década de los años 80. Kajimura y col. (*J. Antibiot.*, 1996, 49, 129-135; *J. Antibiot.*, 1997 50, 220-228), Kuroda y col. (*Heterocycles*, 2000, 53, 1533-1549; *J. Mass Spectrom.*, 2001, 36, 30-37) y Beatty y col. (*Can. J. Microbiol.*, 2002, 48, 159-169) desde mediados de la década de los años 90 hasta principios de la década de los años 2000 las estudiaron adicionalmente. Durante este período de investigación intensa, se cambió el nombre de estos compuestos varias veces dependiendo del autor (la fusaricidina A también se conoce como LiF04a, gatavalina o incluso KT-6291A). Aunque hay muchas publicaciones sobre el tema, cada vez se describen compuestos selectos del mismo grupo de 24 fusaricidinas conocidas.

Después de un período sin grandes novedades en el tema, Vater y col., (*J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **2015**, *26*, 1130-1141) describieron la elucidación estructural de las fusaricidinas por espectrometría de masas y describieron varios análogos de la familia. Vater y col. identificaron una nueva clase de compuestos de tipo fusaricidina con siete aminoácidos (es decir, una alanina adicional unida al resto treonina (4) en la secuencia peptídica). Como se usa en el presente documento, la expresión “análogo acíclico” se refiere al compuesto que corresponde a la fusaricidina o a un compuesto de tipo fusaricidina (por ejemplo, una Paeniserina o una Paeniprolixina) pero que carece del enlace éster, dando como resultado una estructura lineal.

Las cadenas de aminoácidos de las fusaricidinas están unidas entre sí y las modifica una péptido sintasa no ribosómica (NRPS, forma siglada de *non-ribosomal peptide synthetase*). La NRPS multidominio consiste en hasta 15.000 aminoácidos y, por lo tanto, se la considera entre las proteínas más largas de la naturaleza (Schwarzer y col., (2003) *Nonribosomal Peptides: From Genes to Products*; *Nat. Prod. Rep.*, *20*, 275-287). La incorporación de la NRPS no se limita a los 21 aminoácidos convencionales traducidos por el ribosoma, y esta promiscuidad contribuye a la gran diversidad estructural y actividad biológica de los péptidos no ribosómicos (Li y Jensen, (2008), *Nonribosomal biosynthesis of fusaricidins by Paenibacillus polymyxa PKB1 involves direct activation of a d-amino acid* (*Chem. Biol.*, *15*, 118-127).

En la E68 de *P. polymyxa* se ha caracterizado la agrupación de genes biosintéticos de la fusaricidina (*fusGFEDCBA*) y se observó que la secuencia codificante de la NRPS, la mayor secuencia de ADN codificante (CDS, forma siglada de *coding DNA sequence*) de la agrupación, codifica un péptido de seis módulos (Choi y col., *Identification and Functional Analysis of the Fusaricidin Biosynthetic Gene of Paenibacillus polymyxa E681*; *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, *365*, 89-95; Li y Jensen, *Identification and Functional Analysis of the Fusaricidin Biosynthetic Gene of Paenibacillus polymyxa E681*; *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, *365*, 89-95; Li y col., (2013); *Promoter Analysis and Transcription Regulation of fus Gene Cluster Responsible for Fusaricidin Synthesis of Paenibacillus polymyxa SQR-21*; *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, *97*, 9479-9489). La agrupación biosintética incluye otras CDS responsables de la biosíntesis de la fracción lipídica pero no contiene genes de transportadores (Li y Jensen, (2008), *Nonribosomal Biosynthesis of Fusaricidins by Paenibacillus polymyxa PKB1 Involves Direct Activation of a d-amino acid*; *Chem. Biol.*, *15*, 118-127). En *P. polymyxa*, se identificó un promotor para el operón *fus* y se demostró que se une a un represor de la transcripción (AbrB) que se implicó en estudios previos como un regulador de la esporulación; esto resulta interesante dado que se observó que la fusaricidina se sintetiza durante la esporulación, coordinando así el metabolismo secundario del microbio con su ciclo de vida (Li y col., (2013); *Promoter Analysis and Transcription Regulation of fus Gene Cluster Responsible for Fusaricidin Synthesis of Paenibacillus polymyxa SQR-21*; *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, *97*, 9479-9489).

Normalmente, se cree que la diversidad alélica es responsable de producir la diversidad química. Sin embargo, una característica interesante de la agrupación *fus* es que un solo alelo de *fusA* puede producir una diversidad de fusaricidinas, que difieren en sus aminoácidos incorporados (Tyr, Val, Ile, allo-Ile, Phe); el mecanismo subyacente es que el dominio NRPS A, responsable del reconocimiento de aminoácidos, tiene una especificidad de sustrato relajada (Han y col., (2012); *Site-Directed Modification of the Adenylation Domain of the Fusaricidin Nonribosomal Peptide Synthetase for Enhanced Production of Fusaricidin Analogs*; *Biotechnol. Lett.* *34*, 1327-1334; Mousa y col., (2015) *Biodiversity of Genes Encoding Anti-Microbial Traits within Plant Associated Microbes*, *Front Plant Sci.*, 2015; 6:231).

La estructura del dominio A, que es responsable del reconocimiento y la activación del sustrato en el gen *fusA*, se determinó a partir de GrsA utilizando cristalografía de rayos X, y se identificaron los 10 restos de aminoácidos que determinan la especificidad de sustrato (Asp235, Ala236, Trp239, Thr278, Ile299, Ala301, Ala322, Ile330, Cys331 y Lys517) (Challis y col., (2000) *Predictive, Structure-Based Model of Amino Acid Recognition by Nonribosomal Peptide Synthetase Adenylation Domains*; *Chem Biol* *7*: 211-224; Stachelhaus y col., (1999) *The Specificity Conferring Code of Adenylation Domains in Nonribosomal Peptide Synthetases*; *Chem Biol* *6*: 493-505). Estos 10 restos distintivos se pueden clasificar en tres subgrupos basado en su función dentro del sitio de unión al sustrato. Los restos Asp235 y Lys517 interactuaron con los extremos carboxilo y amino del sustrato, respectivamente, y el análisis de secuencia reveló que su posición en el dominio A de las NRPS era invariable. Los restos Ala236, Ala301 e Ile330 son moderadamente variables dentro de los dominios A específicos para los sustratos aminoácidos que tienen cadenas laterales alifáticas. Trp239, Thr278, Ile299, Ala322 y Cys331 son posiciones muy variables y se cree que son importantes en la discriminación y selección de diferentes sustratos (Challis y col., (2000) *Predictive, Structure-Based Model of Amino Acid Recognition by Nonribosomal Peptide Synthetase Adenylation Domains*; *Chem Biol*, *7*: 211-224; Stachelhaus y col., (1999) *The Specificity Conferring Code of Adenylation Domains in Nonribosomal Peptide Synthetases*; *Chem Biol*, *6*: 493-505). Ile299 era la posición más variable de todas dentro de la secuencia que confiere especificidad de sustrato (Stachelhaus y col., (1999) *The Specificity Conferring Code of Adenylation Domains in Nonribosomal Peptide Synthetases*; *Chem Biol*, *6*: 493-505).

Los 10 restos de aminoácidos que determinan la especificidad de sustrato en la fusaricidina sintasa se muestran en la **Tabla 1**. Los dominios de adenilación (dominios A) de cada uno de los seis módulos en la sintasa se conocen como FusA-A1 para el primer módulo, FusA-A2 para el segundo módulo, FusA-A3 para el tercer módulo, etc. Estos 10 restos de aminoácidos también se identifican en el alineamiento de múltiples secuencias de FusA de diversas cepas de *Paenibacillus* sp. que se muestra en la **FIG. 13**.

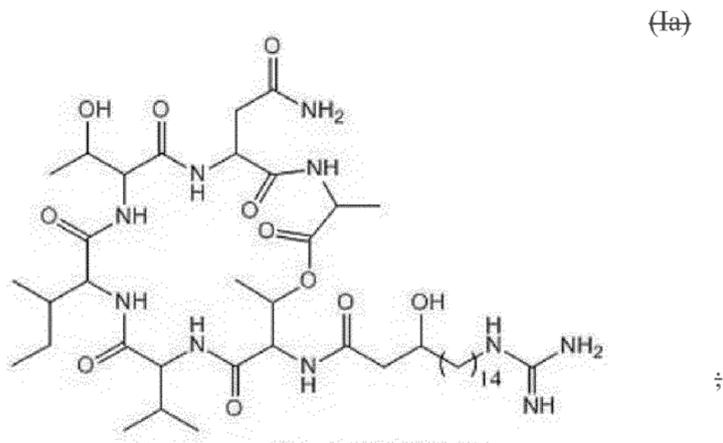
Tabla 1

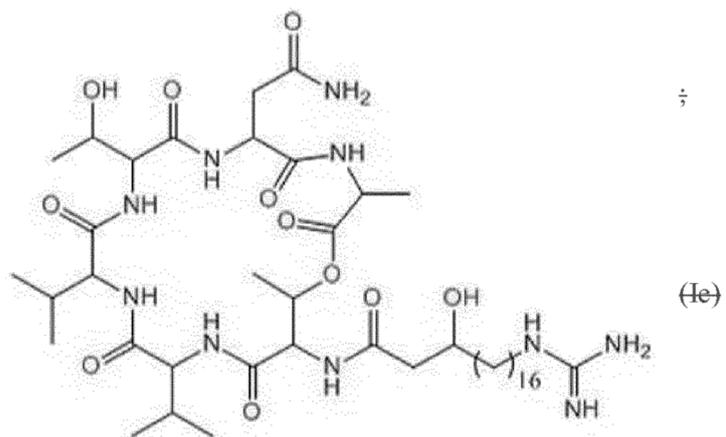
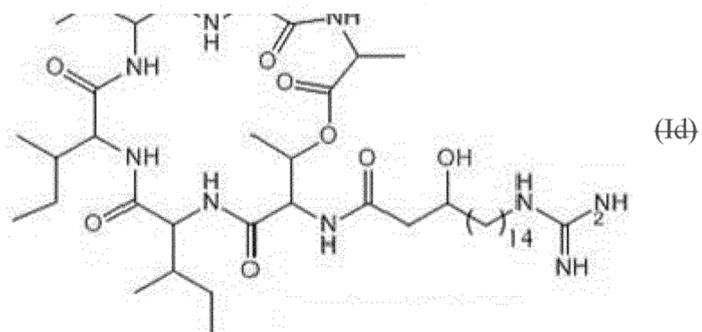
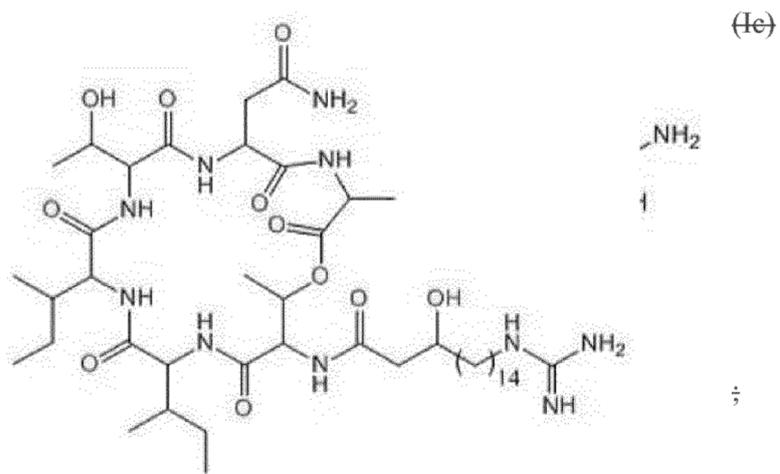
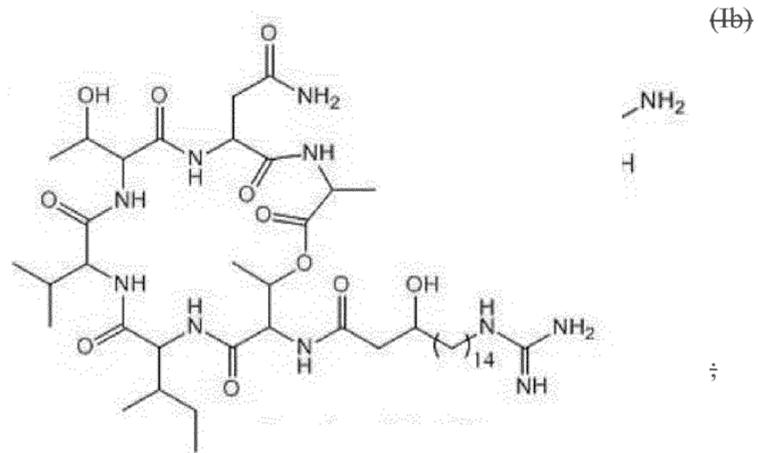
Dominio A	Posiciones de los restos implicados en el reconocimiento del sustrato										Resto correspondiente en la fusaricidina
	235	236	239	278	299	301	322	330	331	517	
FusA-A1	D	F	W	N	I	G	M	V	H	K	L-Thr
FusA-A2	D	A	F	W	L	G	C	T	F	K	D-Val, D-allo-Ile o D-Ile
FusA-A3	D	A	S	T	L	A	G	V	C	K	L-Tyr, L-Phe, L-Val, L-Ile o L-allo-Ile
FusA-A4	D	F	W	N	I	G	M	V	H	K	D-allo-Thr
FusA-A5	D	L	T	K	I	G	E	V	G	K	D-Asn o D-Gln
FusA-A6	D	F	P	N	F	C	I	V	Y	K	D-Ala

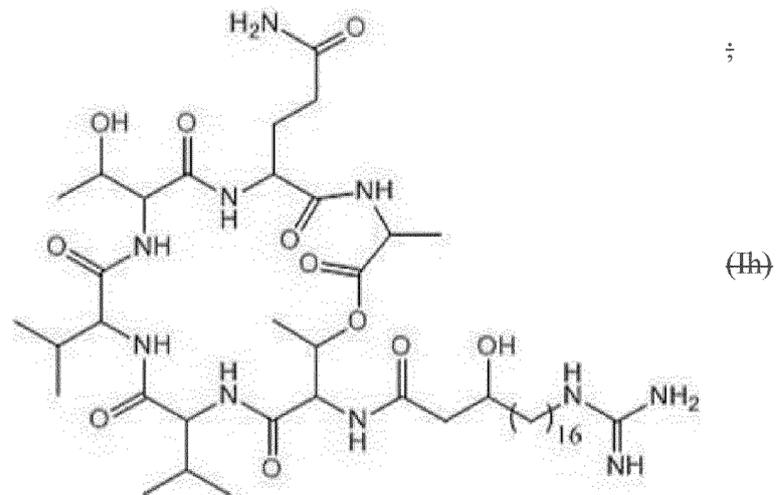
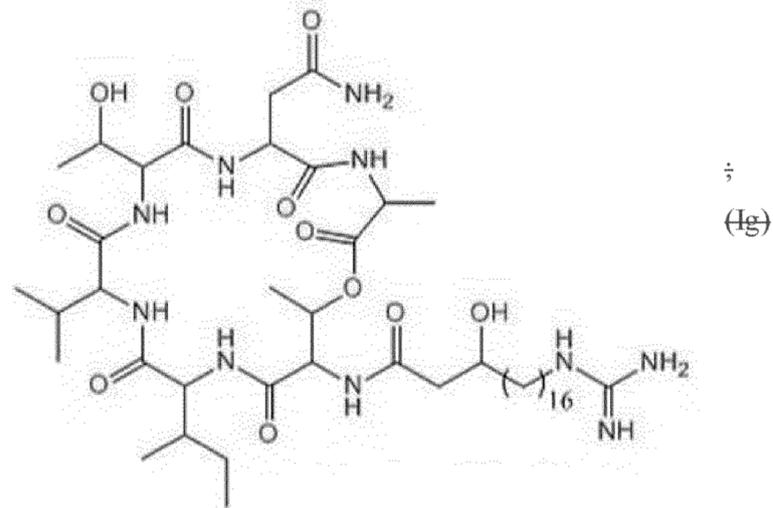
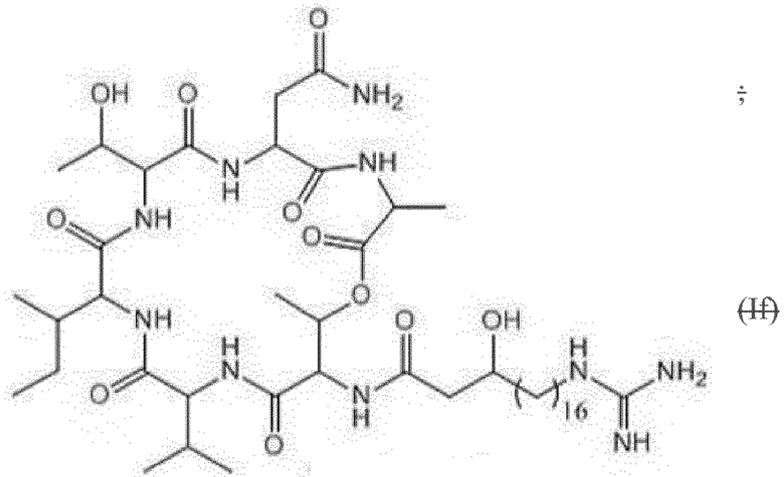
5 En el presente documento se desvela una cepa fungicida de *Paenibacillus* sp. que expresa una variante de la fusaricidina sintasa que comprende una delección de al menos uno, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis, al menos siete, al menos ocho, al menos nueve o los diez restos de aminoácidos que determinan la especificidad de sustrato en el FusA-A3. La cepa fungicida de *Paenibacillus* sp. puede expresar una fusaricidina sintasa con una delección en FusA-A3 de al menos un resto de aminoácido seleccionado del grupo que  
10 consiste en Asp235, Ala236, Ser239, Thr278, Leu299, Ala301, Ala/Gly322, Val330, Cys331, Lys517, y combinaciones de los mismos.

Las delecciones en el FusA-A3 que se desvelan en el presente documento afectan la capacidad de la fusaricidina sintasa para incorporar aminoácidos específicos en la posición de aminoácido (3) del anillo peptídico en la fusaricidina o en el compuesto de tipo fusaricidina. Por ejemplo, la cepa NRRL B-50972 de *Paenibacillus* sp. comprende delecciones en FusA-A3 y no puede producir compuestos de fusaricidina con un aminoácido tirosina o un aminoácido fenilalanina en la posición de aminoácido (3). Sin desear quedar ligados a teoría alguna, puede ser que las delecciones en el FusA-A3 desvíen el metabolismo de la biosíntesis de las fusaricidinas clásicas hacia la biosíntesis de compuestos de tipo fusaricidina, tales como las Paeniserinas y Paeniprolixinas.  
15

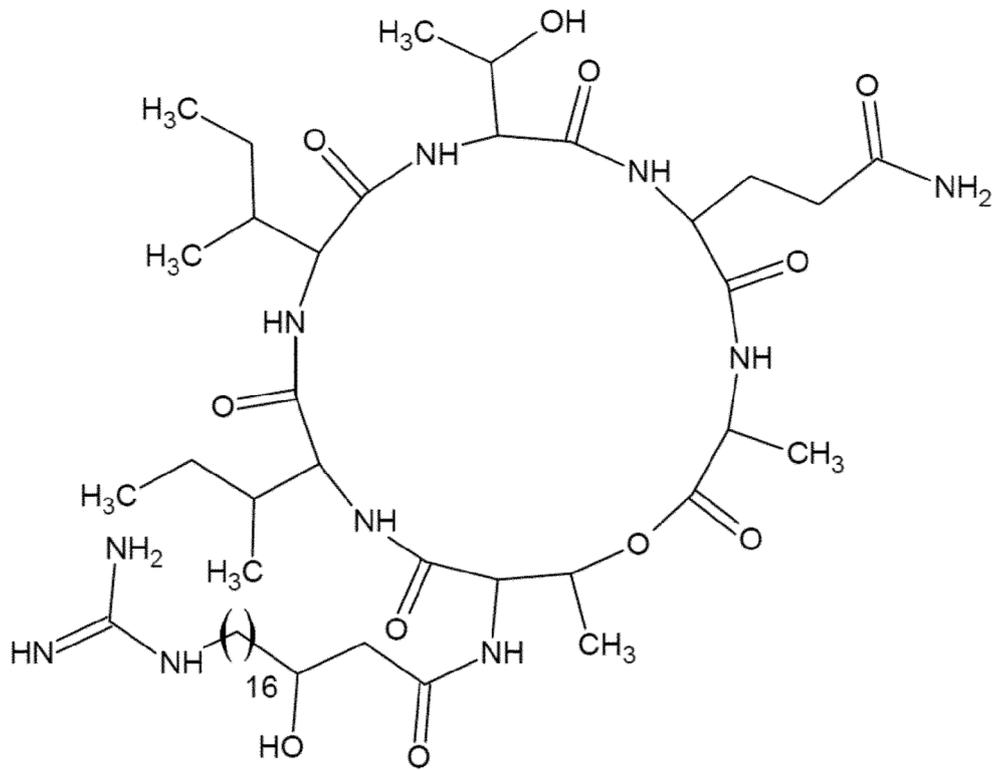
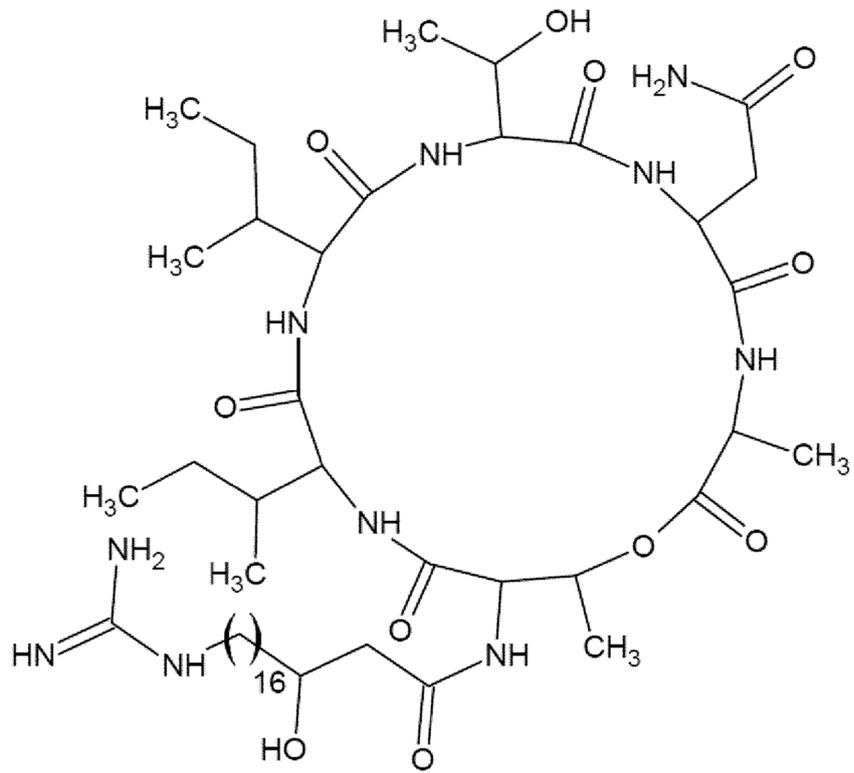
En determinadas realizaciones, la presente invención se refiere a una composición que comprende un cultivo biológicamente puro de una cepa fungicida de *Paenibacillus* sp. que comprende una variante de la fusaricidina sintasa que carece de un dominio de adenilación funcional en el tercer módulo (FusA-A3), como se caracteriza en las reivindicaciones, que además comprende al menos una Paeniserina y al menos una Paeniprolixina. En determinados aspectos, la al menos una Paeniserina y al menos una Paeniprolixina están aisladas o enriquecidas en la composición.  
20

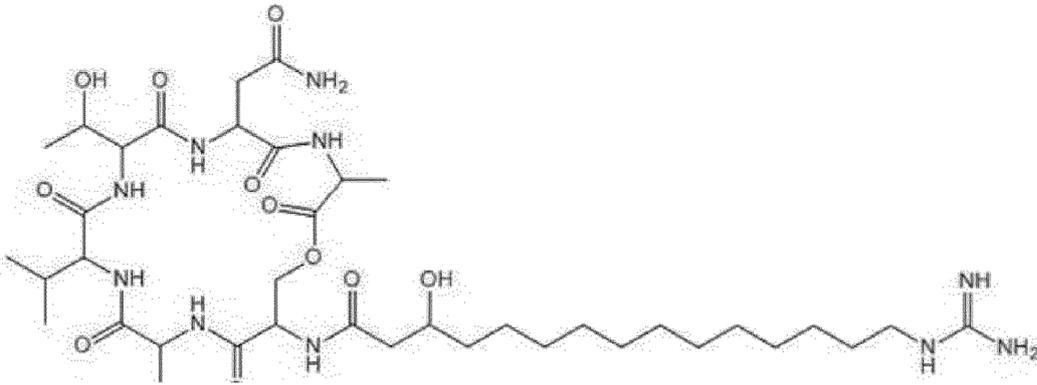




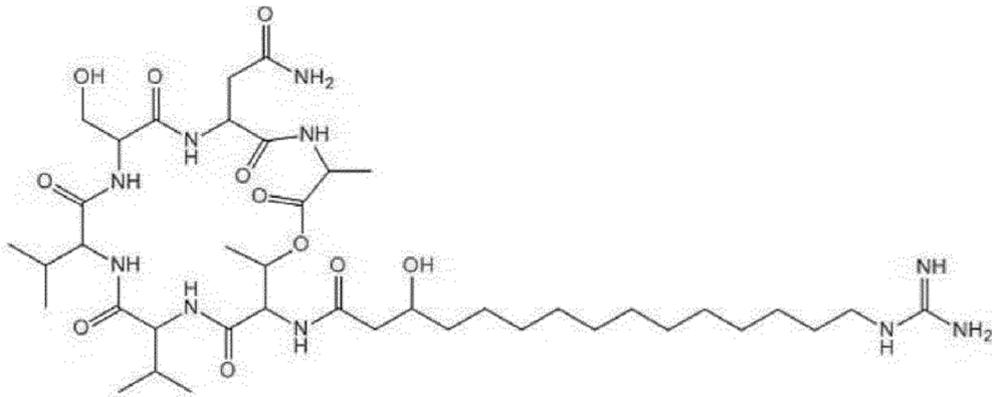




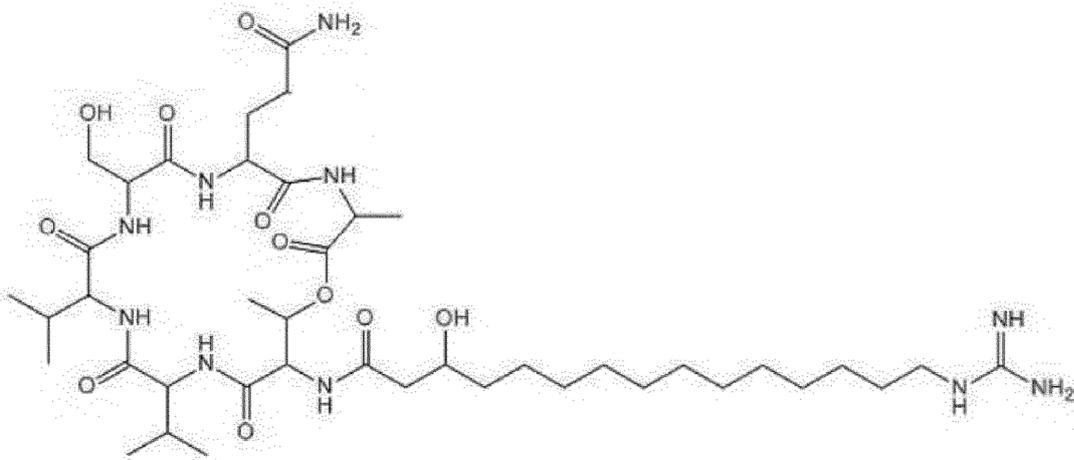




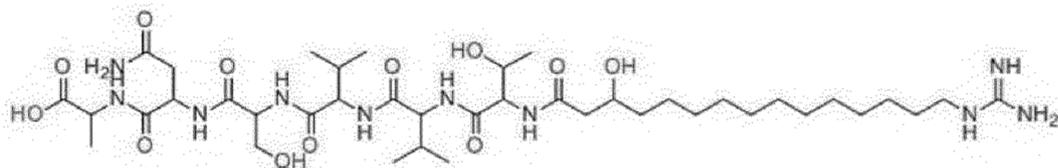
;



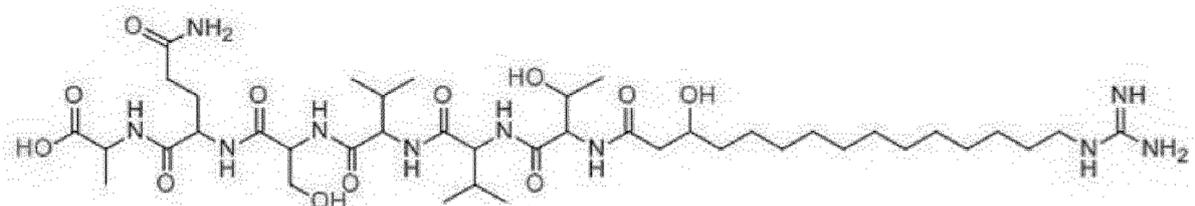
;



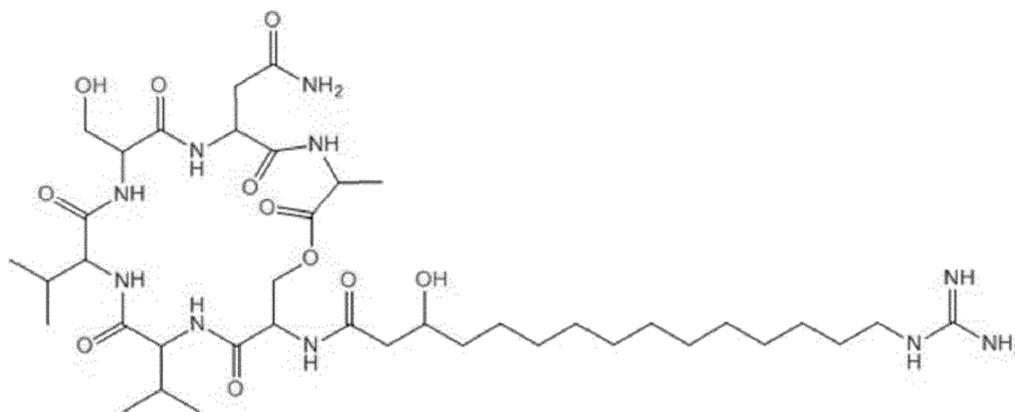
;



;

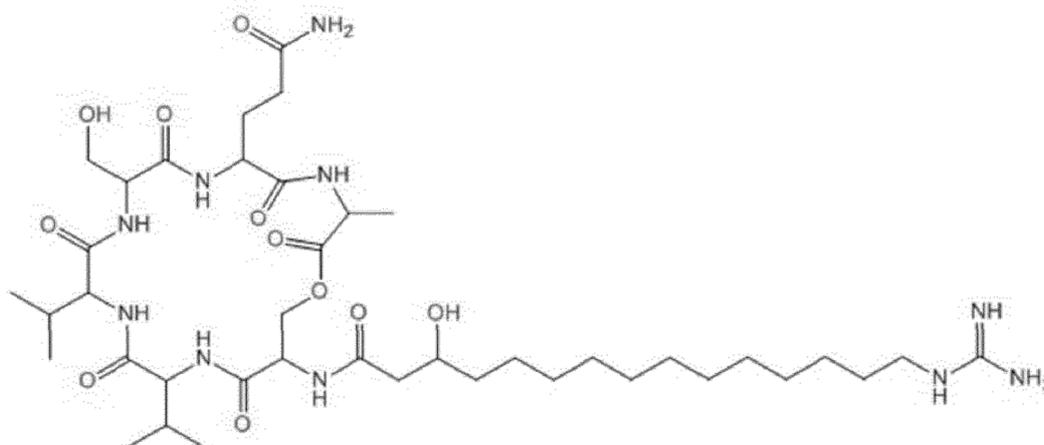


(Hii)



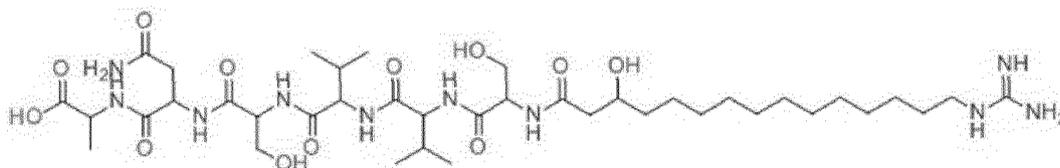
;

(Hij)



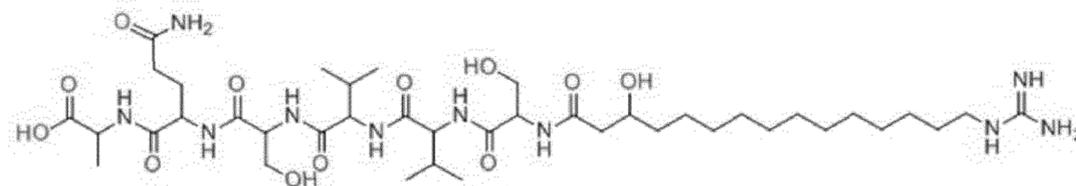
;

(Hik)



;

(Hii)



- 5 La presente divulgación también abarca procedimientos de tratamiento de una planta para controlar enfermedades en plantas mediante la administración a una planta o una parte de planta, tal como una hoja, tallo, flores, frutos, raíces o semillas o mediante aplicación a un lugar donde se encuentra la planta sobre el cual crece la planta o partes de planta, tal como el suelo, de la cepa NRRL B-50972 de *Paenibacillus* sp. o mutantes de la misma, o preparaciones sin células de la misma o metabolitos de la misma.
- 10 En un procedimiento descrito en el presente documento, una composición que contiene la cepa NRRL B-50972 de *Paenibacillus* sp. o un mutante fungicida de la misma se puede aplicar a cualquier planta o a cualquier parte de cualquier planta cultivada en cualquier tipo de medio usado para cultivar plantas (por ejemplo, tierra, vermiculita, cartón desmenuzado y agua) o se puede aplicar a plantas o las partes de plantas que crecen de forma aérea, tales como orquídeas o los helechos cuerno de alce. La composición se puede aplicar, por ejemplo, por rociado, atomización, vaporización, dispersión, pulverización, riego, riego a chorros, riego suave, riego copioso o fumigación. Como ya se indicó previamente, la aplicación se puede llevar a cabo en cualquier ubicación deseada donde pudiera encontrarse la planta de interés, tal como en entornos agrícolas, de horticultura, forestales, de una plantación, de huertos frutales,
- 15

vivero, cultivos orgánicos, de céspedes y urbanos.

Las composiciones de la presente invención se pueden obtener mediante cultivo de la cepa NRRL B-50972 de *Paenibacillus* sp. de acuerdo con procedimientos bien conocidos en la técnica, incluyendo mediante uso de medios y otros procedimientos descritos más adelante en los ejemplos. Los procedimientos de cultivo microbiano a gran escala convencionales incluyen fermentación sumergida, fermentación en estado sólido o cultivo en superficie líquida. Hacia el final de la fermentación, a medida que se van agotando los nutrientes, las células comienzan la transición de la fase de crecimiento a la fase de esporulación, de manera tal que el producto de fermentación final comprende mayormente esporas, metabolitos y medio de fermentación residual. La esporulación forma parte del ciclo de vida natural de *Paenibacillus* y en general la célula la inicia en respuesta a la limitación de nutrientes. La fermentación está configurada para obtener niveles altos de unidades formadoras de colonias y para promover la esporulación. Las células, esporas y metabolitos bacterianos del medio de cultivo que son el resultado de la fermentación se pueden utilizar directamente o se pueden concentrar utilizando procedimientos industriales convencionales, tales como centrifugación, filtración por flujo tangencial, filtración profunda y evaporación.

Las composiciones de la presente invención incluyen productos de fermentación. En algunas realizaciones, el caldo de fermentación concentrado se lava, por ejemplo, mediante un procedimiento de diafiltración, para eliminar el caldo de fermentación residual y los metabolitos. La expresión "caldo concentrado", como se usa en el presente documento, se refiere al caldo completo (caldo de fermentación) que se ha concentrado mediante procedimientos industriales convencionales, como se describió previamente, pero que permanece en una forma líquida. La expresión "sólido de fermentación", como se usa en el presente documento, se refiere al material sólido remanente después de secar el caldo de fermentación. La expresión "producto de fermentación", como se usa en el presente documento, se refiere al caldo completo, a un concentrado del caldo y/o a sólidos de fermentación. Las composiciones de la presente invención incluyen productos de fermentación.

El caldo de fermentación o el caldo concentrado se puede secar con o sin la adición de vehículos, utilizando procesos o procedimientos de secado convencionales tales como secado por pulverización, liofilización, secado en bandeja, secado en lecho fluido, secado en tambor o evaporación.

Los productos secos resultantes se pueden procesar adicionalmente, tal como por molienda o granulación, para lograr un tamaño de partícula o un formato físico específico. Además, se pueden añadir vehículos, que se describen más adelante, después del secado.

Las preparaciones sin células del caldo de fermentación de las cepas de la presente invención se pueden obtener mediante cualquier medio conocido en la técnica, tal como extracción, centrifugación y/o filtración del caldo de fermentación. Los expertos en la materia podrán apreciar que las denominadas preparaciones sin células pueden no carecer de células, sino que mayormente no contienen células o esencialmente no contienen células, dependiendo de la técnica usada (por ejemplo, velocidad de centrifugación) para eliminar las células. La preparación sin células resultante se puede secar y/o formular con componentes que ayudan en su aplicación a las plantas o al medio de cultivo vegetal. Los procedimientos de concentración y las técnicas de secado descritas anteriormente para el caldo de fermentación también son aplicables a las preparaciones sin células.

En una realización, el producto de fermentación comprende al menos aproximadamente  $1 \times 10^4$  unidades formadoras de colonias (UFC) del microorganismo (por ejemplo, la cepa NRRL B-50972 de *Paenibacillus* sp. o una cepa mutante fungicida de la misma)/ml de caldo. En otra realización, el producto de fermentación comprende al menos aproximadamente  $1 \times 10^5$  unidades formadoras de colonias (UFC) del microorganismo (por ejemplo, la cepa NRRL B-50972 de *Paenibacillus* sp. o una cepa mutante fungicida de la misma)/ml de caldo. En otra realización, el producto de fermentación comprende al menos aproximadamente  $1 \times 10^6$  UFC del microorganismo (por ejemplo, la cepa NRRL B-50972 de *Paenibacillus* sp. o una cepa mutante fungicida de la misma)/ml de caldo. En aún otra realización, el producto de fermentación comprende al menos aproximadamente  $1 \times 10^7$  UFC del microorganismo (por ejemplo, la cepa NRRL B-50972 de *Paenibacillus* sp. o una cepa mutante fungicida de la misma)/ml de caldo. En otra realización, el producto de fermentación comprende al menos aproximadamente  $1 \times 10^8$  UFC del microorganismo (por ejemplo, la cepa NRRL B-50972 de *Paenibacillus* sp. o una cepa mutante fungicida de la misma)/ml de caldo. En otra realización, el producto de fermentación comprende al menos aproximadamente  $1 \times 10^9$  UFC del microorganismo (por ejemplo, la cepa NRRL B-50972 de *Paenibacillus* sp. o una cepa mutante fungicida de la misma)/ml de caldo. En otra realización, el producto de fermentación comprende al menos aproximadamente  $1 \times 10^{10}$  UFC del microorganismo (por ejemplo, la cepa NRRL B-50972 de *Paenibacillus* sp. o una cepa mutante fungicida de la misma)/ml de caldo. En otra realización, el producto de fermentación comprende al menos aproximadamente  $1 \times 10^{11}$  UFC del microorganismo (por ejemplo, la cepa NRRL B-50972 de *Paenibacillus* sp. o una cepa mutante fungicida de la misma)/ml de caldo.

Las composiciones de la invención se pueden utilizar como tales o, dependiendo de sus propiedades físicas y/o químicas particulares, en la forma de sus formulaciones o las formas de uso preparadas a partir de las mismas, tales como aerosoles, cápsulas, suspensiones, concentrados de neblina fría, concentrados de neblina caliente, gránulos encapsulados, gránulos finos, concentrados fluidos para el tratamiento de semillas, soluciones listas para usar, polvos espolvoreables, concentrados emulsionables, emulsiones de aceite en agua, emulsiones de agua en aceite, macrogránulos, microgránulos, polvos dispersables en aceite, concentrados fluidos miscibles en aceite, líquidos miscibles en aceite, gas (bajo presión), productos generadores de gases, espumas, pastas, semillas recubiertas con

5 plaguicidas, concentrados en suspensión, dispersión oleosas, concentrados de suspoemulsiones, concentrados solubles, suspensiones, polvos humectables, polvos solubles, polvos finos y gránulos, gránulos o comprimidos solubles en agua y dispersables en agua, polvos solubles en agua y dispersables en agua para el tratamiento de semillas, polvos humectables, productos naturales y sustancias sintéticas impregnadas con el principio activo, y también microencapsulamientos en sustancias poliméricas y en materiales de recubrimiento para semillas, y también formulaciones de neblina en frío y neblina en caliente de VUB.

10 En algunas realizaciones, las composiciones de la invención son formulaciones líquidas. Los ejemplos de formulaciones líquidas incluyen concentraciones en suspensión y dispersiones oleosas. En otras realizaciones, las composiciones de la invención son formulaciones sólidas. Los ejemplos de formulaciones líquidas incluyen polvos liofilizados y polvos secados por pulverización.

15 Las composiciones de la presente invención pueden incluir inertes de formulación que se añaden a las composiciones que comprenden células, preparaciones sin células o metabolitos para mejorar la eficacia, la estabilidad y utilidad y/o para facilitar el procesamiento, el envasado y la aplicación de uso final. Dichos inertes o ingredientes de formulación pueden incluir vehículos, agentes de estabilización, nutrientes o agentes modificadores de las propiedades físicas, que se pueden añadir individualmente o combinados. En algunas realizaciones, los vehículos pueden incluir materiales líquidos tales como agua, aceite y otros disolventes orgánicos o inorgánicos y materiales sólidos tales como minerales, polímeros o complejos poliméricos obtenidos biológicamente o mediante síntesis química. En algunas realizaciones, el vehículo es un aglutinante o un adhesivo que facilita la adherencia de la composición a una parte de planta, tal como una semilla o raíz. Véase, por ejemplo, Taylor, A.G., y col., "Concepts and Technologies of Selected Seed Treatments", *Annu. Rev. Phytopathol.*, 28: 321-339 (1990). Los agentes de estabilización pueden incluir agentes antiapelmazantes, agentes antioxidantes, secantes, protectores o conservantes. Los nutrientes pueden incluir fuentes de carbono, nitrógeno y fósforo, tales como azúcares, polisacáridos, aceite, proteínas, aminoácidos, ácidos grasos y fosfatos. Los modificadores de las propiedades físicas pueden incluir agentes formadores de volumen, agentes humectantes, espesantes, modificadores del pH, modificadores de la reología, dispersantes, adyuvantes, tensioactivos, agentes anticongelantes o colorantes. En algunas realizaciones, la composición que comprende células, una preparación sin células o los metabolitos producidos por fermentación se pueden utilizar directamente con o sin agua como diluyente, sin ninguna otra preparación de formulación. En algunas realizaciones, los inertes de formulación se añaden después de concentrar el caldo de fermentación y durante y/o después del secado.

30 Todas las plantas y partes de planta pueden tratarse en conformidad con la invención. En el presente contexto, se entiende que plantas significa todas las plantas y poblaciones vegetales, tales como plantas silvestres deseadas e indeseadas, o plantas de cultivo (incluyendo plantas de cultivo de origen natural). Las plantas de cultivo pueden ser plantas que se pueden obtener mediante mejora genética y procedimientos de optimización tradicionales o mediante procedimientos biotecnológicos y recombinantes o mediante combinaciones de estos procedimientos, incluyendo las plantas transgénicas e incluyendo las variedades vegetales que pueden estar protegidas, o no, por Derechos de Obtentores. Se entiende que partes de planta significa todas las partes y los órganos aéreos y subterráneos de las plantas, tales como brotes, hojas, flores y raíces, y como ejemplos se pueden mencionar hojas, agujas, tronco, tallos, flores, cuerpos de fructificación, frutos y semillas, y también raíces, tubérculos y rizomas. Las partes de planta también incluyen material de cultivo y material de propagación vegetativa y generativa, por ejemplo, estacas, tubérculos, rizomas, esquejes y semillas.

40 Como ya se mencionó anteriormente, es posible tratar todas las plantas y sus partes en conformidad con la invención. En una realización preferida, se tratan especies de plantas y variedades vegetales, y sus partes, que crecen de manera silvestre o que se obtienen mediante procedimientos biológicos de mejora genética tradicionales, tales como hibridación o fusión de protoplastos. En una realización preferida adicional, se tratan plantas transgénicas y variedades vegetales que se obtuvieron mediante procedimientos recombinantes, si fuera apropiado en combinación con procedimientos tradicionales (organismos modificados genéticamente) y sus partes. El término "partes" o la expresión "partes de planta" ya se explicaron anteriormente. Las plantas de las variedades vegetales que en cada caso están comercialmente disponibles o en uso se tratan en especial preferentemente en conformidad con la invención. Se entiende que variedades vegetales significa las plantas con rasgos novedosos que se obtuvieron mediante mejora genética tradicional, mediante mutagénesis o mediante técnicas de ADN recombinante. Pueden tomar la forma de variedades, razas, biotipos y genotipos.

50 El tratamiento de las plantas y partes de planta con las composiciones de acuerdo con la invención se lleva a cabo directamente o mediante acción sobre el entorno, hábitat o espacio de almacenamiento utilizando procedimientos de tratamiento habituales, por ejemplo mediante inmersión, pulverización, atomización, nebulización, evaporación, espolvoreado, formación de niebla, dispersión, formación de espuma, pintura, extensión, inyección, empapando, irrigación por goteo y, en el caso de material de propagación, en particular en el caso de semillas, además mediante el procedimiento de tratamiento de semillas en seco, el procedimiento de tratamiento de semillas húmedo, el procedimiento de tratamiento con suspensión, mediante incrustación, mediante recubrimiento con uno o más recubrimientos y similares. Adicionalmente, es posible aplicar las sustancias activas mediante el procedimiento de volumen ultrabajo o inyectar la preparación de sustancia activa o la propia sustancia activa en el suelo.

60 Un tratamiento directo preferido de las plantas es el tratamiento de aplicación foliar, es decir, las composiciones de acuerdo con la invención se aplican al follaje, pudiéndose corresponder la frecuencia de tratamiento y el índice de aplicación con la presión de infección del patógeno en cuestión.

- En el caso de compuestos activos de forma sistémica, las composiciones de acuerdo con la invención alcanzan a las plantas a través del sistema radicular. En este caso, el tratamiento de las plantas se efectúa permitiendo que las composiciones de acuerdo con la invención actúen sobre el entorno de la planta. Esto se puede realizar, por ejemplo, mediante empapamiento, por incorporación en el suelo o en la solución de nutrientes, es decir, la ubicación de la planta (por ejemplo, el suelo o sistemas hidropónicos) se impregna con una forma líquida de las composiciones de acuerdo con la invención, o mediante aplicación al suelo, es decir, las composiciones de acuerdo con la invención se incorporan en la ubicación de las plantas en una forma sólida (por ejemplo, en la forma de gránulos). En el caso de los cultivos en arrozales, esto también se puede realizar dosificando las composiciones de acuerdo con la invención en un arrozal inundado en una forma de uso sólida (por ejemplo, en la forma de gránulos).
- Las plantas preferidas son las del grupo de las plantas útiles, ornamentales, céspedes, los árboles de uso general que se emplean como ornamentales en los sectores públicos y domésticos, y los árboles de silvicultura. Los árboles de silvicultura comprenden árboles para la obtención de madera, celulosa, papel y productos fabricados a partir de partes de los árboles.
- La expresión "plantas útiles", como se usa en el presente contexto, se refiere a las plantas de cultivo que se emplean como plantas para obtener productos alimenticios, piensos, combustibles o con fines industriales.
- Las plantas útiles que se pueden tratar y/o mejorar con las composiciones y los procedimientos de la presente invención incluyen, por ejemplo, los siguientes tipos de plantas: céspedes, vides, cereales, por ejemplo, trigo, cebada, centeno, avena, arroz, maíz y mijo/sorgo; remolachas, por ejemplo, remolacha azucarera y forrajera; frutas, por ejemplo, frutas de pepitas, fruta con hueso y frutos blandos, por ejemplo, manzanas, peras, ciruelas, melocotones, almendras, cerezas y bayas, por ejemplo fresas, frambuesas, moras; legumbres, por ejemplo, habas, lentejas, guisantes y soja; cultivos de oleaginosas, por ejemplo, colza de semillas oleaginosas, mostaza, amapolas, olivas, girasoles, cocos, plantas de aceite de ricino, cacao y cacahuetes; cucurbitáceas, por ejemplo calabaza/calabacín, pepinos y melones; plantas fibrosas, por ejemplo, algodón, lino, cáñamo y yute; cítricos, por ejemplo, naranjas, limones, pomelos y mandarinas; hortalizas, por ejemplo, espinacas, lechuga, espárragos, especies de coles, zanahorias, cebollas, tomates, patatas y pimientos; lauráceas, por ejemplo, palta, canela, alcanfor u otras plantas tales como tabaco, frutos secos, café, berenjena, caña de azúcar, té, pimienta, vid, lúpulo, bananas, plantas de látex y ornamentales, por ejemplo, flores, arbustos, árboles de hoja caduca y árboles de coníferas.
- Se considera que las siguientes plantas son cultivos objetivo particularmente adecuados para aplicar las composiciones y los procedimientos de la presente invención: algodón, berenjena, césped, frutas de pepitas, frutos con hueso, frutos rojos, maíz, trigo, cebada, pepino, tabaco, vides, arroz, cereales, pera, habas, soja, colza de semillas oleaginosas, tomate, pimiento, melones, col, patata y manzana.
- Los ejemplos de árboles que se pueden mejorar en conformidad con el procedimiento de acuerdo con la invención son: *Abies* sp., *Eucalyptus* sp., *Picea* sp., *Pinus* sp., *Aesculus* sp., *Platanus* sp., *Tilia* sp., *Acer* sp., *Tsuga* sp., *Fraxinus* sp., *Sorbus* sp., *Betula* sp., *Crataegus* sp., *Ulmus* sp., *Quercus* sp., *Fagus* sp., *Salix* sp., *Populus* sp.
- Los árboles preferidos que se pueden mejorar en conformidad con el procedimiento de acuerdo con la invención son: de especies de árboles de *Aesculus*: *A. hippocastanum*, *A. pariflora*, *A. carnea*; de especies de árboles de *Platanus*: *P. aceriflora*, *P. occidentalis*, *P. racemosa*; de especies de árboles de *Picea*: *P. abies*; de especies de árboles de *Pinus*: *P. radiata*, *P. ponderosa*, *P. contorta*, *P. sylvestre*, *P. elliotii*, *P. montecola*, *P. albicaulis*, *P. resinosa*, *P. palustris*, *P. taeda*, *P. flexilis*, *P. jeffreyi*, *P. baksiana*, *P. strobus*; de especies de árboles de *Eucalyptus*: *E. grandis*, *E. globulus*, *E. camadentis*, *E. nitens*, *E. obliqua*, *E. regnans*, *E. pilularis*.
- Los árboles especialmente preferidos que se pueden mejorar en conformidad con el procedimiento de acuerdo con la invención son: de especies de árboles de *Pinus*: *P. radiata*, *P. ponderosa*, *P. contorta*, *P. sylvestre*, *P. strobus*; de especies de árboles de *Eucalyptus*: *E. grandis*, *E. globulus*, *E. camadentis*.
- Los árboles muy particularmente preferidos que se pueden mejorar en conformidad con el procedimiento de acuerdo con la invención son: los árboles de castaño de indias, de *Platanaceae*, tilo, arce.
- La presente invención también se puede aplicar a cualquier tipo de gramíneas cespitosas, incluyendo gramíneas cespitosas de invierno y gramíneas cespitosas de verano. Los ejemplos de gramíneas cespitosas de invierno son las poas (*bluegrasses*) (*Poa* spp.), tal como el pasto azul de Kentucky (*Poa pratensis* L.), gramilla (*Poa trivialis* L.), pasto azul de Canadá (*Poa compressa* L.), pasto azul anual (*Poa annua* L.), pasto azul de tierras altas (*Poa glaucantha* Gaudin), pasto azul leñoso (*Poa nemoralis* L.) y pasto azul bulboso (*Poa bulbosa* L.); agróstidas (*Agrostis* spp.) tales como grama rastrera (*Agrostis palustris* Huds.), grama colonial (*Agrostis tenuis* Sibth.), grama aterciopelada (*Agrostis canina* L.), grama mixta de Alemania del Sur (*Agrostis* spp. incluyendo *Agrostis tenuis* Sibth., *Agrostis canina* L. y *Agrostis palustris* Huds.) y grama mayor (*Agrostis alba* L.); festucas (*Festuca* spp.), tal como festuca roja (*Festuca rubra* L. spp. *rubra*), festuca rastrera (*Festuca rubra* L.), festuca encarnada (*Festuca rubra commutata* Gaud.), pan de corderos (*Festuca ovina* L.), festuca dura (*Festuca longifolia* Thuill.), festuca pilosa (*Festuca capillata* Lam.), festuca alta (*Festuca arundinacea* Schreb.) y festuca de los prados (*Festuca elanor* L.); pastos centeno (*Lolium* spp.), tal como el pasto centeno anual (*Lolium multiflorum* Lam.), el pasto centeno perenne



- por *Sclerotium oryzae*; especies de *Tapesia*, por ejemplo, *Tapesia acuformis*; especies de *Thielaviopsis*, por ejemplo, *Thielaviopsis basicola*;
- enfermedades de mazorcas y panojas (incluyendo, mazorcas de maíz) provocadas, por ejemplo, por especies de *Alternaria*, por ejemplo, *Alternaria* spp.; especies de *Aspergillus*, por ejemplo, *Aspergillus flavus*; especies de *Cladosporium*, por ejemplo, *Cladosporium cladosporioides*; especies de *Claviceps*, por ejemplo, *Claviceps purpurea*; especies de *Fusarium*, por ejemplo, *Fusarium culmorum*; especies de *Gibberella*, por ejemplo, *Gibberella zeae*; especies de *Monographella*, por ejemplo, *Monographella nivalis*; especies de *Septoria*, por ejemplo, *Septoria nodorum*;
- enfermedades provocadas por hongos del tizón, por ejemplo, especies de *Sphacelotheca*, por ejemplo, *Sphacelotheca reiliana*; especies de *Tilletia*, por ejemplo, *Tilletia caries*, *T. controversa*; especies de *Urocystis*, por ejemplo, *Urocystis occulta*; especies de *Ustilago*, por ejemplo, *Ustilago nuda*, *U. nuda tritici*;
- podredumbre de los frutos provocada, por ejemplo, por especies de *Aspergillus*, por ejemplo, *Aspergillus flavus*; especies de *Botrytis*, por ejemplo, *Botrytis cinerea*; especies de *Penicillium*, por ejemplo, *Penicillium expansum* y *P. purpurogenum*; especies de *Sclerotinia*, por ejemplo, *Sclerotinia sclerotiorum*; especies de *Verticillium*, por ejemplo, *Verticillium alboatrum*;
- enfermedades de semillas y descomposición en la tierra, moho, marchitamiento, podredumbre y mal de los semilleros provocadas, por ejemplo, por especies de *Alternaria*, provocadas por ejemplo, por *Alternaria brassicicola*; especies de *Aphanomyces*, provocadas por ejemplo, por *Aphanomyces euteiches*; especies de *Ascochyta*, provocadas por ejemplo, por *Ascochyta lentis*; especies de *Aspergillus*, provocadas por ejemplo, por *Aspergillus flavus*; especies de *Cladosporium*, provocadas por ejemplo, por *Cladosporium herbarum*; especies de *Cochliobolus*, provocadas por ejemplo, por *Cochliobolus sativus*; (Conidioformes: *Drechslera*, *Bipolaris* Sin: *Helminthosporium*); especies de *Colletotrichum*, provocadas por ejemplo, por *Colletotrichum coccodes*; especies de *Fusarium*, provocadas por ejemplo, por *Fusarium culmorum*; especies de *Gibberella*, provocadas por ejemplo, por *Gibberella zeae*; especies de *Macrophomina*, provocadas por ejemplo, por *Macrophomina phaseolina*; especies de *Monographella*, provocadas por ejemplo, por *Monographella nivalis*; especies de *Penicillium*, provocadas por ejemplo, por *Penicillium expansum*; especies de *Phoma*, provocadas por ejemplo, por *Phoma lingam*; especies de *Phomopsis*, provocadas por ejemplo, por *Phomopsis sojae*; especies de *Phytophthora*, provocadas por ejemplo, por *Phytophthora cactorum*; especies de *Pyrenophora*, provocadas por ejemplo, por *Pyrenophora graminea*; especies de *Pyricularia*, provocadas por ejemplo, por *Pyricularia oryzae*; especies de *Pythium*, provocadas por ejemplo, por *Pythium ultimum*; especies de *Rhizoctonia*, provocadas por ejemplo, por *Rhizoctonia solani*; especies de *Rhizopus*, provocadas por ejemplo, por *Rhizopus oryzae*; especies de *Sclerotium*, provocadas por ejemplo, por *Sclerotium rolfsii*; especies de *Septoria*, provocadas por ejemplo, por *Septoria nodorum*; especies de *Typhula*, provocadas por ejemplo, por *Typhula incarnata*; especies de *Verticillium*, provocadas por ejemplo, por *Verticillium dahliae*;
- cánceres, agallas y escobas de bruja provocados, por ejemplo, por especies de *Nectria*, por ejemplo, *Nectria galligena*;
- enfermedades de marchitamiento provocadas, por ejemplo, por especies de *Monilinia*, por ejemplo, *Monilinia laxa*;
- enfermedades de ampollas foliares o de enrollamiento foliar provocadas, por ejemplo, por especies de *Exobasidium*, por ejemplo, *Exobasidium vexans*;
- especies de *Taphrina*, por ejemplo, *Taphrina deformans*;
- enfermedades de descomposición de las plantas leñosas provocadas, por ejemplo, por la enfermedad de Esca, provocada, por ejemplo, por *Phaemoniella clamydospora*, *Phaeoacremonium aleophilum* y *Fomitiporia mediterranea*; Eutipiosis por *Eutypa*, provocada por ejemplo, por *Eutypa lata*; enfermedades provocadas por *Ganoderma*, por ejemplo, por *Ganoderma boninense*; enfermedades provocadas por *Rigidoporus*, por ejemplo, por *Rigidoporus lignosus*;
- enfermedades de flores y semillas provocadas, por ejemplo, por especies de *Botrytis*, por ejemplo, *Botrytis cinerea*;
- enfermedades de los tubérculos de plantas provocadas, por ejemplo, por especies de *Rhizoctonia*, por ejemplo, *Rhizoctonia solani*; especies de *Helminthosporium*, por ejemplo, *Helminthosporium solani*;
- hernia de la col provocada, por ejemplo, por especies de *Plasmidiophora*, por ejemplo, *Plasmidiophora brassicae*;
- enfermedades provocadas por patógenos bacterianos, por ejemplo, especies de *Xanthomonas*, por ejemplo, *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae*; especies de *Pseudomonas*, por ejemplo, *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*; especies de *Erwinia*, por ejemplo, *Erwinia amylovora*.

Con preferencia se pueden controlar las siguientes enfermedades de la soja:

- Enfermedades fúngicas sobre hojas, tallos, vainas y semillas provocadas, por ejemplo, por mancha foliar de *Alternaria* (*Alternaria* espec. *atrans tenuissima*), antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides dematium* var. *truncatum*), mancha marrón (*Septoria glycines*), mancha foliar y tizón de *Cercospora* (*Cercospora kikuchii*), tizón de las hojas por *Choanephora* (*Choanephora infundibulifera trispora* (Sin.)), mancha foliar por *Dactuliophora* (*Dactuliophora glycines*), mildiú lanoso (*Peronospora manshurica*), tizón por *Drechslera* (*Drechslera glycini*), mancha foliar ojo de rana (*Cercospora sojina*), mancha foliar por *Leptosphaerulina* (*Leptosphaerulina trifolii*), mancha foliar por *Phyllosticta* (*Phyllosticta sojaecola*), tizón de vainas y tallos (*Phomopsis sojae*), mildiú pulverulento (*Microsphaera diffusa*), mancha foliar por *Pyrenochaeta* (*Pyrenochaeta glycines*), tizón aéreo, del follaje y de telaraña por *Rhizoctonia* (*Rhizoctonia solani*), roya (*Phakopsora pachyrhizi*, *Phakopsora meibomia*), sarna de soja (*Sphaceloma glycines*), tizón de las hojas por *Stemphylium* (*Stemphylium botryosum*), mancha anillada (*Corynespora cassiicola*).

Enfermedades fúngicas en las raíces y la base del tallo provocadas, por ejemplo, por podredumbre radicular negra (*Calonectria crotalariae*), podredumbre carbonosa (*Macrophomina phaseolina*), tizón o marchitamiento, podredumbre

radicular, y podredumbre de vaina y collar por *Fusarium* (*Fusarium oxysporum*, *Fusarium orthoceras*, *Fusarium semitectum*, *Fusarium equiseti*), podredumbre radicular por *Mycleptodiscus* (*Mycleptodiscus terrestris*), neocosmospora (*Neocosmospora vasinfecta*), tizón de vainas y tallos (*Diaporthe phaseolorum*), cancro del tallo (*Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora*), podredumbre de *Phytophthora* (*Phytophthora megasperma*), podredumbre de tallo marrón (*Phialophora gregata*), podredumbre por *Pythium* (*Pythium aphanidermatum*, *Pythium irregulare*, *Pythium debaryanum*, *Pythium myriotylum*, *Pythium ultimum*), podredumbre radicular, descomposición de tallos y mal de los semilleros por *Rhizoctonia* (*Rhizoctonia solani*), descomposición de los tallos por *Sclerotinia* (*Sclerotinia sclerotiorum*), tizón del sur por *Sclerotinia* (*Sclerotinia rolfsii*), podredumbre radicular por *Thielaviopsis* (*Thielaviopsis basicola*).

Las composiciones fungicidas de la invención se pueden utilizar para el control curativo o protector/preventivo de hongos fitopatógenos. Por lo tanto, la invención también se refiere a procedimientos curativos y protectores para el control de hongos fitopatógenos mediante el uso de las composiciones de la invención, que se aplican a las semillas, la planta o parte de planta, los frutos o el suelo en el cual crecen las plantas.

El hecho que las composiciones sean bien toleradas por las plantas a las concentraciones necesarias para el control de enfermedades en plantas permite el tratamiento de las partes aéreas de las plantas, de las reservas de propagación y de semillas, y del suelo.

De acuerdo con la invención, se pueden tratar todas las plantas y las partes de planta, incluyendo cultivares y variedades vegetales (ya sea si pueden protegerse o no por los derechos de obtentor de plantas o de variedades vegetales). Los cultivares y las variedades de plantas pueden ser plantas obtenidas mediante procedimientos de propagación y mejora genética convencionales que pueden estar asistidos o complementados por uno o más procedimientos biotecnológicos, tal como mediante el uso de haploides dobles, fusión de protoplastos, mutagénesis aleatoria y dirigida, marcadores moleculares o genéticos, o mediante procedimientos de bioingeniería o de ingeniería genética.

En determinados aspectos, las composiciones de la presente invención se aplican a entre aproximadamente  $1 \times 10^8$  y aproximadamente  $1 \times 10^{14}$  unidades formadoras de colonias (UFC) de la cepa fungicida NRRL B-50972 de *Paenibacillus* sp. o una cepa mutante fungicida de la misma, por hectárea. En otros aspectos, las composiciones de la presente invención se aplican a entre aproximadamente  $1 \times 10^9$  y aproximadamente  $1 \times 10^{13}$  unidades formadoras de colonias (UFC) de la cepa fungicida NRRL B-50972 de *Paenibacillus* sp. o una cepa mutante fungicida de la misma, por hectárea. En aún otros aspectos, las composiciones de la presente invención se aplican a entre aproximadamente  $1 \times 10^{10}$  y aproximadamente  $1 \times 10^{12}$  unidades formadoras de colonias (UFC) de la cepa fungicida NRRL B-50972 de *Paenibacillus* sp. o una cepa mutante fungicida de la misma, por hectárea.

En algunas realizaciones, las composiciones de la presente invención se aplican a entre aproximadamente 0,1 kg y aproximadamente 10 kg de sólidos de fermentación por hectárea. En otras realizaciones, las composiciones de la presente invención se aplican a entre aproximadamente 0,25 kg y aproximadamente 7,5 kg de sólidos de fermentación por hectárea. En aún otras realizaciones, las composiciones de la presente invención se aplican a entre aproximadamente 0,5 kg y aproximadamente 5 kg de sólidos de fermentación por hectárea. Las composiciones de la presente invención también se pueden aplicar a aproximadamente 1 kg o aproximadamente 2 kg de sólidos de fermentación por hectárea.

Las composiciones de la invención, cuando las plantas las toleran bien, tienen una toxicidad homeoterma favorable y el entorno las tolera bien, son adecuadas para la protección vegetal y de órganos vegetales, para potenciar los rendimientos de cosecha, para mejorar la calidad del material cosechado. Preferentemente, se pueden utilizar como composiciones de protección de cultivos. Son activas contra las especies normalmente sensibles y resistentes y contra todas o algunas fases del desarrollo.

Las plantas que pueden tratarse en conformidad con la invención incluyen las siguientes plantas de cultivo importantes: maíz, soja, alfalfa, algodón, girasol, semillas oleaginosas de *Brassica* tales como *Brassica napus* (por ejemplo, canola, colza), *Brassica rapa*, *B. juncea* (por ejemplo mostaza (de campo)) y *Brassica carinata*, *Arecaceae* sp. (por ejemplo, palma oleaginosa, coco), arroz, trigo, remolacha azucarera, caña de azúcar, avena, centeno, cebada, mijo y sorgo, triticale, lino, frutos secos, uvas y vides, y diversos frutos y hortalizas de diversos taxones botánicos, por ejemplo *Rosaceae* sp. (por ejemplo, frutos de pepitas tales como manzanas y peras, pero también frutos con hueso tales como albaricoques, cerezas, almendras, ciruelas y melocotones, y bayas tales como fresas, frambuesas, grosellas rojas y negras y grosella espinosa), *Ribesioideae* sp., *Juglandaceae* sp., *Betulaceae* sp., *Anacardiaceae* sp., *Fagaceae* sp., *Moraceae* sp., *Oleaceae* sp. (por ejemplo, olivo), *Actinidaceae* sp., *Lauraceae* sp. (por ejemplo, aguacate, canela, alcanfor), *Musaceae* sp. (por ejemplo, árboles y plantaciones de bananos), *Rubiaceae* sp. (por ejemplo, café), *Theaceae* sp. (por ejemplo, té), *Sterculiaceae* sp., *Rutaceae* sp. (por ejemplo, limones, naranjas, mandarinas y pomelos); *Solanaceae* sp. (por ejemplo, tomates, patatas, pimientos, pimiento morrón, berenjenas, tabaco), *Liliaceae* sp., *Compositae* sp. (por ejemplo, lechuga, alcachofas y achicoria – incluyendo raíz de achicoria, endivias o achicoria común), *Umbelliferae* sp. (por ejemplo, zanahorias, perejil, apio y raíz de apio), *Cucurbitaceae* sp. (por ejemplo, pepinos – incluyendo pepinillos, zapallos, sandías, calabazas y melones), *Alliaceae* sp. (por ejemplo, puerros y cebollas), *Cruciferae* sp. (por ejemplo, col blanca, col roja, brócoli, coliflor, coles de Bruselas, *pak choi*, col kohlrabi, rábanos, rábano picante, berro y col china), *Leguminosae* sp. (por ejemplo, cacahuete, guisantes, lentejas y habas – por ejemplo habas comunes y haba de mayo), *Chenopodiaceae* sp. (por ejemplo, cardo suizo, remolacha forrajera, espinaca, remolacha), *Linaceae* sp. (por ejemplo, cáñamo), *Cannabaceae* sp. (por ejemplo, cáñabis), *Malvaceae* sp. (por

ejemplo, quingombó, cacao), *Papaveraceae* (por ejemplo, amapola), *Asparagaceae* (por ejemplo, espárrago); plantas útiles y plantas ornamentales de jardín y bosques incluyendo grama, césped, pasto y *Stevia rebaudiana*; y en cada caso los tipos modificados genéticamente de estas plantas.

5 En determinados aspectos, el producto de fermentación comprende además un ingrediente de formulación. El ingrediente de formulación puede ser un agente humectante, un expansor, un disolvente, un promotor instantáneo, un emulsionante, un dispersante, un crioprotector, un espesante y/o un adyuvante. En una realización, el ingrediente de formulación es un agente humectante. En otros aspectos, el producto de fermentación es un polvo secado por liofilización o un polvo secado por pulverización.

10 Las composiciones de la presente invención pueden incluir ingredientes de formulación añadidos a las composiciones de la presente invención para mejorar la recuperación, la eficacia o las propiedades físicas y/o para ayudar en el procesamiento, el envasado y la administración. Dichos ingredientes de formulación se pueden añadir individualmente o combinados.

15 Los ingredientes de formulación se pueden añadir a composiciones que comprenden células, a preparaciones sin células, a compuestos aislados y/o a metabolitos para mejorar la eficacia, la estabilidad y las propiedades físicas, la utilidad y/o para facilitar el procesamiento, el envasado y la aplicación de uso final. Dichos ingredientes de formulación pueden incluir vehículos, agentes inertes, de estabilización, conservantes, nutrientes o agentes modificadores de las propiedades físicas agrónomicamente aceptables, que se pueden añadir individualmente o combinados. En algunas realizaciones, los vehículos pueden incluir materiales líquidos tales como agua, aceite y otros disolventes orgánicos o inorgánicos y materiales sólidos tales como minerales, polímeros o complejos poliméricos obtenidos biológicamente o mediante síntesis química. En algunas realizaciones, el ingrediente de formulación es un aglutinante, un adyuvante o un adhesivo que facilita la adherencia de la composición a una parte de planta, tal como hojas, semillas o raíces. Véase, por ejemplo, Taylor, A.G., y col., "Concepts and Technologies of Selected Seed Treatments", *Annu. Rev. Phytopathol.*, 28: 321-339 (1990). Los agentes de estabilización pueden incluir agentes antiaglomerantes, agentes antioxidantes, agentes antisedimentación, agentes antiespumantes, secantes, protectores o conservantes. Los nutrientes pueden incluir fuentes de carbono, nitrógeno y fósforo, tales como azúcares, polisacáridos, aceite, proteínas, aminoácidos, ácidos grasos y fosfatos. Los modificadores de las propiedades físicas pueden incluir agentes formadores de volumen, agentes humectantes, espesantes, modificadores del pH, modificadores de la reología, dispersantes, adyuvantes, tensioactivos, formadores de películas, hidrótopos, aditivos, agentes anticongelantes o colorantes. En algunas realizaciones, la composición que comprende células, la preparación sin células y/o los metabolitos producidos por fermentación se pueden utilizar directamente con o sin agua como diluyente, sin ninguna otra preparación de formulación. En una realización particular, se añade un agente humectante o un dispersante un sólido de fermentación, tal como un polvo liofilizado o secado por pulverización. El agente humectante aumenta las propiedades de dispersión y de penetración, o el dispersante aumenta la dispersabilidad y la solubilidad del principio activo (una vez diluido) cuando se aplica a superficies. Los agentes humectantes ejemplares son conocidos para los expertos en la materia e incluyen sulfosuccinatos y derivados, tal como MULTIWET™ MO-70R (Croda Inc., Edison, NJ); siloxanos tal como BREAK-THRU® (Evonik, Alemania); compuestos no iónicos, tal como ATLOX™ 4894 (Croda Inc., Edison, NJ); alquilpoliglucósidos, tal como TERWET® 3001 (Huntsman International LLC, The Woodlands, Texas); etoxilato de alcohol C12-C14, tal como TERGITOL® 15-S-15 (The Dow Chemical Company, Midland, Michigan); ésteres de fosfato, tal como RHODAFAC® BG-510 (Rhodia, Inc.) y carboxilatos de alquiléter, tal como EMULSOGEN™ LS (Clariant Corporation, Carolina del Norte).

35

40

## INFORMACIÓN DE DEPÓSITOS

Se ha depositado una muestra de una cepa de *Paenibacillus* sp. de la invención en la Agricultural Research Service Culture Collection del National Center for Agricultural Utilization Research, Agricultural Research Service, U.S. Department of Agriculture (NRRL), 1815 North University Street, Peoria, IL 61604, EE.UU., en virtud del Tratado de Budapest, el 28 de agosto de 2014, y se le asignó el siguiente número de referencia: NRRL B-50972.

45

Se ha depositado una muestra de la cepa de *Paenibacillus* sp. obtenida de la cepa NRRL B-50972 de *Paenibacillus* sp. que demuestra una morfología de colonias estable en la Agricultural Research Service Culture Collection del National Center for Agricultural Utilization Research, Agricultural Research Service, U.S. Department of Agriculture (NRRL), 1815 North University Street, Peoria, IL 61604, EE.UU., en virtud del Tratado de Budapest el 1 de septiembre de 2015 y se le asignó el siguiente número de referencia: NRRL B-67129.

50

Las cepas de *Paenibacillus* sp. se depositaron en condiciones que aseguran que el acceso al cultivo estará disponible durante la tramitación de la presente Solicitud de Patente para las personas que el Comisionado de Patentes y Marcas determine con derecho a ellos en virtud de 37 C.F.R. §1.14 y 35 U.S.C. §122. Sin embargo, se comprenderá que la disponibilidad de un depósito no constituye una licencia para practicar la invención objeto, anulando derechos de patente otorgados por acción gubernamental.

55

Los siguientes ejemplos solamente se ofrecen a efectos puramente ilustrativos y fines de la presente invención.

## Ejemplos

### Ejemplo 1. Selección de NRRL B-50972 de *Paenibacillus* sp.

Se secuenciaron los genomas de varias cepas de *Paenibacillus* sp. Este dato genómico se analizó a fin de identificar cepas con la agrupación de genes de biosíntesis de la fusaricidina pero que no carecen de la agrupación de genes de la polimixina sintasa. Se ha identificado y caracterizado la agrupación de genes responsable de la biosíntesis de fusaricidina (*fusA*) con anterioridad así como se había hecho con la agrupación de genes de la polimixina sintasa. Véase, por ejemplo, Li y col., "Nonribosomal Biosynthesis of Fusaricidins by *Paenibacillus polymyxa* PKB1 Involves Direct Activation of a D-Amino Acid", *Chemistry & Biology*, 15: 118-127 (2008); Li y col., "Promoter Analysis and Transcription Regulation of *fus* Gene Cluster Responsible for Fusaricidin Synthesis of *Paenibacillus polymyxa* SQR-21", *Applied Microbiol Biotechnol*, 97: 9479-9489 (2013); y Choi y col., "Identification of a Polymyxin Synthetase Gene Cluster of *Paenibacillus polymyxa* and Heterologous Expression of the Gene in *Bacillus subtilis*", *Journal of Bacteriology*, 191(10): 3350-3358 (2009).

Las cepas identificadas con este análisis se evaluaron además para confirmar la producción de fusaricidina. Brevemente, cada cepa se cultivó en un medio basado en soja y se extrajo la fracción lipófila del caldo completo. El extracto de caldo completo se analizó mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) y la presencia de la fusaricidina A se identificó basándose en el perfil de HPLC generado con una muestra patrón que contenía fusaricidina A.

#### **Ejemplo 2. Actividad antifúngica in planta de caldos completos de las cepas de *Paenibacillus* sp.**

Se cultivaron cepas seleccionadas de *Paenibacillus* sp., incluyendo la cepa NRRL B-50972 de *Paenibacillus* sp., en un medio basado en soja para producir cultivos en caldo completo. Se añadió agua destilada a cada uno de los caldos completos para obtener una dilución final del 10 %.

Los caldos completos diluidos se aplicaron a las hojas de plantas jóvenes que luego se expusieron a un inóculo fúngico del tizón tardío de tomate (PHYTIN), moho gris (BOTRCI) o roya de la hoja de trigo (PUCCRT). En cada ensayo se incluyó un control no tratado a efectos comparativos. Varios días después de la exposición a los inóculos fúngicos, se puntuó cada planta en cuanto al porcentaje de control del patógeno con respecto a las plantas de control no tratadas. Cada tratamiento se evaluó con tres repeticiones y el porcentaje de control promedio con cada caldo completo de una cepa de *Paenibacillus* sp. se muestra en la **FIG. 1**.

De las 23 cepas analizadas en cuanto a su actividad antifúngica contra PHYTIN, BOTRCI y PUCCRT, la cepa NRRL B-50972 de *Paenibacillus* sp. era una de las pocas cepas que tenía un nivel de actividad relativamente alto contra los tres patógenos fúngicos.

#### **Ejemplo 3. Eficacia biológica in vitro del extracto de fusaricidina de la cepa NRRL B-50972 de *Paenibacillus* sp.**

Se prepararon cultivos de caldo completo de varias cepas de *Paenibacillus* sp., incluyendo NRRL B-50972 de *Paenibacillus* sp., utilizando un medio basado en soja. Se extrajeron de los caldos completos las fracciones lipófilas que contenían fusaricidinas. Se hicieron tres fracciones separadas que contenían diversas fusaricidinas y metabolitos antifúngicos a partir del extracto de caldo completo de la primera cepa de *Paenibacillus* sp. (es decir, la Fracción 1, la Fracción 2 y la Fracción 3). El extracto de la cepa NRRL B-50972 de *Paenibacillus* sp. no se separó adicionalmente.

Las fracciones que contienen fusaricidina de cada cepa se analizaron contra los siguientes doce patógenos fúngicos: *Alternaria alternata* (ALTEAL), *Botrytis cinerea* (BOTRCI), *Fusarium culmorum* (FUSACU), *Phaeosphaeria nodorum* (LEPTNO), *Zymoseptoria tritici* (SEPPTR), *Phytophthora cryptogea* (PHYTCR), *Phytophthora infestans* (PHYTIN), *Pythium ultimum* (PYTHUL), *Magnaporthe oryzae* (PYRIOR), *Thanatephorus cucumeris* (RHIZSO), *Ustilago segetum* var. *avenae* (USTIAV) y *Uromyces appendiculatus* (UROMAP). Se evaluó la inhibición del crecimiento de las células fúngicas por las diferentes fracciones en un medio basado en soja y se comparó con el crecimiento de los controles no tratados. Se analizaron ocho dosis de cada fracción, que variaban de entre 0,005 ppm y 100 ppm. Las dosis eficaces que producían un 50 % de inhibición (DE<sub>50</sub>) y un 80 % de inhibición (DE<sub>80</sub>) se informan en la tabla de la **FIG. 2**.

La fracción que contiene fusaricidina de la cepa NRRL B-50972 de *Paenibacillus* sp. mostraba una actividad antifúngica de amplio espectro en los doce ensayos que no se observó con las fracciones de la otra cepa de *Paenibacillus* sp. La fracción de la cepa NRRL B-50972 de *Paenibacillus* sp. también mostró una actividad mucho mayor en los ensayos que la observada con las fracciones de la otra cepa de *Paenibacillus* sp. (véase la **FIG. 2**).

#### **Ejemplo 4. Prueba preventiva in vivo en tomates infectados con *Phytophthora***

En este ensayo en invernadero con patógenos de plantas, se analizó el producto de fermentación de la cepa NRRL B-50972 de *Paenibacillus* sp. en comparación con otras tres cepas de *Paenibacillus* sp. que habían demostrado una actividad antifúngica relativamente alta en ensayos de cribado anteriores. Para producir una preparación adecuada de los compuestos, se mezcló 1 parte en peso del polvo de caldo completo seco por pulverización de cada cepa cultivada en un medio basado en soja con agua y 0,1 partes en peso de emulsionante (alquilaril poliglicol éter) y posteriormente se diluyó con agua hasta la concentración deseada.

Para probar la actividad preventiva, se pulverizaron plantas jóvenes con la preparación del compuesto al índice de aplicación establecido. Después que se secura el recubrimiento de pulverizado, las plantas se inocularon con una

suspensión acuosa de esporas de *Phytophthora infestans*. Las plantas se colocaron luego en una cabina de incubación a aproximadamente 20 °C y a una humedad atmosférica relativa del 100 %.

La prueba se evaluó 3 días después de la inoculación. 0 % significa una eficacia que corresponde a la del control no tratado en tanto que una eficacia del 100 % significa que no se observa enfermedad.

5

**Tabla 2: Prueba preventiva *in vivo* con *Phytophthora* (tomates)**

Compuesto	Índice de aplicación del caldo completo en ppm	Eficacia en %
NRRL B-50972 de <i>Paenibacillus</i> sp.	10.000	70
Cepa X de <i>Paenibacillus</i> sp.	10.000	63
Cepa Y de <i>Paenibacillus</i> sp.	10.000	70
Cepa Z de <i>Paenibacillus</i> sp.	10.000	68

#### Ejemplo 5. Prueba preventiva *in vivo* en vides infectadas con *Plasmopara*

10

En este ensayo en invernadero con patógenos de plantas, se analizó el producto de fermentación de la cepa NRRL B-50972 de *Paenibacillus* sp. en comparación con otras tres cepas de *Paenibacillus* sp. que habían demostrado una actividad antifúngica relativamente alta en ensayos de cribado anteriores. Para producir una preparación adecuada de los compuestos, se mezcló 1 parte en peso del polvo de caldo completo secado por pulverización preparado como se describe en el Ejemplo 5 con 0,1 partes en peso de emulsionante (alquilaril poliglicol éter) y posteriormente se diluyó con agua hasta la concentración deseada.

15

Para probar la actividad preventiva, se pulverizaron plantas jóvenes con la preparación del compuesto al índice de aplicación establecido. Después que se secura el recubrimiento de pulverizado, las plantas se inocularon con una suspensión de esporas acuosa de *Plasmopara viticola* y luego permanecieron durante 1 día en una cabina de incubación a aproximadamente 20 °C y a una humedad atmosférica relativa del 100 %. Posteriormente las plantas se colocaron durante 4 días en un invernadero a aproximadamente 21 °C y a una humedad atmosférica relativa de aproximadamente el 90 %. Después, las plantas se humedecieron por rociado y se colocaron durante 1 día en una cabina de incubación.

20

La prueba se evaluó 6 días después de la inoculación. 0 % significa una eficacia que corresponde a la del control no tratado en tanto que una eficacia del 100 % significa que no se observa enfermedad.

**Tabla 3: Prueba preventiva *in vivo* con *Plasmopara* (vides)**

Compuesto	Índice de aplicación del caldo completo en ppm	Eficacia en %
NRRL B-50972 de <i>Paenibacillus</i> sp.	10.000	93
Cepa X de <i>Paenibacillus</i> sp.	10.000	46
Cepa Y de <i>Paenibacillus</i> sp.	10.000	62
Cepa Z de <i>Paenibacillus</i> sp.	10.000	78

25

#### Ejemplo 6. Prueba preventiva *in vivo* en habas infectadas con *Uromyces*

30

En este ensayo en invernadero con patógenos de plantas, se analizaron el producto de fermentación de la cepa NRRL B-50972 de *Paenibacillus* sp. en comparación con otras tres cepas de *Paenibacillus* sp. que habían demostrado una actividad antifúngica relativamente alta en ensayos de cribado anteriores. Para producir una preparación adecuada de los compuestos, se mezcló 1 parte en peso del polvo de caldo completo secado por pulverización preparado como se describe en el Ejemplo 5 con 0,1 partes en peso de emulsionante (alquilaril poliglicol éter) y posteriormente se diluyó con agua hasta la concentración deseada.

35

Para probar la actividad preventiva, se pulverizaron plantas jóvenes con la preparación del compuesto al índice de aplicación establecido. Después que se secura el recubrimiento de pulverizado, las plantas se inocularon con una suspensión de esporas acuosa del agente causal de la roya de habas (*Uromyces appendiculatus*) y luego permanecieron durante 1 día en una cabina de incubación a aproximadamente 20 °C y a una humedad atmosférica relativa del 100 %.

Las plantas se colocaron luego en un invernadero a aproximadamente 21 °C y a una humedad atmosférica relativa de aproximadamente el 90 %.

40

La prueba se evaluó 10 días después de la inoculación. 0 % significa una eficacia que corresponde a la del control no tratado en tanto que una eficacia del 100 % significa que no se observa enfermedad.

**Tabla 4: Prueba preventiva *in vivo* con *Uromyces* (habas)**

Compuesto	Índice de aplicación del caldo completo en ppm	Eficacia en %
NRRL B-50972 de <i>Paenibacillus</i> sp.	10.000	85
Cepa X de <i>Paenibacillus</i> sp.	10.000	50
Cepa Y de <i>Paenibacillus</i> sp.	10.000	40
Cepa Z de <i>Paenibacillus</i> sp.	10.000	40

**Ejemplo 7. Comparación de las cepas de *Paenibacillus* en un ensayo de campo de calabacines infectados con mildiú pulverulento (*Sphaerotheca fuliginea*)**

- 5 Se realizaron dos ensayos de campo con calabacines, inoculados artificialmente con *Sphaerotheca fuliginea*. Se resuspendieron cinco tratamientos con polvo de caldo completo secado por pulverización de cada cepa de *Paenibacillus* sp. cultivada en un medio basado en soja en agua a un volumen de aplicación de 1000 l/ha y se aplicaron a las plantas entre el 15 de julio y el 8 de agosto en una fase de crecimiento de BBCH59 a BBCH72 con un intervalo de 4 a 8 días como se indica en la **Tabla 6**. El porcentaje de control de la enfermedad que se muestra en la **Tabla 5**
- 10 es el resultado de la última evaluación efectuada 10 días después de la aplicación final, efectuada por observación visual de los síntomas de la enfermedad. 0 % significa una eficacia que corresponde a la del control no tratado en tanto que una eficacia del 100 % significa que no se observó enfermedad.

**Tabla 5**

Producto	Dosificación kg/ha	Código de aplicación	Control de la enfermedad, en % Media de 2 ensayos
Control sin tratar			0
NRRL B-50972 de <i>Paenibacillus</i> sp.	4	ABCDE	100
NRRL B-50972 de <i>Paenibacillus</i> sp.	2	ABCDE	92
Cepa X de <i>Paenibacillus</i> sp.	4	ABCDE	59
Cepa X de <i>Paenibacillus</i> sp.	2	ABCDE	29
Cepa Y de <i>Paenibacillus</i> sp.	4	ABCDE	66
Cepa Y de <i>Paenibacillus</i> sp.	2	ABCDE	46
Cepa Z de <i>Paenibacillus</i> sp.	4	ABCDE	29
Cepa Z de <i>Paenibacillus</i> sp.	2	ABCDE	18

15

**Tabla 6**

Código de aplicación	Fecha de aplicación	Fase de crecimiento
A	15 de julio	59
B	23 de julio	65
C	30 de julio	71
D	4 de agosto	72
E	8 de agosto	72

Los resultados de la **Tabla 4** muestran claramente que la actividad observada de la cepa NRRL B-50972 de *Paenibacillus* sp. es superior en comparación con las otras cepas analizadas en este ensayo de campo, que habían demostrado una actividad antifúngica relativamente alta en ensayos de cribado anteriores.

**20 Ejemplo 8. Comparación de cepas de *Paenibacillus* en un ensayo de campo de vid infectada con mildiú pulverulento (*Uncinula necator*)**

- Se realizaron dos ensayos de campo con vid, infectada naturalmente con *Uncinula necator*. Se resuspendieron seis tratamientos con los polvos secados por pulverización descritos en el Ejemplo 8 en agua a un volumen de aplicación de 1000 l/ha y se aplicaron a las plantas entre el 3 de junio y el 1 de julio, en una fase de crecimiento de BBCH57 a BBCH75 a intervalos de 5 a 7 días como se indica en la **Tabla 8**. El porcentaje de control de la enfermedad que se muestra en la **Tabla 7** es el resultado de la última evaluación efectuada 15 días después de la aplicación final,
- 25 es el resultado de la última evaluación efectuada 15 días después de la aplicación final, efectuada por observación visual de los síntomas de la enfermedad. 0 % significa una eficacia que corresponde a la del control no tratado en tanto que una eficacia del 100 % significa que no se observó enfermedad.

Tabla 7

Producto	Dosificación kg/ha	Código de aplicación	Control de la enfermedad, en % Media de 2 ensayos
Control sin tratar			0
NRRL B-50972 de <i>Paenibacillus</i> sp.	4	ABCDEF	100
NRRL B-50972 de <i>Paenibacillus</i> sp.	2	ABCDEF	100
Cepa X de <i>Paenibacillus</i> sp.	4	ABCDEF	45
Cepa X de <i>Paenibacillus</i> sp.	2	ABCDEF	28
Cepa Y de <i>Paenibacillus</i> sp.	4	ABCDEF	66
Cepa Y de <i>Paenibacillus</i> sp.	2	ABCDEF	60
Cepa Z de <i>Paenibacillus</i> sp.	4	ABCDEF	36
Cepa Z de <i>Paenibacillus</i> sp.	2	ABCDEF	25

Tabla 8

Código de aplicación	Fecha de aplicación	Fase de crecimiento
A	3 de junio	57
B	10 de junio	60
C	16 de junio	64
D	21 de junio	71
E	26 de junio	73
F	1 de julio	75

- 5 Los resultados de la Tabla 7 muestran claramente que la actividad observada de la cepa NRRL B-50972 de *Paenibacillus* sp. es superior en comparación con las otras cepas analizadas en este ensayo de campo, que habían demostrado una actividad antifúngica relativamente alta en ensayos de cribado anteriores.

**Ejemplo 9. Comparación de las cepas de *Paenibacillus* en un ensayo de campo con tomate infectado con el tizón temprano (*Alternaria solani*)**

- 10 Se realizaron dos ensayos de campo con plantas de tomate, inoculadas artificialmente con *Alternaria solani*. Se resuspendieron tres tratamientos con los polvos secados por pulverización descritos en el Ejemplo 8 en agua a un volumen de aplicación de 1000 l/ha y se aplicaron a las plantas entre el 26 de junio y el 10 de julio, en una fase de crecimiento de BBCH51 a BBCH59 a intervalos de 6 a 8 días como se indica en la Tabla 10. El porcentaje de control de la enfermedad que se muestra en la Tabla 9 es el resultado de la última evaluación efectuada 8 días después de la aplicación final, efectuada por observación visual de los síntomas de la enfermedad. 0 % significa una eficacia que corresponde a la del control no tratado en tanto que una eficacia del 100 % significa que no se observó enfermedad.
- 15

Tabla 9

Producto	Dosificación kg/ha	Código de aplicación	Control de la enfermedad, en % Media de 2 ensayos
Control sin tratar			0
NRRL B-50972 de <i>Paenibacillus</i> sp.	4	ABC	84
NRRL B-50972 de <i>Paenibacillus</i> sp.	2	ABC	68
Cepa X de <i>Paenibacillus</i> sp.	4	ABC	36
Cepa X de <i>Paenibacillus</i> sp.	2	ABC	20
Cepa Y de <i>Paenibacillus</i> sp.	4	ABC	44
Cepa Y de <i>Paenibacillus</i> sp.	2	ABC	19
Cepa Z de <i>Paenibacillus</i> sp.	4	ABC	40
Cepa Z de <i>Paenibacillus</i> sp.	2	ABC	11

Tabla 10

Código de aplicación	Fecha de aplicación	Fase de crecimiento
A	26 de junio	51
B	2 de julio	53
C	10 de julio	59

5 Los resultados de la **Tabla 9** muestran claramente que la actividad observada de la cepa NRRL B-50972 de *Paenibacillus* sp. es superior en comparación con las otras cepas analizadas en este ensayo de campo, que habían demostrado una actividad antifúngica relativamente alta en ensayos de cribado anteriores.

**Ejemplo 10. Comparación de las cepas de *Paenibacillus* en un ensayo de campo con patata infectada con el tizón temprano (*Alternaria solani*)**

10 Se realizó un ensayo de campo con plantas de patata, inoculadas artificialmente con *Alternaria solani*. Se resuspendieron cinco tratamientos con los polvos secados por pulverización descritos en el Ejemplo 8 en agua a un volumen de aplicación de 500 l/ha y se aplicaron a las plantas entre el 26 de junio y el 19 de julio, en una fase de crecimiento de BBCH37 a BBCH55 a intervalos de 4 a 8 días como se indica en la **Tabla 12**. El porcentaje de control de la enfermedad que se muestra en la **Tabla 11** es el resultado de la última evaluación efectuada 6 días después de la aplicación final, efectuada por observación visual de los síntomas de la enfermedad. 0 % significa una eficacia que corresponde a la del control no tratado en tanto que una eficacia del 100 % significa que no se observó enfermedad.

15

Tabla 11

Producto	Dosificación kg/ha	Código de aplicación	Control de la enfermedad, en %
Control sin tratar			0
NRRL B-50972 de <i>Paenibacillus</i> sp.	4	ABCDE	80
NRRL B-50972 de <i>Paenibacillus</i> sp.	2	ABCDE	71
Cepa X de <i>Paenibacillus</i> sp.	4	ABCDE	71
Cepa X de <i>Paenibacillus</i> sp.	2	ABCDE	41
Cepa Y de <i>Paenibacillus</i> sp.	4	ABCDE	61
Cepa Y de <i>Paenibacillus</i> sp.	2	ABCDE	41
Cepa Z de <i>Paenibacillus</i> sp.	4	ABCDE	41
Cepa Z de <i>Paenibacillus</i> sp.	2	ABCDE	32

Tabla 12

Código de aplicación	Fecha de aplicación	Fase de crecimiento
A	26 de junio	37
B	2 de julio	47
C	10 de julio	51
D	15 de julio	55
E	19 de julio	55

20 Los resultados de la **Tabla 11** muestran claramente que la actividad observada de la cepa NRRL B-50972 de *Paenibacillus* sp. es superior en comparación con las otras cepas analizadas en este ensayo de campo, que habían demostrado una actividad antifúngica relativamente alta en ensayos de cribado anteriores.

**Ejemplo 11. Comparación de las cepas de *Paenibacillus* en un ensayo de campo con patata infectada con el tizón temprano (*Alternaria solani*)**

25 Se realizó un ensayo de campo con plantas de patata, inoculadas artificialmente con *Alternaria solani*. Se resuspendieron tres tratamientos con los polvos secados por pulverización descritos en el Ejemplo 8 en agua a un volumen de aplicación de 500 l/ha y se aplicaron a las plantas entre el 24 de julio y el 5 de agosto, en una fase de crecimiento de BBCH37 a BBCH51 a intervalos de 6 días como se indica en la **Tabla 14**. El porcentaje de control de la enfermedad que se muestra en la **Tabla 13** es el resultado de la última evaluación efectuada 6 días después de la aplicación final, efectuada por observación visual de los síntomas de la enfermedad. 0 % significa una eficacia que

corresponde a la del control no tratado en tanto que una eficacia del 100 % significa que no se observó enfermedad.

Tabla 13

Producto	Dosificación kg/ha	Código de aplicación	Control de la enfermedad, en %
Control sin tratar			0
NRRL B-50972 de <i>Paenibacillus</i> sp.	4	ABC	100
NRRL B-50972 de <i>Paenibacillus</i> sp.	2	ABC	100
Cepa X de <i>Paenibacillus</i> sp.	4	ABC	74
Cepa X de <i>Paenibacillus</i> sp.	2	ABC	48
Cepa Y de <i>Paenibacillus</i> sp.	4	ABC	74
Cepa Y de <i>Paenibacillus</i> sp.	2	ABC	61
Cepa Z de <i>Paenibacillus</i> sp.	4	ABC	74
Cepa Z de <i>Paenibacillus</i> sp.	2	ABC	61

Tabla 14

Código de aplicación	Fecha de aplicación	Fase de crecimiento
A	24 de julio	37
B	30 de julio	40
C	5 de agosto	51

5

Los resultados de la **Tabla 13** muestran claramente que la actividad observada de la cepa NRRL B-50972 de *Paenibacillus* sp. es superior en comparación con las otras cepas analizadas en este ensayo de campo, que habían demostrado una actividad antifúngica relativamente alta en ensayos de cribado anteriores.

#### Ejemplo 12. Identificación de la variación *fusA* en la cepa NRRL B-50972 de *Paenibacillus* sp.

10 Para caracterizar adicionalmente la cepa NRRL B-50972 de *Paenibacillus* sp., se determinó la secuencia genómica del gen *fusA* que codifica la FusA fusaricidina sintasa con procedimientos de secuenciación convencionales, y se identificó la secuencia aminoácidos relacionada. Se comparó la secuencia de aminoácidos de FusA expresada por la cepa NRRL B-50972 de *Paenibacillus* sp. con la de varias otras cepas de *Paenibacillus* incluyendo las que se describen en las siguientes publicaciones:

15 Li S., y col., (2014). "Complete Genome Sequence of *Paenibacillus polymyxa* SQR-21, a Plant Growth-Promoting Rhizobacterium with Antifungal Activity and Rhizosphere Colonization Ability", Genome Announc, 2(2):HASH(0x743db288);

20 Niu B., y col., (2011). "The Genome of the Plant Growth-Promoting Rhizobacterium *Paenibacillus polymyxa* M-1 Contains Nine Sites Dedicated to Nonribosomal Synthesis of Lipopeptides and Polyketides", J. Bacteriol. 193(20):5862-3;

Ma M., y col., (2011) "Complete Genome Sequence of *Paenibacillus polymyxa* SC2, A Strain of Plant Growth-Promoting Rhizobacterium with Broad-Spectrum Antimicrobial Activity", J. Bacteriol. 193(1):311-2; y

Li and Jensen, (2008). Nonribosomal Biosynthesis of Fusaricidins by *Paenibacillus polymyxa* PKB1 Involves Direct Activation of a d-amino Acid. Chem. Biol. 15, 118-127.

25 El alineamiento que se muestra en la **FIG. 13** reveló deleciones significativas en la variante de FusA fusaricidina sintasa expresada por la cepa NRRL B-50972 de *Paenibacillus* sp. Una primera deleción se extiende de la posición 3009 a la posición 3037 de la correspondiente secuencia en la cepa A de *Paenibacillus* sp. (SEQ ID NO: 11). Una segunda deleción se extiende de la posición 3047 a la posición 3317 de la correspondiente secuencia en la cepa A de *Paenibacillus* sp. (SEQ ID NO: 11). Ambas deleciones se encuentran dentro del dominio A del tercer módulo de la FusA fusaricidina sintasa (es decir, FusA-A3).

30 Como se explicó anteriormente, cada uno de los dominios A contiene diez restos de aminoácidos conservados responsables del reconocimiento y la activación del sustrato (véase la **Tabla 1**). Estos restos de aminoácidos conservados se indican en el alineamiento que se muestra en la **FIG. 13**. Las deleciones identificadas en la variante de la FusA fusaricidina sintasa expresada por la cepa NRRL B-50972 de *Paenibacillus* sp. eliminan todos restos de aminoácido conservados salvo el último (es decir, Lys517 ubicado en la posición 3486 de la SEQ ID NO: 11).

35

Estas dos delecciones en la variante de la FusA fusaricidina sintasa están presentes en las cepas procedentes de la cepa NRRL B-50972 de *Paenibacillus* sp., incluyendo la cepa variante con una morfología de colonia estable designada en el presente documento como la cepa NRRL B-67129 de *Paenibacillus* sp. Las cepas mutantes aleatorias procedentes de la cepa NRRL B-50972 de *Paenibacillus* sp. generalmente van a mantener las delecciones en la variante de FusA-A3 ya que es extremadamente improbable una retromutación a la FusA-A3 de tipo silvestre debido a la naturaleza extensa de las delecciones.

**Ejemplo 13. Comparación de la producción de fusaricidina en la cepa NRRL B-50972 de *Paenibacillus* sp. y la cepa A de *Paenibacillus* sp.**

Para determinar el efecto de la variante de FusA-A3, se cuantificó un panel de fusaricidinas y Paeniserinas en la cepa NRRL B-50972 de *Paenibacillus* sp. (que expresa la variante de FusA-A3) y la cepa A de *Paenibacillus* sp. (que expresa la FusA-A3 de tipo silvestre) utilizando el procedimiento descrito en el Ejemplo 14. La identidad de cada compuesto se determinó por su tiempo de retención y masa distintivos. Las intensidades de señal relativas de cada pico en los espectros se presentan en la **Tabla 15**. No fue posible una cuantificación absoluta en ausencia de patrones purificados. Sin embargo, se inyectaron cantidades similares de cada extracto celular y se pueden estimar las cantidades relativas de los compuestos a partir de las intensidades de señal resultantes.

**Tabla 15**

Compuesto	TR	Masa	NRRL B-50972	Cepa A
Fusaricidina C	10,35	946,6	0	226457229
Fusaricidina D	10,43	960,6	0	116424723
Paeniserina A1	11,00	868,5	208029	0
Paeniserina B1	11,22	868,5	871001	317056
Fusaricidina B	13,23	896,6	9840703	461022017
Fusaricidina A	13,27	882,6	28024006	794055383
LiF05b	16,56	910,6	9978253	145941253
LiF05a	16,64	896,6	33071793	280586192
LiF06a	17,96	896,6	6594451	11862306
LiF06b	17,99	910,6	1600867	7441646
LiF07b	18,10	944,6	0	263137626
LiF07a	18,12	930,6	0	522229025
LiF08b	19,68	924,6	3546312	47167630
LiF08a	19,71	910,6	20378028	75820378

En la FusA fusaricidina sintasa de tipo silvestre, FusA-A3 es responsable de la incorporación de L-Tyr, L-Phe, L-Val, L-Ile o L-allo-Ile en el compuesto de fusaricidina en la posición de aminoácido (3) (véase la **Tabla 1**). La variante de FusA-A3 en la cepa NRRL B-50972 de *Paenibacillus* sp. dio como resultado un extracto sin nada de fusaricidina C, fusaricidina D, LiF07a o LiF07b detectables. Las fusaricidina C y fusaricidina D tienen una tirosina en la posición de aminoácido (3) en tanto que LiF07a y LiF07b tienen una fenilalanina en la posición de aminoácido (3). Estos datos experimentales demuestran que la variación genética en FusA-A3 expresada por la cepa NRRL B-50972 de *Paenibacillus* sp. inhibe la biosíntesis de fusaricidinas con una tirosina o una fenilalanina en la posición de aminoácido (3) (véase la **FIG. 14**).

Por lo tanto, la cepa NRRL B-50972 de *Paenibacillus* sp. y las cepas mutantes procedentes de la cepa NRRL B-50972 de *Paenibacillus* sp. no pueden producir cantidades detectables de fusaricidinas o compuestos de tipo fusaricidina con una tirosina o fenilalanina en la posición de aminoácido (3) (por ejemplo, las fusaricidinas C y D o LiF07a y LiF07b). El análisis de la variante de FusA-A3 en la cepa NRRL B-50972 de *Paenibacillus* sp. indica que esta cepa y sus mutantes son genéticamente incapaces de producir fusaricidinas o análogos de fusaricidina con anillos peptídicos que comprenden un aminoácido tirosina o un aminoácido fenilalanina en la posición de aminoácido (3).

De las dos Paeniserinas analizadas, solamente una era detectable en la cepa A de *Paenibacillus* sp., y su intensidad de señal era menos de la mitad de la correspondiente intensidad de señal observada con el extracto de la cepa NRRL B-50972 de *Paenibacillus* sp. Sin desear quedar ligados a teoría alguna, parece que uno o más de los primeros nueve aminoácidos conservados en FusA-A3 (es decir, Asp235, Ala236, Ser239, Thr278, Leu299, Ala301, Ala/Gly322, Val330 y Cys331) son responsables del reconocimiento y la activación de la tirosina y la fenilalanina en la posición (3) en los compuestos de fusaricidina. Además, la variante de FusA-A3 expresada por la cepa NRRL B-50972 de *Paenibacillus* sp. puede desviar los intermediarios metabólicos de la producción de determinadas fusaricidinas hacia la biosíntesis de una gama más amplia de compuestos de tipo fusaricidina (por ejemplo, las Paeniserinas).

**Ejemplo 14. Comparación de la bioactividad de la cepa NRRL B-50972 de *Paenibacillus* sp. y la cepa A de *Paenibacillus* sp.**

Se cultivó la cepa NRRL B-50972 de *Paenibacillus* sp. (que expresa la variante de FusA-A3) y la cepa A de *Paenibacillus* sp. (que expresa la FusA-A3 de tipo silvestre) en un medio basado en soja para producir caldos completos. Los caldos completos se diluyeron en una mezcla de agua y un disolvente orgánico hasta concentraciones de un 10 %, un 5 %, un 2,5 % y un 1,25 %. Los caldos completos diluidos se aplicaron a plantas jóvenes que posteriormente se expusieron a un inóculo de *Puccinia triticina* (PUCCRT), *Botrytis cinerea* (BOTRCI) o *Phytophthora infestans* (PHYTIN). Varios días después de la exposición al inóculo del patógeno vegetal, cada planta se puntuó por el porcentaje de control del patógeno con respecto a las plantas de control no tratadas. Cada tratamiento se evaluó con tres repeticiones y se informó el porcentaje de control promedio (véanse las **Tablas 16-18**).

En cada uno de los ensayos, la cepa NRRL B-50972 de *Paenibacillus* sp. demostró un control superior a la cepa A de *Paenibacillus* sp. Estos datos experimentales sugieren que la variante de la fusaricidina sintasa y los cambios resultantes en la biosíntesis de las fusaricidinas y de compuestos de tipo fusaricidina dio como resultado un control potenciado de los patógenos vegetales con la cepa NRRL B-50972 de *Paenibacillus* sp.

**Tabla 16.** Control de *Puccinia triticina* (PUCCRT) logrado con la cepa NRRL B-50972 de *Paenibacillus* sp. y la cepa A de *Paenibacillus* sp. a índices de dilución del 10 %, 5 %, 2,5 % y 1,25 %.

Tratamiento	Índice de aplicación	Porcentaje de control promedio
NRRL B-50972 de <i>Paenibacillus</i> sp.	10 %	98
	5 %	88
	2,5 %	58
	1,25 %	0
Cepa A de <i>Paenibacillus</i> sp.	10 %	82
	5 %	33
	2,5 %	0
	1,25 %	0

**Tabla 17.** Control de *Botrytis cinerea* (BOTRCI) logrado con la cepa NRRL B-50972 de *Paenibacillus* sp. y la cepa A de *Paenibacillus* sp. a índices de dilución del 10 %, 5 %, 2,5 % y 1,25 %.

Tratamiento	Índice de aplicación	Porcentaje de control promedio
NRRL B-50972 de <i>Paenibacillus</i> sp	10 %	100
	5 %	100
	2,5 %	98
	1,25 %	42
Cepa A de <i>Paenibacillus</i> sp	10 %	97
	5 %	83
	2,5 %	17
	1,25 %	0

**Tabla 18.** Control de *Phytophthora infestans* (PHYTIN) logrado con la cepa NRRL B-50972 de *Paenibacillus* sp. y la cepa A de *Paenibacillus* sp. a índices de dilución del 10 %, 5 %, 2,5 % y 1,25 %.

Tratamiento	Índice de aplicación	Porcentaje de control promedio
NRRL B-50972 de <i>Paenibacillus</i> sp.	10 %	100
	5 %	99
	2,5 %	99
	1,25 %	90
Cepa A de <i>Paenibacillus</i> sp.	10 %	97
	5 %	87
	2,5 %	67
	1,25 %	33

**Ejemplo 15. Identificación de las fusaricidinas en un extracto celular de *Paenibacillus* sp.**

La cepa NRRL B-50972 de *Paenibacillus* sp. y/o las cepas procedentes de la misma se cultivaron en un medio basado en soja hasta que alcanzaron la fase estacionaria, en cuyo momento el cultivo de caldo completo se recogió y se extrajo con un disolvente orgánico para producir un extracto celular.

Se desarrolló un procedimiento cromatográfico utilizando cromatografía líquida de alto rendimiento/espectrometría de masas con tiempo de vuelo (HPLC/MS TOF) para separar las numerosas moléculas de tipo fusaricidina a partir del extracto celular: columna: YMC™ Basic 4,6 x 250 mm, 5 µm; agua (FA al 0,1 %) y acetonitrilo (ácido fórmico (FA) al 0,1 %); gradiente (% de B): 0-9 min al 28-30 %; 9-14 min al 30-33 %; 14-34 min al 33-50 %; lavado.

En la **FIG. 4B** se muestra un cromatograma del extracto celular en el cual se identifican las fusaricidinas conocidas. La estructura general de las fusaricidinas se presenta en la **FIG. 4A**. Cada fusaricidina cíclica tiene un análogo acíclico correspondiente.

Todas las fusaricidinas detectables en el extracto celular se identificaron basándose en sus tiempos de retención y valores m/z (véase la **FIG. 4C**). Notablemente, las fusaricidinas C y D y otras fusaricidinas en las cuales el aminoácido en la posición (3) es una tirosina o una fenilalanina no fueron detectables en el extracto celular.

**Ejemplo 16. Caracterización de las Paeniserinas en un extracto celular de *Paenibacillus* sp.**

Para identificar otros compuestos en el extracto celular de la cepa NRRL B-50972 de *Paenibacillus* sp. y/o de las cepas procedentes de la misma se desarrolló un procedimiento cromatográfico utilizando cromatografía líquida de alto rendimiento/espectrometría de masas con triple tiempo de vuelo (UPLC/MS Triple TOF) para fragmentar las numerosas moléculas de tipo fusaricidina: columna: ZORBAX™ Eclipse Plus, 2,1 x 100 mm, 1,8 µm; agua (FA al 0,1 %) y acetonitrilo (FA al 0,1 %); gradiente (% de B): 0-5 min al 10-95 %; lavado.

Con este procedimiento el Solicitante de la Patente caracterizó una nueva familia de Paeniserinas fusaricidinas mediante el examen de los patrones de fragmentación de masas obtenidos con un espectrómetro de masas AB SCIEX TRIPLE TOF® así como por comparación de los espectros con la bibliografía publicada. El Solicitante de la Patente nombró a esta nueva familia Paeniserinas. Los patrones de fragmentación representativos de UPLC/MS Triple TOF y las correspondientes estructuras químicas para la Paeniserina A1 y la Paeniserina B1 se muestran en las **FIG. 5 y 6**, respectivamente. Se realizó un análisis similar para cada una de las Paeniserinas detectadas en el extracto celular.

Las Paeniserinas se nombraron de esa manera debido a la diferencia importante respecto a la estructura principal de la fusaricidina con una o más sustituciones de serina (véase la **FIG. 5A**). Históricamente, para que fuera considerada como una fusaricidina la secuencia peptídica contenía tres aminoácidos conservados: (1) treonina, (4) treonina y (6) alanina. Sin embargo, las Paeniserinas presentan nuevas sustituciones, con reemplazo de uno o ambos restos de treonina (1) y (4) por una serina. Ambos aminoácidos en las posiciones (2) y (3) son valina en las Paeniserinas que caracterizó el Solicitante de la Patente. En la **FIG. 5B** se muestra un cromatograma en el cual se identifican los picos correspondientes a las Paeniserinas.

El Solicitante de la Patente también caracterizó esta familia de compuestos de tipo fusaricidina sustituidos con serina en el extracto celular, basándose en sus tiempos de retención y valores de m/z (véase la **FIG. 5C**). Aunque la Paeniserina C4 no era detectable resulta razonable esperar que se produzca basándose en las estructuras de las fusaricidinas caracterizadas previamente. Al igual que en el caso de las fusaricidinas, cada Paeniserina cíclica tiene un análogo acíclico correspondiente.

Debe tenerse en cuenta que aunque las Paeniserinas que caracterizó el Solicitante de la Patente tenían un aminoácido valina en los restos (2) y (3), es probable que existan compuestos con variaciones en esas posiciones. Estas variaciones posibles serían similares a los análogos de fusaricidina/LiF con aminoácidos tales como isoleucina, fenilalanina y tirosina como los restos (2) y (3). Además, aunque previamente se describió la cola de GHPD, es probable que existan compuestos con variaciones en las longitudes de la cola similares a las observadas en la familia de las Paeniprolinxinas (véase el Ejemplo 17).

**Ejemplo 17. Caracterización de las Paeniprolinxinas en un extracto celular de *Paenibacillus* sp.**

Además se analizó el extracto celular de la cepa NRRL B-50972 de *Paenibacillus* sp. y/o las cepas procedentes de la misma con el procedimiento cromatográfico descrito en el Ejemplo 14. Se caracterizó una nueva familia de fusaricidinas mediante el examen de los patrones de fragmentación de masas obtenidos con un espectrómetro de masas AB SCIEX TRIPLE TOF® así como por comparación de los espectros con la bibliografía publicada. El Solicitante de la Patente nombró a esta nueva familia Paeniprolinxinas. Los patrones de fragmentación representativos de UPLC/MS Triple TOF y las correspondientes estructuras químicas para la Paeniprolinxina C1 y la Paeniprolinxina D1 se muestran en las **FIG. 8 y 9**, respectivamente. Se realizó un análisis similar para cada una de las Paeniprolinxinas detectadas en el extracto celular.

Las Paeniprolixinas se nombraron por la palabra en latín *prolix* (que significa largo) debido a otra diferencia importante respecto a la estructura principal de la fusaricidina en la cola alifática, a saber, las Paeniprolixinas tienen una cola más larga que las fusaricidinas. Históricamente, en las fusaricidinas sólo se ha observado la cola de GHPD específica. Se ha demostrado que esto es consistente aún en la publicación más reciente sobre el tema (es decir, Vater y col., *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 2015, 26, 1130-1141) en la cual los autores reivindican que “Este hallazgo [la cola de GHPD estrictamente conservada] se contrapone a muchos otros lipopéptidos informados en la bibliografía, donde la parte de ácido graso es un diana importante de variación estructural [tal como en] las surfactinas, las iturinas y las fengicinas”. El Solicitante de la Patente identificó una familia de compuestos de tipo fusaricidina de cola más larga (es decir, ácido 17-guanidin-3-hidroxiheptadecanoico o GHPD + 2CH<sub>2</sub> y ácido 19-guanidin-3-hidroxinonadecanoico o GHPD + 4CH<sub>2</sub>) (véase la **FIG. 8A**) en el extracto celular de la cepa NRRL B-50972 de *Paenibacillus* sp. A diferencia de las Paeniserinas, las Paeniprolixinas conservan los restos de aminoácidos conservados L-treonina en la posición (1) y D-allo-treonina en la posición (4).

Debe tenerse en cuenta que, aunque las Paeniprolixinas que el Solicitante de la Patente caracterizó tenían ya sea un aminoácido valina o un aminoácido isoleucina en los restos (2) y (3), es probable que existan compuestos con variaciones en esas posiciones. Estas posibles variaciones serían similares a los análogos de fusaricidina/LiF tales como otras combinaciones de valina, isoleucina o u otros aminoácidos, tales como fenilalanina y tirosina como los restos (2) y (3). Además, es posible que existan combinaciones híbridas con las Paeniserinas descritas anteriormente que tienen longitudes de cola más extensas.

En la **FIG. 8B** se muestra un cromatograma en el cual se identifican los picos correspondientes a las Paeniprolixinas. Esta familia de compuestos de tipo fusaricidina con colas de GHPD más largas también se caracterizó basándose en sus tiempos de retención y valores de m/z (véase la **FIG. 8C**). Aunque las Paeniprolixinas C2 y D2 no eran detectables resulta razonable esperar que se produzcan basándose en las estructuras de las fusaricidinas caracterizadas previamente. Al igual que en el caso de las fusaricidinas, cada Paeniprolixina cíclica tiene un análogo acíclico correspondiente.

#### 25 **Ejemplo 18. Perfiles de bioactividad antifúngica de las Paeniserinas, Paeniprolixinas y otras fusaricidinas**

Las muestras mostradas en la Tabla 19 se aislaron de células de *Paenibacillus* sp. El caldo de fermentación completo se centrifugó a fin de eliminar el sobrenadante. El sedimento obtenido se extrajo luego en metanol. El extracto resultante se fraccionó utilizando cromatografía líquida de media presión en fase inversa. Las fracciones se purificaron adicionalmente utilizando cromatografía líquida de alta presión preparatoria en fase inversa.

30 Tabla 19

Código de la muestra	Nombre	Descripción
<b>Muestra 1</b>	Paeniserinas	Paeniserinas A1, A2, B1 y B2
<b>Muestra 2</b>	Fusaricidina A	Fusaricidina A (LiF04a), 85+ % Pura
<b>Muestra 3</b>	Análogos con LiF Asn	LiF05a y LiF06a
<b>Muestra 4</b>	Combinación de LiF con Asn/Gln	LiF05a, LiF06a, LiF05b y LiF06b
<b>Muestra 5</b>	LiF08s	LiF08a y LiF08b
<b>Muestra 6</b>	Paeniprolixinas	Paeniprolixina A1, A2, B1, B2, E1 y F1

El ensayo antifúngico *in vitro* en placa de 96 pocillos utiliza el reactivo de viabilidad celular basado en resazurina PRESTOBLUE® como un indicador del crecimiento fúngico. Comenzando a partir de esporas fúngicas, el ensayo mide la potencia de una muestra para inhibir la germinación de esporas fúngicas y/o el crecimiento de células fúngicas. El ensayo se preparó con tres enfermedades fúngicas importantes para la agricultura: *Alternaria solani* (ALTESO), *Colletotrichum lagenarium* (COLLLA) y *Botrytis cinerea* (BOTRCI).

Todas las muestras indicadas en la **Tabla 19** resultaron ser activas contra las enfermedades fúngicas importantes para la agricultura (véase la concentración inhibitoria mínima para un 80 % (CIM80) proporcionados en unidades de partes por millón (ppm) para cada muestra de la **Tabla 20**). Notablemente, determinados compuestos parecen tener una actividad variable contra enfermedades específicas. Por ejemplo, en tanto que los análogos con asparagina de la Muestra 3 parecen ser importantes en el control de ALTESO, las equivalentes con glutamina del mismo tipo de compuesto de la Muestra 4 estaban más implicadas en el control de COLLLA. Los análogos de cola más larga de la Muestra 6 eran los inhibidores más potentes de COLLLA. Esto sugiere que si bien todas son activas por sí mismas, es importante una combinación de estas químicas para la potencia final y el espectro de control de enfermedades del producto final.

Tabla 20

Código de la muestra	Nombre	CIM80 (en ppm)		
		ALTESO	BOTRCI	COLLLA
Muestra 1	Paeniserinas	75	38	49
Muestra 2	Fusaricidina A	1,6	1,5	6,3
Muestra 3	Análogos de LiF con Asn	6,3	2,5	37
Muestra 4	Combinación de LiF con Asn/Gln	55	19	9,3
Muestra 5	LiF08s	3,0	9,4	9,4
Muestra 6	Paeniprolixinas	75	80	5,0

### Ejemplo 19. Perfiles de bioactividad antibacteriana de las Paeniserinas, Paeniprolixinas y otras fusaricidinas

- 5 El ensayo antibacteriano *in vitro* en placa de 96 pocillos emplea absorbancia como un indicador del crecimiento bacteriano. El ensayo mide la potencia de una muestra para inhibir el crecimiento bacteriano por comparación de la absorbancia de los pocillos no tratados con la absorbancia de los pocillos de las muestras. La última dilución/concentración que inhibe el crecimiento de las bacterias se denomina CIM (concentración inhibitoria mínima) y este valor se puede utilizar para comparar la eficacia de las diferentes muestras. El ensayo se evaluó con tres enfermedades bacterianas importantes para la agricultura: *Xanthomonas campestris* (XANTAV), *Pseudomonas syringae* (PSDMTM) y *Erwinia carotovora* (ERWICA).
- 10 Las muestras indicadas en la **Tabla 19** se aplicaron en los ensayos antibacterianos para determinar los valores de CIM80 con cada patógeno bacteriano. Los resultados de los ensayos se presentan en la **Tabla 21**. Las muestras 1-5 han resultado ser activas contra las enfermedades bacterianas importantes para la agricultura. Notablemente, determinados compuestos parecen presentar una actividad variable contra enfermedades específicas. Por ejemplo, las Paeniserinas se complementan bien con la Fusaricidina A en el aspecto de que pueden controlar PSDMTM, una debilidad de la Fusaricidina A. Por otro lado, la Fusaricidina A compensa la debilidad en el control de ERWICA observado con las Paeniserinas. Al igual que en el caso de los ensayos fúngicos, esto sugiere que si bien todas son activas por sí mismas, es importante una
- 15 combinación de estas químicas para la potencia final y el espectro de control de enfermedades del producto final.

Tabla 21

Código de la muestra	Nombre	CIM80 (en ppm)		
		PSDMTM	XANTAV	ERWICA
Muestra 1	Paeniserinas	99	44	NRD*
Muestra 2	Fusaricidina A	NRD*	24	75
Muestra 3	Análogos de LiF con Asn	101	12,4	62,5
Muestra 4	Combinación de LiF con Asn/Gln	88	44	150
Muestra 5	LiF08s	125	23	49
Muestra 6	Paeniprolixinas	---**	---**	---**

\*NRD: no hay un resultado detectable (es decir, no hay inhibición del crecimiento bacteriano a las concentraciones más altas analizadas)

\*\*La muestra era insoluble en el medio microbiano y no se pudo analizar.

### 20 Ejemplo 20. Indicación de sinergia con un ensayo de difusión de discos de antibióticos de Kirby-Bauer

- A fin de lograr una evaluación inicial de sinergia entre las diversas clases de compuestos de tipo fusaricidina, se realizó un bioensayo utilizando el patógeno vegetal COLLLA. El bioensayo era el ensayo clásico de difusión de discos de antibióticos de Kirby-Bauer sobre agar (Bauer, A. W., y col., 1966, *Am. J. Clin. Pathol.*, 36: 493-496). Brevemente, se colocaron discos estériles de blanco cargados con cantidades similares de las diversas muestras sobre una cápsula de Petri inoculada con un césped de esporas de COLLLA. La cápsula de Petri se incubó y se registró la actividad como el tamaño del diámetro de la zona de inhibición presente alrededor de cada disco. Los resultados se ilustran en la **FIG. 11**.
- 25

- Los resultados de este ensayo preliminar sugieren un efecto sinérgico cuando se aplican juntas determinadas Paeniserinas y Paeniprolixinas. En este ensayo, cuando las Paeniserinas A1 y B1 ("868") o las Paeniprolixinas A2 y B2 ("938") se aplican por separado muestran zonas de inhibición relativamente pequeñas. Sin embargo, su combinación ("868/938") presenta la zona de inhibición más grande y nítida, excediendo los resultados obtenidos con
- 30

la aplicación de 868, 938 o las fusaricidinas A y B ("AB"). Se aplicaron aproximadamente 0,1 mg de material total a cada disco estéril para las muestras AB, 868 y 938. El disco que contenía ambas muestras 868 y 938 contenía aproximadamente 0,05 mg de cada muestra, de modo que la cantidad total de material sobre el disco de 868/938 era de aproximadamente 0,1 mg.

- 5 Una limitación de este ensayo es el requisito de que los compuestos de fusaricidina deben difundir a través del agar para inhibir el crecimiento fúngico. Esta indicación inicial de un efecto sinérgico se evaluará adicionalmente utilizando ensayos antifúngicos *in vitro* en un medio líquido.

#### Ejemplo 21. Ensayos antifúngicos *in vitro* para demostrar la sinergia de las combinaciones de fusaricidinas

- 10 Además de las combinaciones de fusaricidinas indicadas en el Ejemplo 17, se realizarán ensayos antifúngicos *in vitro* en un medio líquido para demostrar la sinergia propuesta resultante de la aplicación de las combinaciones de fusaricidinas y/o de compuestos de tipo fusaricidina que se muestran en la FIG. 12. Cada uno de los grupos que se muestran en la FIG. 12 se evaluará individualmente para evaluar primero las características estructurales y luego en combinaciones para abordar la sinergia. Se evaluarán mezclas tanto binarias como ternarias.

- 15 Aunque los compuestos individuales pueden presentar debilidad con respecto a la actividad fungicida, las combinaciones tendrán una actividad que excede la simple adición de las actividades.

Siempre está presente un efecto sinérgico de los fungicidas cuando la actividad fungicida de las combinaciones de compuestos activos excede el total de las actividades de los compuestos activos cuando se aplican individualmente.

- 20 La actividad esperada para una combinación dada de dos o tres compuestos activos se puede calcular de la siguiente manera (véase, Colby, S.R., "Calculating Synergistic and Antagonistic Responses of Herbicide Combinations", *Weeds*, 1967, 15, 20-22):

Si:

- X es la eficacia cuando el compuesto activo A se aplica a un índice de aplicación de m ppm (o g/ha),  
 Y es la eficacia cuando el compuesto activo B se aplica a un índice de aplicación de n ppm (o g/ha),  
 Z es la eficacia cuando el compuesto activo B se aplica a un índice de aplicación de r ppm (o g/ha),  
 25 E<sub>1</sub> es la eficacia cuando los compuestos activos A y B se aplican a índice de aplicación de m y n ppm (o g/ha), respectivamente,  
 E<sub>2</sub> es la eficacia cuando los compuestos activos A, B y C se aplican a índice de aplicación de m, n y r ppm (o g/ha), respectivamente,

Entonces, para una mezcla binaria:

$$30 \quad E_1 = X + Y - \frac{X \cdot Y}{100}$$

y para una mezcla ternaria:

$$E_2 = X + Y + Z - \left( \frac{X \cdot Y + X \cdot Z + Y \cdot Z}{100} \right) + \frac{X \cdot Y \cdot Z}{10000}$$

Se indica el grado de eficacia, expresado en %. 0 % significa una eficacia que corresponde a la del control en tanto que una eficacia del 100 % significa que no se observa enfermedad.

- 35 Si la actividad fungicida real excede el valor calculado, entonces la actividad de la combinación es superaditiva, es decir existe un efecto sinérgico. En este caso, la eficacia observada realmente debe ser mayor que el valor de la eficacia esperada (E) calculada con la fórmula mencionada anteriormente.

Una manera adicional de demostrar un efecto sinérgico es el procedimiento de Tammes (véase, "Isoboles, A Graphic Representation of Synergism in Pesticides" en *Neth. J. Plant Path.*, 1964, 70, 73-80).

#### 40 Ejemplo 22. Selección de una cepa variante de la cepa NRRL B-50972 de *Paenibacillus* sp.

- La cepa NRRL B-50972 de *Paenibacillus* sp. produce múltiples morfologías de colonia sobre un medio de agar sólido en condiciones de laboratorio convencionales. Se identificaron varias colonias morfológicamente distintas y se almacenaron como soluciones madre de glicerol a -80 °C. Los cultivos en medio líquido se inocularon utilizando soluciones madre obtenidas de los diferentes fenotipos de colonias, y después de varias rondas de crecimiento en medio líquido, se volvieron a 45 a inocular sobre medio de agar sólido. A partir de eso, se identificó un aislado con un fenotipo de colonia estable en las condiciones analizadas, en tanto que aún tenían la capacidad para producir esporas resistentes al calor y una química de fusaricidinas. Resulta conveniente un aislado con una morfología de colonia estable para poder lograr mejoras adicionales de la cepa (véase el Ejemplo 23). Este aislado se depositó en la NRRL el 1 de septiembre de 2015, y se le asignó el siguiente número de referencia: NRRL B-67129.

**Ejemplo 23. Mutagénesis aleatoria para generar mutantes de *Paenibacillus* sp. mejorados***Mutagénesis química*

A fin de crear un conjunto de aislados genéticamente diversos de la cepa NRRL B-67129 de *Paenibacillus* sp., se sedimentó mediante centrifugación un cultivo de la cepa cultivado en medio líquido, y se resuspendió en un tampón que contenía 1- metil-3-nitro-1-nitroguanidina (NTG) a una concentración final de 400 µg/ml. Como referencia, se preparó una segunda muestra sin NTG. Las muestras se incubaron durante 1 hora a 30 °C y 220 rpm. Después de 1 hora, las muestras se sedimentaron mediante centrifugación, se lavaron con un tampón que no contenía NTG y finalmente se resuspendieron en el mismo volumen de tampón fresco. Se congelaron alícuotas del cultivo no diluido como soluciones madre de glicerol a -80 °C. Las muestras se diluyeron y se sembraron en placas de agar para determinar las unidades formadoras de colonias, y se determinó el porcentaje de destrucción como una referencia para el grado de mutaciones por genoma. Los aislados mejorados seleccionados en una primera ronda de cribado se sometieron a una o más rondas posteriores de tratamiento con NTG como se describió previamente y se cribaron en cuanto mejoras adicionales en la producción de fusaricidina. La producción de fusaricidina se determinó por las cantidades relativas de varios compuestos incluyendo la fusaricidina A (también conocida como LiF04a o "Fus A"); LiF08a; las Paeniserinas A1 y B1 (también conocidas como "M868" o "868") y las Paeniprolixinas A2 y B2 (también conocidas como "M938" o "938").

*Cribado de alto rendimiento y caracterización del aislado*

Las muestras tratadas con NTG se diluyeron y se sembraron en placas de agar para obtener colonias individuales. Las colonias individuales se inocularon en bloques de 96 pocillos profundos que contenían medio de siembra, los cuales se incubaron con agitación durante 2 días a 30 °C. Después de eso, se inocularon nuevos bloques de 96 pocillos profundos que contenían un medio de producción basado en soja y se incubaron con agitación durante 5 días a 30 °C. Después de 5 días, se prepararon soluciones madre de glicerol a partir de cada muestra de un pocillo individual y se almacenaron a -80 °C, y una muestra se sometió a análisis químico para los cuatro biomarcadores de fusaricidina identificados anteriormente. En este cribado primario, los aislados individuales eran considerados como aciertos si su "valor de fusaricidina total" (es decir, la suma de los cuatro biomarcadores de fusaricidina analizados con respecto a la media de los valores de tipo silvestre) era más alto que la media de los valores de tipo silvestre más 3x la desviación típica de los valores de tipo silvestre. Se cultivaron 8 repeticiones de cada aislado seleccionado basándose en este criterio y se analizaron como se describió anteriormente. Después, se aumentó la escala de los sobreproductores de fusaricidina confirmados a volúmenes de 50 ml en frascos de agitación de 250 ml y se caracterizaron en cuanto a la esporulación, la producción de fusaricidina y la bioactividad. Se aumentó aún más la escala de los aislados a los que se dio prioridad en biorreactores y nuevamente se caracterizaron en cuanto a esporulación, viscosidad, producción de fusaricidina y bioactividad. Se obtuvieron varias cepas mutantes a partir de la segunda ronda del tratamiento con NTG y cribado, y se encontró que tenían una producción de biomarcadores y bioactividad de fusaricidina superiores.

**Ejemplo 24. Caracterización de la sensibilidad a antibióticos de la cepa NRRL B-50972 de *Paenibacillus* sp.**

La cepa NRRL B-50972 de *Paenibacillus* sp. se inoculó sobre medio de agar sLB sólido y medio de agar sLB complementado con antibióticos a las concentraciones típicas. Las placas de agar se incubaron a 30 °C, y se evaluó el crecimiento después de 24, 48 y 72 horas. En la **Tabla 22** se muestra la sensibilidad de la cepa NRRL B-50972 de *Paenibacillus* sp. a cada uno de los antibióticos analizados.

**Tabla 22:** Sensibilidad a antibióticos de la cepa NRRL B-50972 de *Paenibacillus* sp.

Antibióticos (Concentración final)	Sensible/Resistente
Cloranfenicol (5 µg/ml)	Resistente
Eritromicina (5 µg/ml)	Sensible
Kanamicina (10 µg/ ml)	Sensible
Lincomicina (25 µg/ ml)	Resistente
Ácido nalidíxico (25 ug/ml)	Sensible
Polimixina B (10 µg/ml)	Resistente
Espectinomomicina (100-250 µg/ml)	Resistente (crecimiento, si bien reducido, después de 48 y 72 h de incubación)
Tetraciclina (5 µg/ ml)	Sensible

**Ejemplo 25. Caracterización de spoOA en la cepa NRRL B-50972 de *Paenibacillus* sp. y la cepa NRRL B-67129 de *Paenibacillus* sp.**

Se secuenciaron los genomas de la cepa NRRL B-50972 de *Paenibacillus* sp. y la cepa NRRL B-67129 de *Paenibacillus* sp. La comparación de las dos secuencias genómicas permitió identificar una diferencia característica en el gen spoOA

en las dos cepas. Como se muestra en el alineamiento de secuencias en la **FIG. 15**, la cepa NRRL B-50972 de *Paenibacillus* sp. y la cepa NRRL B-67129 de *Paenibacillus* sp. difieren en un nucleótido hacia el extremo 3' del gen spoOA. Se identificó una diferencia de un solo nucleótido y está indicada con una flecha roja debajo de la secuencia de la **FIG. 15**. Los números de nucleótido con respecto al primer nucleótido del gen spoOA están indicados arriba de las secuencias.

Un alineamiento de ortólogos de SpoOA de bacterias formadoras de endosporas indica que el cambio de nucleótidos en la secuencia codificante de la cepa NRRL B-67129 de *Paenibacillus* sp. da como resultado una sola sustitución de aminoácido en una región conservada (Véase la **FIG. 16**). Se alinearon las secuencias de aminoácidos de SpoOA de *Paenibacillus terrae* (NCBI, secuencia de referencia: WP\_044647644.1), *Paenibacillus polymyxa* SQR-21 (GenBank: AHM66630.1), *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis*, cepa 168 (NCBI, secuencia de referencia: NP\_390302.1), *Bacillus cereus* E33L (GenBank: AJI26924.1) y *Clostridium pasteurianum* DSM 525 (GenBank: AAA18883.1) con las secuencias de aminoácidos de SpoOA de la cepa NRRL B-50972 de *Paenibacillus* sp. y la cepa NRRL B-67129 de *Paenibacillus* sp. Una flecha en la **FIG. 16** indica una sustitución de un solo aminoácido en SpoOA de la cepa NRRL B-67129 de *Paenibacillus* sp.

### 15 Ejemplo 26. Estudios de la relación estructura-actividad con fusaricidinas, Paeniserinas y Paeniprolixinas

Se investigó la relación de estructura-actividad de varias fusaricidinas, Paeniserinas y Paeniprolixinas purificadas utilizando el ensayo *in vitro* que se describe en el Ejemplo 16. En un primer experimento, se compararon las parejas de fusaricidinas más comunes. En estas fusaricidinas se produce una variación en la posición de aminoácido (5) del anillo/cadena, ya sea por asparagina o glutamina. En este estudio, se comparó la fusaricidina A con la fusaricidina B, y se comparó LiF08a con LiF08b contra el patógeno vegetal *Alternaria solani* (ALTESO). En ambos casos, el análogo con asparagina era más de dos veces más potente que su equivalente con glutamina (véase la **FIG. 17**).

En otro experimento, se compararon las formas cíclicas frente a las formas acíclicas de las fusaricidinas. No queda claro si las formas acíclicas de las fusaricidinas son productos precursores o de degradación del compuesto final; sin embargo son ubicuos en el caldo de fermentación de la cepa NRRL B-50972 de *Paenibacillus* sp. y un contaminante común de las fusaricidinas purificadas a partir de este caldo de fermentación. Se comparó la actividad antifúngica de la fusaricidina A con una mezcla de LiF04c y LiF04d (análogos acíclicos de las fusaricidinas A y B) en el ensayo *in vitro* con el patógeno vegetal ALTESO. Hay un impacto significativo de la apertura del anillo peptídico en el enlace éster. Los análogos acíclicos eran inactivos a las concentraciones más altas evaluadas (véase la **FIG. 17**). Esto es importante en cuanto a la información estructural y para demostrar que estos compuestos que normalmente conforman las impurezas de las fusaricidinas por lo demás purificadas probablemente no contribuyan en la actividad antifúngica.

Además, se investigaron las sustituciones de aminoácidos en las posiciones de aminoácido (2) y (3) del anillo/cadena. Los análogos fusaricidina A, LiF05a, LiF06a y LiF08a difieren en esas posiciones por combinaciones ya sean de valina o de isoleucina. Se analizaron en el ensayo *in vitro* con el patógeno vegetal ALTESO. Los dos análogos más potentes eran la fusaricidina A (valina/valina) y LiF08a (isoleucina/isoleucina). Los otros dos análogos, que comprenden una mezcla de valina/isoleucina, eran más de tres veces menos potentes (véase la **FIG. 17**).

Además, se investigaron las diferencias en la actividad antifúngica con las nuevas Paeniserinas. Se analizaron, nuevamente contra ALTESO las diferencias en las posiciones de aminoácido (1) y (4) del anillo/cadena. Las fusaricidinas clásicas están restringidas a treonina en dichas posiciones, en tanto que las Paeniserinas pueden alternar entre treonina y serina. En este ensayo las Paeniserinas demostraron una actividad antifúngica similar a la fusaricidina A (véase la **FIG. 17**).

Además, se investigó la actividad antifúngica de las Paeniprolixinas (es decir, análogos con diferentes longitudes de cadena lateral) con ensayos *in vitro* contra los patógenos fúngicos ALTESO y *Colletotrichum lagenarium* (COLLLA). La fusaricidina clásica comprende una cadena lateral de ácido 15-guanidin-3-hidroxipentadecanoico. Se ha demostrado que las Paeniprolixinas tienen 2 de 4 grupos adicionales de metileno en la cadena. La longitud de la cadena lateral demostró un efecto pronunciado sobre la bioactividad y presentó diferencias con los distintos patógenos fúngicos. Contra ALTESO, la longitud no modificada de GHPD era la más potente, disminuyendo con cada grupo adicional de metileno. Contra COLLLA, la longitud más potente era GHPD + 2CH<sub>2</sub> (véase la **FIG. 17**).

### 50 Ejemplo 27. Actividad antifúngica sinérgica con mezclas de fusaricidina A con Paeniserina A1 o Paeniprolixina C1

Se usó el ensayo antifúngico *in vitro* en placa de 96 pocillos con el reactivo de viabilidad celular basado en resazurina PRESTOBLUE® (véase el Ejemplo 18) para evaluar la actividad antifúngica de las fusaricidinas, las Paeniserinas y las Paeniprolixinas solas y en combinaciones dobles. La actividad antifúngica se calculó con relación a valores del control no tratado empleando la siguiente ecuación:

$$\text{Eficacia} = (100 - \text{crecimiento relativo del control no tratado})$$

Un 100 % de eficacia indicaba que no hubo crecimiento fúngico en comparación con el control no tratado, y un 0 % de eficacia indicaba que no hubo inhibición del crecimiento fúngico en comparación con el control no tratado.

En las **tablas 23 y 24** se muestra claramente que la actividad observada de las combinaciones de compuestos activos

de acuerdo con la invención era mayor que la actividad calculada, es decir, estaba presente un efecto sinérgico.

**Tabla 23: Actividad antifúngica contra *Alternaria solani* de la fusaricidina A sola, la Paeniserina A1 sola y de fusaricidina A + Paeniserina A1**

Compuestos activos	Índice de aplicación del compuesto activo en mg/ml	Eficacia en %	
		hallada*	calc.**
Fusaricidina A	0,25	39,0	
Paeniserina A1	0,0083	0,5	
Fusaricidina A + Paeniserina A1	0,25 + 0,0083	48,2	39,3
* hallada = actividad hallada			
** calc. = actividad calculada utilizando la fórmula de Colby			

5 **Tabla 24: Actividad antifúngica contra *Alternaria solani* de la fusaricidina A sola, la Paeniprolixina sola y de fusaricidina A + Paeniprolixina C1**

Compuestos activos	Índice de aplicación del compuesto activo en mg/ml	Eficacia en %	
		hallada*	calc.**
Fusaricidina A	0,25	42,0	
Paeniprolixina C1	0,0083	25,4	
Fusaricidina A + Paeniprolixina C1	0,25 + 0,025	68,1	56,7
* hallada = actividad hallada			
** calc.= actividad calculada utilizando la fórmula de Colby			

A menos que se definan de otra manera, todos los términos técnicos y científicos en el presente documento tienen el mismo significado que comúnmente entiende un experto en la materia a la que pertenece la presente invención.

- 10 Se entiende que la invención desvelada no se limita a la metodología, protocolos y materiales particulares descritos, ya que estos pueden variar. También se entiende que la terminología utilizada en el presente documento tiene el fin de describir realizaciones particulares solamente.

- 15 Los expertos en la materia reconocerán, o podrán determinar utilizando no más que la experimentación de rutina, muchos equivalentes a las realizaciones específicas de la invención descritas en el presente documento. Se pretende que dichos equivalentes estén abarcados por las siguientes reivindicaciones.

#### LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Bayer CropScience LP
- <120> UNA NUEVA CEPA DE *PAENIBACILLUS*, COMPUESTOS ANTIFÚNGICOS Y PROCEDIMIENTOS PARA SU USO
- 20 <130> BCS159002 WO
- <150> US 62/138.765
- <151> 26-03-2015
- <150> US 62/232.205
- <151> 24-09-2015
- 25 <160> 20
- <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- <211> 550
- <212> PRT
- 30 <213> *Paenibacillus peoriae*

ES 2 804 732 T3

<400> 1

Asn Ala Leu Val Tyr Asp Pro Val Thr Ile Glu Gln Ile Lys Gly His  
 1 5 10 15  
 Leu Val His Leu Met Glu Gln Ile Val Glu Asn Pro Ala Ile Ser Val  
 20 25 30  
 Asp Ala Leu Glu Leu Val Thr Pro Gln Glu Arg Glu Gln Ile Leu Asn  
 35 40 45  
 Val Trp Gly Asn Thr Lys Gly Ile Tyr Glu His Cys Asn Thr Phe His  
 50 55 60  
 Gly Leu Leu Glu Glu Gln Ala Gly Arg Thr Pro Asp Ala Thr Ala Ile  
 65 70 75 80  
 Trp Phe Glu Asp Glu Ser Leu Thr Tyr Ala Glu Leu Asn Ala Lys Ala  
 85 90 95  
 Asn Gly Leu Ala Arg Arg Leu Arg Thr Gln Gly Ile Lys Thr Gly Asp  
 100 105 110  
 Leu Val Gly Leu Ile Ala Glu Arg Ser Leu Glu Met Ile Val Gly Ile  
 115 120 125  
 Tyr Gly Ile Met Lys Ala Gly Gly Ala Tyr Val Pro Ile Asp Pro Glu  
 130 135 140  
 Tyr Pro Lys Glu Arg Ile Ser Tyr Met Leu Glu Asp Ser Gly Ala Lys



ES 2 804 732 T3

Gly Leu Ala Arg Gly Tyr His Asn Gln Pro Glu Leu Met Asp Glu Lys  
 405 410 415

Phe Val Asp Asn Pro Phe Ala Pro Gly Glu Arg Met Tyr Arg Thr Gly  
 420 425 430

Asp Leu Val Arg Trp Leu Pro Asn Gly Thr Ile Glu Tyr Leu Gly Arg  
 435 440 445

Ile Asp His Gln Val Lys Ile Arg Gly Tyr Arg Ile Glu Leu Gly Glu  
 450 455 460

Val Glu Ala Gln Met Leu Arg Val Pro Ser Val Gln Glu Val Val Ala  
 465 470 475 480

Met Ala Ala Glu Gly Glu Asp Gly Tyr Lys Asp Leu Val Ala Tyr Phe  
 485 490 495

Val Ala Ala Gln Lys Leu Glu Val Ser Glu Leu Arg Ala Val Leu Ser  
 500 505 510

Glu Met Leu Pro Gly Tyr Met Ile Pro Ser Arg Phe Ile Gln Leu Glu  
 515 520 525

Asp Met Pro Leu Thr Ser Asn Gly Lys Ile Asp Arg Lys Ala Leu Gln  
 530 535 540

Gly Glu Arg Gly Trp Ala  
 545 550

- <210> 2
- <211> 550
- <212> PRT
- <213> *Paenibacillus polymyxa*

5

<400> 2

Asn Ala Leu Val Tyr Asp Gln Val Thr Ile Gly Gln Ile Lys Gly His  
 1 5 10 15

Leu Val His Leu Met Glu Gln Ile Val Glu Asn Pro Ala Ile Ser Val  
 20 25 30

Asp Ala Leu Glu Leu Val Thr Pro Gln Glu Arg Glu Gln Ile Leu Asn  
 35 40 45

Val Trp Gly Asn Met Lys Gly Ile Tyr Glu His Cys Asn Thr Phe His  
 50 55 60

ES 2 804 732 T3

Gly Leu Leu Glu Glu Gln Ala Gly Arg Thr Pro Asp Ala Thr Ala Ile  
65 70 75 80

Trp Phe Glu Asp Glu Ser Leu Thr Tyr Ala Glu Leu Asn Ala Lys Ala  
85 90 95

Asn Gly Leu Ala Arg Arg Leu Arg Thr Gln Gly Ile Lys Thr Gly Asp  
100 105 110

Leu Val Gly Leu Ile Ala Glu Arg Ser Leu Glu Met Ile Val Gly Ile  
115 120 125

Tyr Gly Ile Met Lys Ala Gly Gly Ala Tyr Val Pro Ile Asp Pro Glu  
130 135 140

Tyr Pro Lys Glu Arg Ile Ser Tyr Met Leu Glu Asp Ser Gly Ala Lys  
145 150 155 160

Leu Ile Leu Thr Gln Ala His Leu Leu Glu His Leu Gly Trp Thr Glu  
165 170 175

Asn Val Leu Leu Leu Asp Glu Ser Ser Thr Tyr Asp Ala Asp Thr Ser  
180 185 190

Asn Leu Glu Asp Thr Ala Gly Pro Asp Asp Leu Ala Tyr Val Ile Tyr  
195 200 205

Thr Ser Gly Thr Thr Gly Gln Pro Lys Gly Val Leu Val Glu His Arg  
210 215 220

Gly Leu Pro Asn Leu Ser Asn Val Tyr Gly Ala His Phe Glu Val Thr  
225 230 235 240

Pro Gln Asp Arg Ile Val Gln Phe Ala Ser Leu Ser Phe Asp Ala Ser  
245 250 255

Val Ser Glu Ile Leu Thr Ala Leu Ser His Gly Gly Val Leu Cys Ile  
260 265 270

Pro Ser Thr Glu Asp Ile Leu Asp His Ala Leu Phe Glu Gln Phe Met  
275 280 285

Asn Asp Lys Gly Ile Thr Val Ala Thr Leu Pro Pro Ala Tyr Ala Ile  
290 295 300

His Leu Asp Pro Glu Arg Leu Pro Thr Leu Arg Cys Leu Leu Thr Ala  
305 310 315 320

ES 2 804 732 T3

Gly Ser Ala Ala Ser Val Glu Leu Ile Glu Glu Trp Arg Lys His Val  
 325 330 335

Arg Tyr Ser Asn Gly Tyr Gly Pro Thr Glu Asp Ser Val Cys Thr Thr  
 340 345 350

Ile Trp Ser Val Pro Asp Ser Glu Glu Ala Thr Asp Ile Val Ser Ile  
 355 360 365

Gly Arg Pro Ile Ala Asn His Ser Val Tyr Ile Leu Asp Asp His Phe  
 370 375 380

Arg Leu Gln Pro Val Gly Val Ala Gly Glu Leu Cys Ile Ser Ser Ile  
 385 390 395 400

Gly Leu Ala Arg Gly Tyr His Asn Arg Pro Glu Leu Met Asp Glu Lys  
 405 410 415

Phe Val Asp Asn Pro Phe Ala Pro Gly Glu Arg Met Tyr Arg Thr Gly  
 420 425 430

Asp Leu Val Arg Trp Leu Pro Asn Gly Thr Ile Glu Tyr Leu Gly Arg  
 435 440 445

Ile Asp His Gln Val Lys Ile Arg Gly Tyr Arg Ile Glu Leu Gly Glu  
 450 455 460

Val Glu Ala Gln Met Leu Arg Val Pro Ser Val Gln Glu Val Val Ala  
 465 470 475 480

Met Ala Val Glu Gly Asp Asp Gly Tyr Lys Asp Leu Val Ala Tyr Phe  
 485 490 495

Val Ala Ala Gln Lys Leu Glu Val Ser Glu Leu Arg Ala Val Leu Ser  
 500 505 510

Glu Ile Leu Pro Gly Tyr Met Ile Pro Ser Arg Phe Ile Gln Leu Glu  
 515 520 525

Asp Met Pro Leu Thr Ser Asn Gly Lys Ile Asp Arg Lys Ala Leu Gln  
 530 535 540

Gly Glu Arg Gly Trp Ala  
 545 550

<210> 3  
 <211> 550  
 <212> PRT  
 <213> *Paenibacillus polymyxa*

ES 2 804 732 T3

<400> 3

Asn Ala Leu Val Tyr Asp Pro Val Thr Ile Glu Gln Ile Lys Gly His  
 1 5 10 15  
 Leu Val His Leu Met Glu Gln Ile Val Glu Asn Pro Ala Ile Ser Val  
 20 25 30  
 Asp Ala Leu Glu Leu Val Thr Pro Gln Glu Arg Glu Gln Ile Leu Asn  
 35 40 45  
 Val Trp Gly Asn Thr Lys Gly Ile Tyr Glu His Cys Asn Thr Phe His  
 50 55 60  
 Gly Leu Leu Glu Glu Gln Ala Gly Arg Thr Pro Asp Ala Thr Ala Ile  
 65 70 75 80  
 Trp Phe Glu Asp Glu Ser Leu Thr Tyr Ala Glu Leu Asn Ala Lys Ala  
 85 90 95  
 Asn Gly Leu Ala Arg Arg Leu Arg Thr Gln Gly Ile Lys Thr Gly Asp  
 100 105 110  
 Leu Val Gly Leu Ile Ala Glu Arg Ser Leu Glu Met Ile Val Gly Ile  
 115 120 125  
 Tyr Gly Ile Met Lys Ala Gly Gly Ala Tyr Val Pro Ile Asp Pro Glu  
 130 135 140  
 Tyr Pro Lys Glu Arg Ile Ser Tyr Met Leu Glu Asp Ser Gly Ala Lys  
 145 150 155 160  
 Leu Ile Leu Thr Gln Ala His Leu Leu Glu His Leu Gly Trp Thr Glu  
 165 170 175  
 Asn Val Leu Leu Leu Asp Glu Ser Ser Thr Tyr Asp Ala Asp Thr Ser  
 180 185 190  
 Asn Leu Glu Asp Thr Ala Gly Pro Asp Asp Leu Ala Tyr Val Ile Tyr  
 195 200 205  
 Thr Ser Gly Thr Thr Gly Gln Pro Lys Gly Val Leu Val Glu His Arg  
 210 215 220  
 Gly Leu Pro Asn Leu Ser Asp Val Tyr Gly Thr His Phe Glu Val Thr  
 225 230 235 240

ES 2 804 732 T3

Pro Gln Asp Arg Ile Val Gln Phe Ala Ser Leu Ser Phe Asp Ala Ser  
 245 250 255  
 Val Ser Glu Ile Leu Thr Ala Leu Ser His Gly Gly Val Leu Cys Ile  
 260 265 270  
 Pro Ser Thr Gln Asp Ile Leu Asp His Ala Leu Phe Glu Gln Phe Met  
 275 280 285  
 Asn Asp Lys Gly Ile Thr Val Ala Thr Leu Pro Pro Ala Tyr Ala Ile  
 290 295 300  
 His Leu Asp Pro Glu Arg Leu Pro Thr Leu Arg Cys Leu Leu Thr Ala  
 305 310 315 320  
 Gly Ser Ala Ala Ser Val Glu Leu Ile Glu Glu Trp Arg Lys His Val  
 325 330 335  
 Arg Tyr Ser Asn Gly Tyr Gly Pro Thr Glu Asp Ser Val Cys Thr Thr  
 340 345 350  
 Ile Trp Ser Val Pro Asp Ser Glu Glu Ala Thr Asp Ile Val Ser Ile  
 355 360 365  
 Gly Arg Pro Ile Ala Asn His Ser Val Tyr Ile Leu Asp Asp His Phe  
 370 375 380  
 Arg Leu Gln Pro Val Gly Val Ala Gly Glu Leu Cys Ile Ser Ser Ile  
 385 390 395 400  
 Gly Leu Ala Arg Gly Tyr His Asn Arg Pro Glu Leu Met Asp Glu Lys  
 405 410 415  
 Phe Val Asp Asn Pro Phe Ala Pro Gly Glu Arg Met Tyr Arg Thr Gly  
 420 425 430  
 Asp Leu Val Arg Trp Leu Pro Asn Gly Thr Ile Glu Tyr Leu Gly Arg  
 435 440 445  
 Ile Asp His Gln Val Lys Ile Arg Gly Tyr Arg Ile Glu Leu Gly Glu  
 450 455 460  
 Val Glu Ala Gln Met Leu Arg Val Pro Ser Val Gln Glu Val Val Ala  
 465 470 475 480  
 Met Ala Val Glu Gly Asp Asp Gly Tyr Lys Asp Leu Val Ala Tyr Phe

ES 2 804 732 T3

485 490 495

Val Ala Ala Gln Lys Leu Glu Val Ser Glu Leu Arg Ala Val Leu Ser  
500 505 510

Glu Met Leu Pro Gly Tyr Met Ile Pro Ser Arg Phe Ile Gln Leu Glu  
515 520 525

Asp Met Pro Leu Thr Ser Asn Gly Lys Ile Asp Arg Lys Ala Leu Lys  
530 535 540

Gly Glu Arg Gly Trp Ala  
545 550

<210> 4  
 <211> 550  
 <212> PRT  
 <213> *Paenibacillus polymyxa*  
 <400> 4

5

Asn Ala Leu Val Tyr Asp Pro Val Thr Ile Gly Gln Ile Lys Gly His  
1 5 10 15

Leu Val His Leu Met Glu Gln Ile Val Glu Asn Pro Ala Ile Ser Val  
20 25 30

Asp Ala Leu Glu Leu Ile Thr Pro Gln Glu Arg Glu Gln Ile Leu Asn  
35 40 45

Val Trp Gly Asn Thr Lys Ala Ile Tyr Glu His Tyr Asn Thr Phe His  
50 55 60

Gly Leu Leu Glu Glu Gln Ala Gly Arg Thr Pro Asp Ala Ala Ala Ile  
65 70 75 80

Trp Phe Glu Asp Glu Ser Leu Thr Tyr Ala Glu Leu Asn Ala Lys Ala  
85 90 95

Asn Gly Leu Ala Arg Arg Leu Arg Thr Gln Gly Ile Lys Thr Gly Asp  
100 105 110

Leu Val Gly Leu Ile Ala Glu Arg Ser Leu Glu Met Ile Val Gly Ile  
115 120 125

Tyr Gly Ile Met Lys Ala Gly Gly Ala Tyr Val Pro Ile Asp Pro Glu  
130 135 140

Tyr Pro Gln Glu Arg Ile Ser Tyr Met Leu Glu Asp Ser Gly Ala Lys



ES 2 804 732 T3

Gly Leu Ala Arg Gly Tyr His Asn Arg Pro Glu Leu Met Asp Glu Lys  
 405 410 415

Phe Val Asp Asn Pro Phe Ala Pro Gly Glu Arg Met Tyr Arg Thr Gly  
 420 425 430

Asp Leu Val Arg Trp Leu Pro Asn Gly Asn Ile Glu Tyr Leu Gly Arg  
 435 440 445

Ile Asp His Gln Val Lys Ile Arg Gly Tyr Arg Ile Glu Leu Gly Glu  
 450 455 460

Val Glu Ala Gln Met Leu Arg Val Pro Ser Val Gln Glu Val Val Ala  
 465 470 475 480

Met Ala Val Glu Gly Asp Asp Gly Tyr Lys Asp Leu Val Ala Tyr Phe  
 485 490 495

Val Ala Ala Gln Lys Leu Glu Val Ser Glu Leu Arg Ala Val Leu Ser  
 500 505 510

Glu Met Leu Pro Gly Tyr Met Ile Pro Ser Arg Phe Ile Gln Leu Glu  
 515 520 525

Asp Met Leu Leu Thr Ser Asn Gly Lys Ile Asp Arg Lys Ala Leu Gln  
 530 535 540

Gly Glu Arg Gly Trp Ala  
 545 550

<210> 5  
 <211> 550  
 <212> PRT  
 <213> *Paenibacillus polymyxa*

5

<400> 5

Asn Ala Leu Val Tyr Asp Gln Val Thr Ile Glu Gln Ile Lys Glu His  
 1 5 10 15

Leu Val His Leu Met Glu Gln Ile Ile Glu Asn Pro Ala Thr Ser Val  
 20 25 30

Asp Ala Leu Glu Leu Val Thr Pro Gln Glu Arg Glu Gln Ile Leu Asn  
 35 40 45

Val Trp Gly Asn Thr Asn Val Cys Tyr Glu His Asn Ser Thr Phe His  
 50 55 60

ES 2 804 732 T3

Gly Leu Leu Glu Glu Gln Ala Gly Arg Thr Pro Asp Ala Thr Ala Leu  
 65 70 75 80  
  
 Leu Phe Gly Asp Glu Met Leu Thr Tyr Ala Glu Leu Asn Ala Lys Ala  
 85 90 95  
  
 Asn Gly Leu Ala Arg Arg Leu Arg Thr Gln Gly Ile Lys Thr Gly Asp  
 100 105 110  
  
 Leu Val Gly Leu Ile Ala Glu Arg Ser Leu Glu Met Ile Val Gly Ile  
 115 120 125  
  
 Tyr Gly Ile Met Lys Ala Gly Gly Ala Tyr Val Pro Ile Asp Pro Glu  
 130 135 140  
  
 Tyr Pro Lys Glu Arg Ile Ser Tyr Met Leu Glu Asp Ser Gly Ala Lys  
 145 150 155 160  
  
 Leu Ile Leu Thr Gln Ala His Leu Leu Glu His Leu Gly Trp Thr Glu  
 165 170 175  
  
 Ser Val Leu Leu Leu Asp Glu Ser Ser Thr Tyr Asp Ala Asp Thr Ser  
 180 185 190  
  
 Lys Leu Glu Asp Thr Ala Gly Pro Asp Asp Leu Ala Tyr Val Ile Tyr  
 195 200 205  
  
 Thr Ser Gly Thr Thr Gly Gln Pro Lys Gly Val Leu Val Glu His Arg  
 210 215 220  
  
 Gly Leu Pro Asn Leu Ser Asp Val Tyr Gly Ala His Phe Glu Val Thr  
 225 230 235 240  
  
 Pro Gln Asp Arg Ile Val Gln Phe Ala Ser Leu Ser Phe Asp Ala Ser  
 245 250 255  
  
 Val Ser Glu Ile Leu Thr Ala Leu Ser His Gly Gly Val Leu Cys Ile  
 260 265 270  
  
 Pro Ser Thr Gln Asp Ile Leu Asp His Val Leu Phe Glu Gln Phe Met  
 275 280 285  
  
 Asn Asp Lys Gly Ile Thr Val Ala Thr Leu Pro Pro Ala Tyr Ala Ile  
 290 295 300  
  
 His Leu Asp Pro Glu Arg Leu Pro Thr Leu Arg Cys Leu Leu Thr Ala  
 305 310 315 320

ES 2 804 732 T3

Gly Ser Ala Ala Ser Val Glu Leu Ile Glu Glu Trp Arg Lys His Val  
 325 330 335

Arg Tyr Ser Asn Gly Tyr Gly Pro Thr Glu Asp Ser Val Cys Thr Thr  
 340 345 350

Ile Trp Ser Val Pro Asp Ser Glu Gly Ala Thr Asp Ile Val Ser Ile  
 355 360 365

Gly Arg Pro Ile Ala Asn His Ser Val Tyr Ile Leu Asp Asp His Phe  
 370 375 380

Arg Leu Gln Pro Val Gly Val Ala Gly Glu Leu Cys Ile Ser Gly Ile  
 385 390 395 400

Gly Leu Ala Arg Gly Tyr His Asn Gln Pro Glu Leu Met Asp Glu Lys  
 405 410 415

Phe Val Asp Asn Pro Phe Ala Pro Gly Glu Arg Met Tyr Arg Thr Gly  
 420 425 430

Asp Leu Val Arg Trp Leu Pro Asn Gly Thr Ile Glu Tyr Leu Gly Arg  
 435 440 445

Ile Asp His Gln Val Lys Ile Arg Gly Tyr Arg Ile Glu Leu Gly Glu  
 450 455 460

Val Glu Ala Gln Ile Leu Arg Val Pro Ser Val Gln Glu Val Val Ala  
 465 470 475 480

Met Ala Val Glu Gly Asp Asp Gly Tyr Lys Asp Leu Val Ala Tyr Phe  
 485 490 495

Val Ala Ala Gln Lys Leu Glu Val Ser Glu Leu Arg Ala Val Leu Ser  
 500 505 510

Glu Met Leu Pro Gly Tyr Met Ile Pro Ser Arg Phe Ile Gln Leu Asp  
 515 520 525

Asp Met Pro Leu Thr Ser Asn Gly Lys Val Asp Arg Lys Ala Leu Gln  
 530 535 540

Gly Glu Arg Gly Trp Ala  
 545 550

<210> 6  
 <211> 550  
 <212> PRT  
 <213> *Paenibacillus polymyxa*

ES 2 804 732 T3

<400> 6

Asn Ala Leu Val Tyr Asp Pro Ala Thr Ile Glu Gln Ile Lys Gly His  
 1 5 10 15

Leu Phe His Leu Met Glu Gln Ile Val Glu Asn Pro Ala Ile Ser Val  
 20 25 30

Asp Ala Leu Glu Leu Val Thr Pro Gln Glu Arg Glu Gln Ile Leu Ser  
 35 40 45

Val Trp Gly Glu Thr Glu Ala Ser Ser Lys His Arg Thr Thr Phe His  
 50 55 60

Gly Leu Leu Glu Glu Gln Ala Ala Arg Thr Pro Asp Ala Thr Ala Ile  
 65 70 75 80

Leu Phe Glu Asn Glu Met Leu Thr Tyr Ala Glu Leu Asn Ala Lys Ala  
 85 90 95

Asn Gly Leu Ala Arg Arg Leu Arg Ala Glu Gly Ile Lys Thr Gly Asp  
 100 105 110

Leu Val Gly Leu Leu Val Glu Arg Ser Thr Asp Met Ile Val Gly Met  
 115 120 125

Tyr Gly Ile Met Lys Ala Gly Gly Ala Tyr Val Pro Ile Asp Pro Glu  
 130 135 140

Tyr Pro Lys Glu Arg Ile Asn Tyr Met Leu Glu Asp Ser Gly Thr Lys  
 145 150 155 160

Met Ile Leu Thr Gln Ala His Leu Leu Glu His Ile Gly Trp Met Gly  
 165 170 175

Asn Val Leu Leu Leu Glu Glu Pro Ser Thr Tyr Asp Ala Asp Glu Ser  
 180 185 190

Asn Leu Lys Asp Thr Ala Asp Ser Asp Asp Leu Ala Tyr Val Ile Tyr  
 195 200 205

Thr Ser Gly Thr Thr Gly Gln Pro Lys Gly Val Leu Val Glu His Arg  
 210 215 220

Gly Leu Arg Asn Leu Ser Asp Val Tyr Arg Gly Leu Phe Glu Val Thr  
 225 230 235 240

ES 2 804 732 T3

Pro Gln Asp Arg Ile Val Gln Phe Ala Ser Leu Ser Phe Asp Ala Ser  
 245 250 255

Val Ser Glu Ile Ile Thr Ala Leu Ser His Gly Ala Thr Leu Cys Ile  
 260 265 270

Pro Ser Thr Gln Asp Ile Leu Asp His Ala Leu Phe Glu Gln Phe Met  
 275 280 285

Asn Ser Lys Ala Ile Thr Ile Ala Thr Leu Pro Pro Ala Tyr Ile Ile  
 290 295 300

His Leu Glu Pro Glu Arg Leu Pro Ala Leu Arg Cys Leu Leu Thr Ala  
 305 310 315 320

Gly Ser Ala Thr Ser Val Glu Leu Ile Glu Lys Trp Arg Lys His Val  
 325 330 335

Gln Tyr Phe Asn Gly Tyr Gly Pro Thr Glu Asp Ser Val Cys Thr Thr  
 340 345 350

Met Trp Thr Val Pro Asp Ser Glu Glu Thr Met Glu Arg Val Ser Ile  
 355 360 365

Gly Gln Pro Ile Ala Asn His Arg Val Tyr Ile Leu Asp Asp His Phe  
 370 375 380

Arg Val Leu Pro Val Gly Val Ala Gly Glu Leu Cys Ile Ser Gly Ile  
 385 390 395 400

Gly Leu Ala Arg Gly Tyr His Asn Gln Pro Ala Leu Met Asp Glu Lys  
 405 410 415

Phe Val Asp Asn Pro Phe Thr Pro Gly Glu Arg Met Tyr Arg Thr Gly  
 420 425 430

Asp Leu Val Arg Trp Leu Pro Asp Gly Thr Ile Glu Tyr Leu Gly Arg  
 435 440 445

Ile Asp His Gln Val Lys Ile Arg Gly Tyr Arg Ile Glu Leu Gly Glu  
 450 455 460

Val Glu Ala His Met Leu Arg Val Pro Phe Val Gln Glu Val Val Ala  
 465 470 475 480

Leu Ala Val Glu Ser Glu Asp Gly Tyr Lys Asp Leu Val Ala Tyr Phe

ES 2 804 732 T3

485 490 495

Val Ala Ala Gln Lys Leu Glu Val Ser Glu Leu Arg Ala Val Leu Ser  
500 505 510

Glu Met Leu Pro Gly Tyr Met Ile Pro Ser Arg Phe Val Gln Leu Glu  
515 520 525

Asp Met Pro Leu Thr Ser Asn Gly Lys Ile Asp Arg Lys Ala Leu Gln  
530 535 540

Gly Glu Gln Gly Trp Ala  
545 550

<210> 7  
 <211> 550  
 <212> PRT  
 5 <213> *Paenibacillus polymyxa*  
 <400> 7

Asn Ala Leu Val Tyr Asp Pro Ser Thr Ile Glu Gln Ile Lys Gly His  
1 5 10 15

Leu Phe His Leu Met Glu Gln Ile Val Glu Asn Pro Ala Ile Ser Val  
20 25 30

Asp Ala Leu Glu Leu Val Thr Pro Gln Glu Arg Glu Gln Ile Leu Asn  
35 40 45

Val Trp Gly Glu Thr Glu Ala Ser Ser Lys His Arg Thr Thr Phe His  
50 55 60

Gly Leu Leu Glu Glu Gln Ala Ala Arg Thr Pro Asp Ala Thr Ala Ile  
65 70 75 80

Leu Phe Glu Asn Glu Met Leu Thr Tyr Ala Glu Leu Asn Ala Lys Ala  
85 90 95

Asn Gly Leu Ala Arg Arg Leu Arg Ala Glu Gly Ile Lys Thr Gly Asp  
100 105 110

Leu Val Gly Leu Leu Val Glu Arg Ser Thr Asp Met Ile Val Gly Met  
115 120 125

Tyr Gly Ile Met Lys Ala Gly Gly Ala Tyr Val Pro Met Asp Pro Glu  
130 135 140

Tyr Pro Lys Glu Arg Ile Asn Tyr Met Leu Glu Asp Ser Gly Thr Lys



ES 2 804 732 T3

Gly Leu Ala Arg Gly Tyr His Asn Gln Pro Ala Leu Met Asp Glu Lys  
 405 410 415

Phe Val Asp Asn Pro Phe Thr Pro Gly Glu Arg Met Tyr Arg Thr Gly  
 420 425 430

Asp Leu Val Arg Trp Leu Pro Asp Gly Thr Ile Glu Tyr Leu Gly Arg  
 435 440 445

Ile Asp His Gln Val Lys Ile Arg Gly Tyr Arg Ile Glu Leu Gly Glu  
 450 455 460

Val Glu Ala His Met Leu Arg Val Pro Phe Val Gln Glu Val Val Ala  
 465 470 475 480

Leu Ala Val Glu Ser Glu Asp Gly Tyr Lys Asp Leu Val Ala Tyr Phe  
 485 490 495

Val Ala Ala Gln Lys Leu Glu Val Ser Glu Leu Arg Ala Val Leu Ser  
 500 505 510

Glu Met Leu Pro Gly Tyr Met Ile Pro Ser Arg Phe Val Gln Leu Glu  
 515 520 525

Asp Met Pro Leu Thr Ser Asn Gly Lys Ile Asp Arg Lys Ala Leu Gln  
 530 535 540

Gly Glu Gln Gly Trp Ala  
 545 550

<210> 8  
 <211> 550  
 <212> PRT  
 <213> *Paenibacillus polymyxa*

5

<400> 8

Asn Ala Leu Val Tyr Asp Pro Ala Thr Ile Glu Gln Ile Lys Gly His  
 1 5 10 15

Leu Phe His Leu Met Glu Gln Ile Val Glu Asn Pro Ala Ile Ser Val  
 20 25 30

Asp Ala Leu Glu Leu Val Thr Pro Gln Glu Arg Glu Gln Ile Leu Asn  
 35 40 45

Val Trp Gly Asp Thr Gly Ala Ser Ser Lys His Arg Thr Thr Phe His  
 50 55 60

ES 2 804 732 T3

Gly Leu Leu Glu Glu Gln Ala Gly Arg Thr Pro Asp Ala Thr Ala Ile  
65 70 75 80

Val Phe Glu Asn Glu Val Leu Thr Tyr Ala Glu Leu Asn Ala Lys Ala  
85 90 95

Asn Gly Leu Ala Arg Arg Leu Arg Ala Glu Gly Ile Lys Thr Gly Asp  
100 105 110

Leu Val Gly Leu Ile Val Glu Arg Ser Thr Asp Met Ile Val Gly Met  
115 120 125

Tyr Gly Ile Met Lys Ala Gly Gly Ala Tyr Val Pro Ile Asp Pro Glu  
130 135 140

Tyr Pro Lys Glu Arg Ile Asn Tyr Met Leu Glu Asp Ser Gly Thr Lys  
145 150 155 160

Met Ile Leu Ala Gln Ala His Leu Leu Glu His Arg Gly Trp Thr Gly  
165 170 175

Asn Val Leu Leu Leu Asp Glu Pro Ser Thr Tyr Asp Ala Asp Thr Ser  
180 185 190

Asn Leu Lys Asp Thr Ala Asp Pro Asp Asp Leu Ala Tyr Val Ile Tyr  
195 200 205

Thr Ser Gly Thr Thr Gly Arg Pro Lys Gly Val Leu Val Glu His Arg  
210 215 220

Gly Leu Gln Asn Leu Ser Asp Val Tyr Arg Gly Leu Phe Glu Val Thr  
225 230 235 240

Pro Gln Asp Arg Ile Val Gln Phe Ala Ser Leu Ser Phe Asp Ala Ser  
245 250 255

Val Ser Glu Ile Leu Thr Thr Leu Ser His Gly Ala Thr Leu Cys Ile  
260 265 270

Pro Ser Thr Gln Glu Ile Leu Asp His Ala Leu Phe Glu Gln Phe Met  
275 280 285

Asn Asp Lys Gly Ile Thr Val Ala Thr Leu Pro Pro Ala Tyr Ala Ile  
290 295 300

His Leu Glu Pro Glu Arg Leu Pro Thr Leu Arg Cys Leu Leu Thr Ala  
305 310 315 320

ES 2 804 732 T3

Gly Ser Ala Thr Ser Val Glu Leu Ile Glu Lys Trp Arg Lys His Val  
 325 330 335

Gln Tyr Phe Asn Ala Tyr Gly Pro Thr Glu Asp Ser Val Cys Thr Thr  
 340 345 350

Ile Trp Asn Ala Gln Asn Ser Glu Glu Thr Val Gly Ile Val Ser Ile  
 355 360 365

Gly Gln Pro Ile Ala Asn His Arg Val Tyr Ile Leu Asp Glu His Phe  
 370 375 380

Arg Leu Leu Pro Val Gly Val Ala Gly Glu Leu Cys Ile Ser Gly Ile  
 385 390 395 400

Gly Leu Ala Arg Gly Tyr His Asn Arg Pro Glu Leu Met Asp Glu Lys  
 405 410 415

Phe Val Asp Asn Pro Tyr Ala Pro Gly Glu Arg Met Tyr Arg Thr Gly  
 420 425 430

Asp Leu Val Arg Trp Leu Ser Asn Gly Thr Ile Glu Tyr Leu Gly Arg  
 435 440 445

Ile Asp His Gln Val Lys Ile Arg Gly Tyr Arg Ile Glu Leu Gly Glu  
 450 455 460

Val Glu Ala His Met Leu Arg Val Pro Ser Val Gln Glu Val Val Val  
 465 470 475 480

Leu Ala Val Glu Ser Asp Asp Gly Tyr Lys Asp Leu Val Ala Tyr Phe  
 485 490 495

Val Ala Ala Gln Lys Leu Glu Val Ser Glu Leu Arg Ala Asp Leu Ser  
 500 505 510

Glu Met Leu Pro Gly Tyr Met Ile Pro Ser Arg Phe Ile Gln Leu Glu  
 515 520 525

Asp Met Pro Leu Thr Ser Asn Gly Lys Ile Asp Arg Lys Ala Leu Gln  
 530 535 540

Gly Glu Arg Gly Trp Ala  
 545 550

<210> 9  
 <211> 550  
 <212> PRT  
 <213> *Paenibacillus polymyxa*

ES 2 804 732 T3

<400> 9

Asn Ala Leu Val Tyr Asp Pro Ala Thr Ile Glu Gln Ile Lys Gly His  
 1 5 10 15

Leu Phe His Leu Met Glu Gln Ile Val Glu Asn Pro Ala Ile Ser Val  
 20 25 30

Asp Ala Leu Glu Leu Val Thr Pro Gln Glu Arg Glu Gln Ile Leu Asn  
 35 40 45

Val Trp Gly Asp Thr Gly Ala Ser Ser Lys His Arg Thr Thr Phe His  
 50 55 60

Gly Leu Leu Glu Glu Gln Ala Gly Arg Thr Pro Asp Ala Thr Ala Ile  
 65 70 75 80

Val Phe Glu Asn Glu Val Leu Thr Tyr Ala Glu Leu Asn Ala Lys Ala  
 85 90 95

Asn Gly Leu Ala Arg Arg Leu Arg Ala Glu Gly Ile Lys Thr Gly Asp  
 100 105 110

Leu Val Gly Leu Ile Val Glu Arg Ser Thr Asp Met Ile Val Gly Met  
 115 120 125

Tyr Gly Ile Met Lys Ala Gly Gly Ala Tyr Val Pro Ile Asp Pro Glu  
 130 135 140

Tyr Pro Lys Glu Arg Ile Asn Tyr Met Leu Glu Asp Ser Gly Thr Lys  
 145 150 155 160

Met Ile Leu Ala Gln Ala His Leu Leu Glu His Arg Gly Trp Thr Gly  
 165 170 175

Asn Val Leu Leu Leu Asp Glu Pro Ser Thr Tyr Asp Ala Asp Thr Ser  
 180 185 190

Asn Leu Lys Asp Thr Ala Asp Pro Asp Asp Leu Ala Tyr Val Ile Tyr  
 195 200 205

Thr Ser Gly Thr Thr Gly Arg Pro Lys Gly Val Leu Val Glu His Arg  
 210 215 220

Gly Leu Gln Asn Leu Ser Asp Val Tyr Arg Gly Leu Phe Glu Val Thr  
 225 230 235 240

ES 2 804 732 T3

Pro Gln Asp Arg Ile Val Gln Phe Ala Ser Leu Ser Phe Asp Ala Ser  
 245 250 255

Val Ser Glu Ile Leu Thr Thr Leu Ser His Gly Ala Thr Leu Cys Ile  
 260 265 270

Pro Ser Thr Gln Glu Ile Leu Asp His Ala Leu Phe Glu Gln Phe Met  
 275 280 285

Asn Asp Lys Gly Ile Thr Val Ala Thr Leu Pro Pro Ala Tyr Ala Ile  
 290 295 300

His Leu Glu Pro Glu Arg Leu Pro Thr Leu Arg Cys Leu Leu Thr Ala  
 305 310 315 320

Gly Ser Ala Thr Ser Val Glu Leu Ile Glu Lys Trp Arg Lys His Val  
 325 330 335

Gln Tyr Phe Asn Ala Tyr Gly Pro Thr Glu Asp Ser Val Cys Thr Thr  
 340 345 350

Ile Trp Asn Ala Gln Asn Ser Glu Glu Thr Val Gly Ile Val Ser Ile  
 355 360 365

Gly Gln Pro Ile Ala Asn His Arg Val Tyr Ile Leu Asp Glu His Phe  
 370 375 380

Arg Leu Leu Pro Val Gly Val Ala Gly Glu Leu Cys Ile Ser Gly Ile  
 385 390 395 400

Gly Leu Ala Arg Gly Tyr His Asn Arg Pro Glu Leu Met Asp Glu Lys  
 405 410 415

Phe Val Asp Asn Pro Tyr Ala Pro Gly Glu Arg Met Tyr Arg Thr Gly  
 420 425 430

Asp Leu Val Arg Trp Leu Ser Asn Gly Thr Ile Glu Tyr Leu Gly Arg  
 435 440 445

Ile Asp His Gln Val Lys Ile Arg Gly Tyr Arg Ile Glu Leu Gly Glu  
 450 455 460

Val Glu Ala His Met Leu Arg Val Pro Ser Val Gln Glu Val Val Val  
 465 470 475 480

Leu Ala Val Glu Ser Asp Asp Gly Tyr Lys Asp Leu Val Ala Tyr Phe

ES 2 804 732 T3

485

490

495

Val Ala Ala Gln Lys Leu Glu Val Ser Glu Leu Arg Ala Asp Leu Ser  
500 505 510

Glu Met Leu Pro Gly Tyr Met Ile Pro Ser Arg Phe Ile Gln Leu Glu  
515 520 525

Asp Met Pro Leu Thr Ser Asn Gly Lys Ile Asp Arg Lys Ala Leu Gln  
530 535 540

Gly Glu Arg Gly Trp Ala  
545 550

<210> 10

<211> 250

<212> PRT

<213> *Paenibacillus* sp.

5

<400> 10

Asn Thr Leu Val Tyr Asp Ser Ser Asn Ile Glu Arg Ile Arg Gly His  
1 5 10 15

Leu Val His Leu Met Glu Gln Ile Val Lys Asn Pro Gly Ile Ser Val  
20 25 30

Asp Ala Leu Glu Leu Val Thr Pro Gln Glu Arg Asp His Ile Leu Asn  
35 40 45

Ile Trp Lys Asp Ile Ala Val Pro Tyr Glu His Tyr Ala Glu Leu His  
50 55 60

Ala Gln Ala Gln Thr Ala Pro Ile Gly Gln Pro Asn Val Tyr Ile Val  
65 70 75 80

Asp Asp His Phe Arg Leu Leu Pro Val Gly Val Ala Gly Glu Leu Cys  
85 90 95

Ile Ala Gly Val Gly Phe Thr Arg Glu His His Asn His Pro Glu Leu  
100 105 110

Thr Asp Glu Lys Phe Val Asp Asn Pro Phe Ala Pro Gly Glu Arg Met  
115 120 125

Tyr Arg Thr Gly Asp Leu Ala Arg Trp Leu Pro Asp Gly Thr Ile Gln  
130 135 140

Tyr Leu Gly Arg Val Asp His Gln Val Lys Ile Arg Gly Tyr Arg Val



ES 2 804 732 T3

	115						120						125		
Tyr	Gly	Ile	Met	Lys	Ala	Gly	Gly	Ala	Tyr	Val	Pro	Ile	Asp	Pro	Glu
	130					135					140				
Tyr	Pro	Lys	Glu	Arg	Ile	Ser	Tyr	Met	Leu	Glu	Asp	Ser	Gly	Ala	Lys
145					150					155					160
Leu	Val	Leu	Thr	Gln	Ala	Arg	Leu	Leu	Glu	His	Leu	Gly	Trp	Thr	Glu
				165					170					175	
Asn	Val	Leu	Leu	Leu	Asp	Glu	Pro	Ser	Thr	Tyr	Asp	Ala	Asp	Thr	Ser
			180					185					190		
Asn	Leu	Lys	Asp	Thr	Val	Gly	Pro	Asp	Asn	Leu	Ala	Tyr	Val	Ile	Tyr
		195					200					205			
Thr	Ser	Gly	Thr	Thr	Gly	Gln	Pro	Lys	Gly	Val	Leu	Val	Glu	His	Arg
	210					215					220				
Gly	Leu	Gln	Asn	Leu	Ser	Asp	Val	Tyr	Gly	Thr	Tyr	Phe	Glu	Val	Thr
225					230					235					240
Pro	Gln	Asp	Arg	Ile	Val	Gln	Phe	Ala	Ser	Leu	Ser	Phe	Asp	Ala	Ser
				245					250					255	
Val	Ser	Glu	Val	Leu	Thr	Ala	Leu	Ser	His	Gly	Ala	Ala	Leu	Cys	Ile
			260					265					270		
Pro	Ser	Thr	Gln	Asp	Ile	Leu	Asp	Tyr	Ala	Leu	Phe	Glu	Gln	Phe	Ile
		275					280					285			
Asn	Asp	Lys	Gly	Ile	Thr	Ile	Ala	Thr	Leu	Pro	Pro	Ala	Tyr	Ala	Ile
	290					295					300				
His	Leu	Glu	Pro	Glu	Arg	Leu	Pro	Ala	Leu	Arg	Cys	Leu	Leu	Thr	Ala
305					310					315					320
Gly	Ser	Ala	Ala	Ser	Val	Glu	Leu	Ile	Glu	Lys	Trp	Arg	Lys	His	Val
				325					330					335	
Arg	Tyr	Ser	Asn	Gly	Tyr	Gly	Pro	Thr	Glu	Asp	Ser	Ile	Cys	Thr	Thr
			340					345					350		
Ile	Trp	Ser	Val	Pro	Asp	Ser	Glu	Glu	Thr	Leu	Glu	Thr	Val	Ser	Ile
		355					360						365		

ES 2 804 732 T3

Gly Arg Pro Ile Ala Asn His Ser Val Tyr Val Leu Asp Glu His Leu  
 370 375 380

Arg Leu Gln Pro Val Gly Val Val Gly Glu Leu Cys Ile Ser Gly Ile  
 385 390 395 400

Gly Leu Ala Arg Gly Tyr His Asn Arg Pro Ala Leu Met Asp Glu Lys  
 405 410 415

Phe Val Glu Asn Pro Phe Thr Pro Gly Glu Arg Met Tyr Arg Thr Gly  
 420 425 430

Asp Leu Val Arg Trp Leu Pro Asn Gly Thr Ile Glu Tyr Val Gly Arg  
 435 440 445

Ile Asp His Gln Val Lys Ile Arg Gly Tyr Arg Ile Glu Leu Gly Glu  
 450 455 460

Val Glu Ala Gln Met Leu Arg Val Gln Ser Val Gln Glu Val Val Ala  
 465 470 475 480

Met Ala Val Glu Gly Asp Asp Gly Gln Lys Asp Leu Val Ala Tyr Phe  
 485 490 495

Val Ala Ala Arg Glu Leu Glu Val Ser Glu Leu Gln Thr Val Leu Ser  
 500 505 510

Glu Met Leu Pro Gly Tyr Met Ile Pro Ser Arg Phe Ile Gln Leu Glu  
 515 520 525

Asp Met Pro Leu Thr Ser Asn Gly Lys Ile Asn Arg Lys Ala Leu Gln  
 530 535 540

Gly Glu Arg Gly Trp Ala  
 545 550

<210> 12  
 <211> 804  
 <212> ADN  
 <213> *Paenibacillus* sp.  
 <400> 12

5

ES 2 804 732 T3

ttgcaaaaaa ttgaggtatt gttggctgat gacaaccggg aatttacgaa totgottgcc	60
gaatatatth cccatcagga gcatatggaa gttacaggaa tccctataa tgggaagaa	120
gtgctccaac acatcgcaga atcccgcaac gtacctgatg tacttatttt agatattatc	180
atgcctcctc tggatggctt cggcgtattg gaggccttga gagaaatgaa cctgtctcca	240
cagccgaaaa tcattatgct gactgcattc ggtcaagaaa atattacgca aagagccgta	300
cagctcgggg catcttatta tattttgaag ccgtttgaca tgggaagtgt tcccaaccgt	360
gttcgtcaat tgggtggacc acaattagtc agcagcagtc ccgtgacggt ttcttccatg	420
ccgtctaatg tgggtccaat cggcaaaaac aaaaacctgg atgccagtat tacggccatt	480
atccatgaaa tccgtgtgcc agctcatatt aagggtatc aatatttacg cgaagccatt	540
actatcgtgt acaataatat cgaaatthtgg ggtgccatca ccaaacatt atatccgca	600
atcgcgaaa aatttaaac gacggcatcc ccggtggaac gcgccattcg tcatgccatc	660
gaggtagcat ggacacgtgg caacatcgac agcatctctc atctgttcgg ctacaccatt	720
aatatctcca aatccaagcc gaccaactca gagthtattg ccatggtagc tgacaagctt	780
cggattgaga ataaggtgtc ctga	804

<210> 13  
 <211> 804  
 <212> ADN  
 <213> *Paenibacillus* sp.

5

<400> 13

ES 2 804 732 T3

ttgcaaaaaa ttgaggtatt gttggctgat gacaaccggg aatttacgaa tctgcttgcc	60
gaatatattt ccgatcagga gcatatggaa gttacaggaa tcgcctataa tggatgaagaa	120
gtgctccaac acatcgcaga atcccgaac gtacctgatg tacttatttt agatattatc	180
atgcctcatc tggatggctt cggcgtattg gagcgcttga gagaaatgaa cctgtctcca	240
cagccgaaaa tcattatgct gactgcattc ggtcaagaaa atattacgca aagagccgta	300
cagctcgggg catcttatta tattttgaag ccgtttgaca tggaaagtgt tcccaaccgt	360
gttcgtcaat tggatggacc acaattagtc agcagcagtc cggtgacggt ttcttccatg	420
cggctctaattg tggatgccaat cggcaaaaacg aaaaacctgg atgccagtat tacggccatt	480
atccatgaaa tcggtgtgcc agctcatatt aagggctatc aatatttacg ogaagccatt	540
actatcgtgt acaataatat cgaaattttg ggtgccatca ccaaaacatt atatcccgca	600
atcgccgaaa aatttaaaac gacggcatcc cgcgtggaac gcgccattcg tcatgccatc	660
gaggtagcat ggacacgtgg caacatcgac agcatctctc atctgttcgg ctacaccatt	720
aatatctcca aatccaagcc gaccaactca gagtttattg cgatggtagt tgacaagctt	780
cggattgaga ataaggtgtc ctga	804

<210> 14  
 <211> 267  
 <212> PRT  
 <213> *Paenibacillus terrae*  
 <400> 14

5

Met Gln Lys Ile Glu Val Leu Leu Ala Asp Asp Asn Arg Glu Phe Thr



ES 2 804 732 T3

<210> 15  
 <211> 267  
 <212> PRT  
 <213> *Paenibacillus* sp.

5 <400> 15

Leu Gln Lys Ile Glu Val Leu Leu Ala Asp Asp Asn Arg Glu Phe Thr  
 1 5 10 15

Asn Leu Leu Ala Glu Tyr Ile Ser Asp Gln Glu Asp Met Glu Val Thr  
 20 25 30

Gly Ile Ala Tyr Asn Gly Glu Glu Val Leu Gln His Ile Ala Glu Ser  
 35 40 45

Arg Asn Val Pro Asp Val Leu Ile Leu Asp Ile Ile Met Pro His Leu  
 50 55 60

Asp Gly Leu Gly Val Leu Glu Arg Leu Arg Glu Met Asn Leu Ser Pro  
 65 70 75 80

Gln Pro Lys Ile Ile Met Leu Thr Ala Phe Gly Gln Glu Asn Ile Thr  
 85 90 95

Gln Arg Ala Val Gln Leu Gly Ala Ser Tyr Tyr Ile Leu Lys Pro Phe  
 100 105 110

Asp Met Glu Val Leu Ala Asn Arg Val Arg Gln Leu Val Gly Pro Gln  
 115 120 125

Leu Val Ser Ser Ser Pro Val Thr Val Ser Ser Met Arg Ser Asn Val  
 130 135 140

Val Pro Met Gly Lys Thr Lys Asn Leu Asp Ala Ser Ile Thr Ala Ile  
 145 150 155 160

Ile His Glu Ile Gly Val Pro Ala His Ile Lys Gly Tyr Gln Tyr Leu  
 165 170 175

Arg Glu Ala Ile Thr Met Val Tyr Asn Asn Ile Glu Ile Leu Gly Ala  
 180 185 190

Ile Thr Lys Thr Leu Tyr Pro Ala Ile Ala Glu Lys Phe Lys Thr Thr  
 195 200 205

ES 2 804 732 T3

Ala Ser Arg Val Glu Arg Ala Ile Arg His Ala Ile Glu Val Ala Trp  
 210 215 220

Thr Arg Gly Asn Ile Asp Ser Ile Ser His Leu Phe Gly Tyr Thr Ile  
 225 230 235 240

Asn Ile Ser Lys Ser Lys Pro Thr Asn Ser Glu Phe Ile Ala Met Val  
 245 250 255

Ala Asp Lys Leu Arg Ile Glu Asn Lys Val Ser  
 260 265

<210> 16  
 <211> 267  
 <212> PRT  
 <213> *Paenibacillus* sp.

5

<400> 16

Leu Gln Lys Ile Glu Val Leu Leu Ala Asp Asp Asn Arg Glu Phe Thr  
 1 5 10 15

Asn Leu Leu Ala Glu Tyr Ile Ser Asp Gln Glu Asp Met Glu Val Thr  
 20 25 30

Gly Ile Ala Tyr Asn Gly Glu Glu Val Leu Gln His Ile Ala Glu Ser  
 35 40 45

Arg Asn Val Pro Asp Val Leu Ile Leu Asp Ile Ile Met Pro His Leu  
 50 55 60

Asp Gly Leu Gly Val Leu Glu Arg Leu Arg Glu Met Asn Leu Ser Pro  
 65 70 75 80

Gln Pro Lys Ile Ile Met Leu Thr Ala Phe Gly Gln Glu Asn Ile Thr  
 85 90 95

Gln Arg Ala Val Gln Leu Gly Ala Ser Tyr Tyr Ile Leu Lys Pro Phe  
 100 105 110

Asp Met Glu Val Leu Ala Asn Arg Val Arg Gln Leu Val Gly Pro Gln  
 115 120 125

Leu Val Ser Ser Ser Pro Val Thr Val Ser Ser Met Arg Ser Asn Val  
 130 135 140

Val Pro Met Gly Lys Thr Lys Asn Leu Asp Ala Ser Ile Thr Ala Ile  
 145 150 155 160

ES 2 804 732 T3

Ile His Glu Ile Gly Val Pro Ala His Ile Lys Gly Tyr Gln Tyr Leu  
 165 170 175

Arg Glu Ala Ile Thr Met Val Tyr Asn Asn Ile Glu Ile Leu Gly Ala  
 180 185 190

Ile Thr Lys Thr Leu Tyr Pro Ala Ile Ala Glu Lys Phe Lys Thr Thr  
 195 200 205

Ala Ser Arg Val Glu Arg Ala Ile Arg His Ala Ile Glu Val Ala Trp  
 210 215 220

Thr Arg Gly Asn Ile Asp Ser Ile Ser His Leu Phe Gly Tyr Thr Ile  
 225 230 235 240

Asn Ile Ser Lys Ser Lys Pro Thr Asn Ser Glu Phe Ile Ala Met Val  
 245 250 255

Val Asp Lys Leu Arg Ile Glu Asn Lys Val Ser  
 260 265

<210> 17

<211> 267

<212> PRT

5 <213> *Paenibacillus polymyxa*

<400> 17

Met Gln Lys Ile Glu Val Leu Leu Ala Asp Asp Asn Arg Glu Phe Thr  
 1 5 10 15

Asn Leu Leu Ala Glu Tyr Ile Ser Asp Gln Glu Asp Met Glu Val Thr  
 20 25 30

Gly Ile Ala Tyr Asn Gly Glu Glu Val Leu Gln Arg Ile Ala Glu Ser  
 35 40 45

Arg Asn Val Pro Asp Val Leu Ile Leu Asp Ile Ile Met Pro His Leu  
 50 55 60

Asp Gly Leu Gly Val Leu Glu Arg Leu Arg Glu Met Asn Leu Thr Pro  
 65 70 75 80

Gln Pro Lys Ile Ile Met Leu Thr Ala Phe Gly Gln Glu Asn Ile Thr  
 85 90 95

Gln Arg Ala Val Gln Leu Gly Ala Ser Tyr Tyr Ile Leu Lys Pro Phe  
 100 105 110

ES 2 804 732 T3

Asp Met Glu Val Leu Ala Asn Arg Val Arg Gln Leu Val Gly Pro Gln  
 115 120 125

Leu Val Ser Ser Ser Pro Val Thr Val Ser Ser Met Arg Ser Asn Val  
 130 135 140

Val Pro Met Gly Lys Thr Lys Asn Leu Asp Ala Ser Ile Thr Ala Ile  
 145 150 155 160

Ile His Glu Ile Gly Val Pro Ala His Ile Lys Gly Tyr Gln Tyr Leu  
 165 170 175

Arg Glu Ala Ile Thr Met Val Tyr Asn Asn Ile Glu Ile Leu Gly Ala  
 180 185 190

Ile Thr Lys Thr Leu Tyr Pro Ala Ile Ala Glu Lys Phe Lys Thr Thr  
 195 200 205

Ala Ser Arg Val Glu Arg Ala Ile Arg His Ala Ile Glu Val Ala Trp  
 210 215 220

Thr Arg Gly Asn Ile Asp Ser Ile Ser His Leu Phe Gly Tyr Thr Ile  
 225 230 235 240

Asn Ile Ser Lys Ser Lys Pro Thr Asn Ser Glu Phe Ile Ala Met Val  
 245 250 255

Val Asp Lys Leu Arg Ile Glu Asn Lys Val Ser  
 260 265

<210> 18  
 <211> 267  
 <212> PRT  
 <213> *Bacillus subtilis*

5

<400> 18

Met Glu Lys Ile Lys Val Cys Val Ala Asp Asp Asn Arg Glu Leu Val  
 1 5 10 15

Ser Leu Leu Ser Glu Tyr Ile Glu Gly Gln Glu Asp Met Glu Val Ile  
 20 25 30

Gly Val Ala Tyr Asn Gly Gln Glu Cys Leu Ser Leu Phe Lys Glu Lys  
 35 40 45

Asp Pro Asp Val Leu Val Leu Asp Ile Ile Met Pro His Leu Asp Gly  
 50 55 60

ES 2 804 732 T3

Leu Ala Val Leu Glu Arg Leu Arg Glu Ser Asp Leu Lys Lys Gln Pro  
65 70 75 80

Asn Val Ile Met Leu Thr Ala Phe Gly Gln Glu Asp Val Thr Lys Lys  
85 90 95

Ala Val Asp Leu Gly Ala Ser Tyr Phe Ile Leu Lys Pro Phe Asp Met  
100 105 110

Glu Asn Leu Val Gly His Ile Arg Gln Val Ser Gly Asn Ala Ser Ser  
115 120 125

Val Thr His Arg Ala Pro Ser Ser Gln Ser Ser Ile Ile Arg Ser Ser  
130 135 140

Gln Pro Glu Pro Lys Lys Lys Asn Leu Asp Ala Ser Ile Thr Ser Ile  
145 150 155 160

Ile His Glu Ile Gly Val Pro Ala His Ile Lys Gly Tyr Leu Tyr Leu  
165 170 175

Arg Glu Ala Ile Ser Met Val Tyr Asn Asp Ile Glu Leu Leu Gly Ser  
180 185 190

Ile Thr Lys Val Leu Tyr Pro Asp Ile Ala Lys Lys Phe Asn Thr Thr  
195 200 205

Ala Ser Arg Val Glu Arg Ala Ile Arg His Ala Ile Glu Val Ala Trp  
210 215 220

Ser Arg Gly Asn Ile Asp Ser Ile Ser Ser Leu Phe Gly Tyr Thr Val  
225 230 235 240

Ser Met Thr Lys Ala Lys Pro Thr Asn Ser Glu Phe Ile Ala Met Val  
245 250 255

Ala Asp Lys Leu Arg Leu Glu His Lys Ala Ser  
260 265

<210> 19  
<211> 264  
<212> PRT  
<213> *Bacillus cereus*

5

<400> 19

Met Glu Lys Ile Lys Val Cys Leu Val Asp Asp Asn Lys Glu Leu Val  
1 5 10 15

ES 2 804 732 T3

Ser Met Leu Glu Ser Tyr Val Ala Ala Gln Asp Asp Met Glu Val Ile  
 20 25 30

Gly Thr Ala Tyr Asn Gly Gln Glu Cys Leu Asn Leu Leu Lys Asp Lys  
 35 40 45

Gln Pro Asp Val Leu Val Leu Asp Ile Ile Met Pro His Leu Asp Gly  
 50 55 60

Leu Ala Val Leu Glu Lys Met Arg His Ile Glu Arg Leu Arg Gln Pro  
 65 70 75 80

Ser Val Ile Met Leu Thr Ala Phe Gly Gln Glu Asp Val Thr Lys Lys  
 85 90 95

Ala Val Asp Leu Gly Ala Ser Tyr Phe Ile Leu Lys Pro Phe Asp Met  
 100 105 110

Glu Asn Leu Thr Ser His Ile Arg Gln Val Ser Gly Lys Ala Asn Ala  
 115 120 125

Thr Ile Lys Arg Pro Leu Pro Ser Phe Arg Ser Ala Thr Thr Val Asp  
 130 135 140

Gly Lys Pro Lys Asn Leu Asp Ala Ser Ile Thr Ser Ile Ile His Glu  
 145 150 155 160

Ile Gly Val Pro Ala His Ile Lys Gly Tyr Met Tyr Leu Arg Glu Ala  
 165 170 175

Ile Ser Met Val Tyr Asn Asp Ile Glu Leu Leu Gly Ser Ile Thr Lys  
 180 185 190

Val Leu Tyr Pro Asp Ile Ala Lys Lys Tyr Asn Thr Thr Ala Ser Arg  
 195 200 205

Val Glu Arg Ala Ile Arg His Ala Ile Glu Val Ala Trp Ser Arg Gly  
 210 215 220

Asn Ile Asp Ser Ile Ser Ser Leu Phe Gly Tyr Thr Val Ser Met Ser  
 225 230 235 240

Lys Ala Lys Pro Thr Asn Ser Glu Phe Ile Ala Met Val Ala Asp Lys  
 245 250 255

Leu Arg Leu Glu His Lys Ala Ser  
 260

<210> 20  
 <211> 273

ES 2 804 732 T3

<212> PRT

<213> *Clostridium pasteurianum*

<400> 20

```

Met Glu Tyr Ser Lys Ile Ser Val Leu Ile Ala Asp Asp Asn Lys Glu
 1                               5                               10                               15

Phe Cys Asn Ile Leu Asn Asp Tyr Leu Leu Asn Gln Ser Asp Ile Val
                20                               25                               30

Val Val Gly Ile Ala Lys Asp Gly Ile Glu Ala Leu Lys Leu Ile Glu
                35                               40                               45

Glu Lys Lys Pro Asp Leu Val Ile Leu Asp Ile Ile Met Pro Asn Met
 50                               55                               60

Asp Gly Leu Val Val Leu Glu Lys Leu Ala Asn Ile Asn Ile Asp Pro
65                               70                               75                               80

Val Pro Asn Val Ile Val Leu Ser Ala Val Gly Gln Asp Lys Ile Thr
                85                               90                               95

Gln Arg Ala Ile Thr Leu Gly Ala Asp Tyr Tyr Val Val Lys Pro Phe
                100                               105                               110

Asp Met Asp Val Phe Thr Lys Arg Ile Arg Gln Met Phe Asn Asn Thr
115                               120                               125

Ile Leu Asp Ser Glu Thr Lys Lys Thr Met Pro Ile Ser Glu Lys Ala
130                               135                               140

Ala Asp Val Lys Ile Ser Gln Ser Val Pro Leu Asp Leu Glu Asp Glu
145                               150                               155                               160

Ser Ile Ile His Glu Ile Gly Val Pro Ala His Ile Lys Gly Tyr Met
                165                               170                               175

Tyr Leu Arg Glu Ala Ile Asn Met Val Val Asp Asn Ile Glu Leu Leu
                180                               185                               190

Ser Ala Val Thr Lys Glu Leu Tyr Pro Ser Ile Ala Lys Lys Tyr Asn
                195                               200                               205

Thr Thr Ala Ser Arg Val Glu Arg Ala Ile Arg His Ala Ile Glu Val
210                               215                               220

```

ES 2 804 732 T3

Ala Trp Ser Arg Gly Gln Val Asp Thr Ile Asn Lys Leu Phe Gly Tyr  
225 230 235 240

Thr Ile His Asn Gly Lys Gly Lys Pro Thr Asn Ser Glu Phe Ile Ala  
245 250 255

Met Ile Ala Asp Lys Leu Arg Leu Lys Asn Lys Val Lys Asn Val Ala  
260 265 270

Gln

## REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende un cultivo biológicamente puro de una cepa fungicida de *Paenibacillus* sp. que comprende una variante de la fusaricidina sintasa que carece de un dominio de adenilación funcional en el tercer módulo (FusA-A3),  
5 en la que la falta de un FusA-A3 funcional inhibe la síntesis de fusaricidinas con una tirosina y una fenilalanina en el resto de aminoácido 3 en comparación con la síntesis de fusaricidinas por una cepa de *Paenibacillus* sp. que comprende una fusaricidina sintasa de tipo silvestre, y en la que la variante de la fusaricidina sintasa comprende una secuencia de aminoácidos que presenta al menos el 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 10.
- 10 2. La composición de la reivindicación 1, en la que la variante de la fusaricidina sintasa comprende la SEQ ID NO: 10.
3. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende adicionalmente al menos una Paeniserina y al menos una Paeniprolixina.
- 15 4. La composición de la reivindicación 3, en la que la al menos una Paeniserina se selecciona del grupo que consiste en Paeniserina A1, Paeniserina A2, Paeniserina A3, Paeniserina A4, Paeniserina B1, Paeniserina B2, Paeniserina B3, Paeniserina B4, Paeniserina C1, Paeniserina C2 y Paeniserina C3, y en la que la al menos una Paeniprolixina se selecciona del grupo que consiste en Paeniprolixina A1, Paeniprolixina A2, Paeniprolixina B1, Paeniprolixina B2, Paeniprolixina C1, Paeniprolixina D1, Paeniprolixina E1, Paeniprolixina E2, Paeniprolixina F1, Paeniprolixina F2, Paeniprolixina G1 y Paeniprolixina G2.
- 20 5. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 y 4, en la que la composición comprende fusaricidina A, LiF08a; Paeniserina A1, Paeniserina B1, Paeniprolixina A2 y Paeniprolixina B2.
6. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, en la que la composición no comprende LiF03a, LiF03b, LiF03c, LiF03d, LiF07a, LiF07b, LiF07c y/o LiF07d.
7. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la cepa de *Paenibacillus* sp. es la cepa NRRL B-50972 de *Paenibacillus* sp. o la cepa NRRL B-67129 de *Paenibacillus* sp.
- 25 8. La composición de acuerdo con la reivindicación 7, en la que dicho cultivo está comprendido en un producto de fermentación de la cepa NRRL B-50972 de *Paenibacillus* sp. o la cepa NRRL B-67129 de *Paenibacillus* sp.
9. La composición de acuerdo con la reivindicación 8, en la que el producto de fermentación no comprende una polimixina.
- 30 10. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 9, en la que el producto de fermentación es una formulación líquida.
11. Un procedimiento de tratamiento de una planta para controlar una enfermedad, en el que el procedimiento comprende aplicar una cantidad eficaz de una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 a la planta, a una parte de la planta y/o a un lugar donde se encuentra la planta.
- 35 12. El procedimiento de la reivindicación 11, en el que el procedimiento comprende aplicar la composición a las partes foliares de la planta.
13. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 12, en el que la enfermedad de la planta está provocada por un hongo o por bacterias.
- 40 14. El procedimiento de la reivindicación 13, en el que la enfermedad de la planta provocada por un hongo es mildiú o una enfermedad por roya o en el que la bacteria se selecciona del grupo que consiste en *Xanthomonas campestris*, *Pseudomonas syringae* y *Erwinia carotovora*.
15. Uso de una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 para el control de un organismo fitopatógeno en plantas útiles.

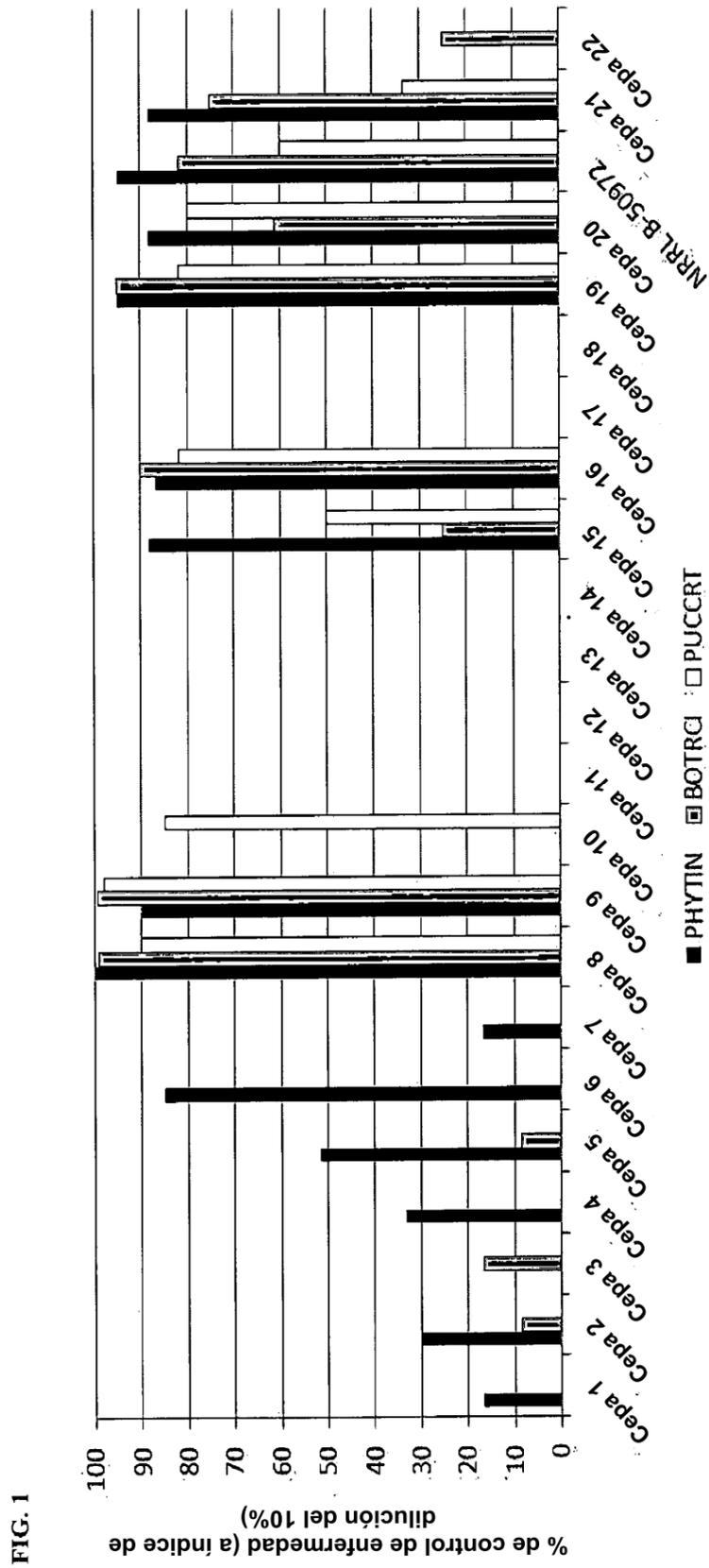


FIG. 2

Muestra	ALTE AL	BOTR CI	FUSA CU	LEPTN O	SEPPT R	PHYT CR	PHYTI N	PYTH UL	PYRIO R	RHIZS O	USTI AV	UROMA P
Cepa X Fracción 1	DE <sub>50</sub> DE <sub>80</sub>	>100 >100										
Cepa X Fracción 2	DE <sub>50</sub> DE <sub>80</sub>	>100 >100	42 54	>100 >100	>100 >100	>100 >100						
Cepa X Fracción 3	DE <sub>50</sub> DE <sub>80</sub>	32 98	44 >100	22 >100	4.7 24	>100 >100	1.1 4.8	43 >100	36 >100	7.8 20	34 >100	>100 >100
NRRL B- 50972 Fracción 1	DE <sub>50</sub> DE <sub>80</sub>	1.2 1.7	3.3 4.2	1.6 6.4	1.4 1.6	1.6 2.1	0.1 0.2	1.3 1.6	3.5 7	0.7 1.5	2.5 2.8	0.9 1.2

FIG. 3

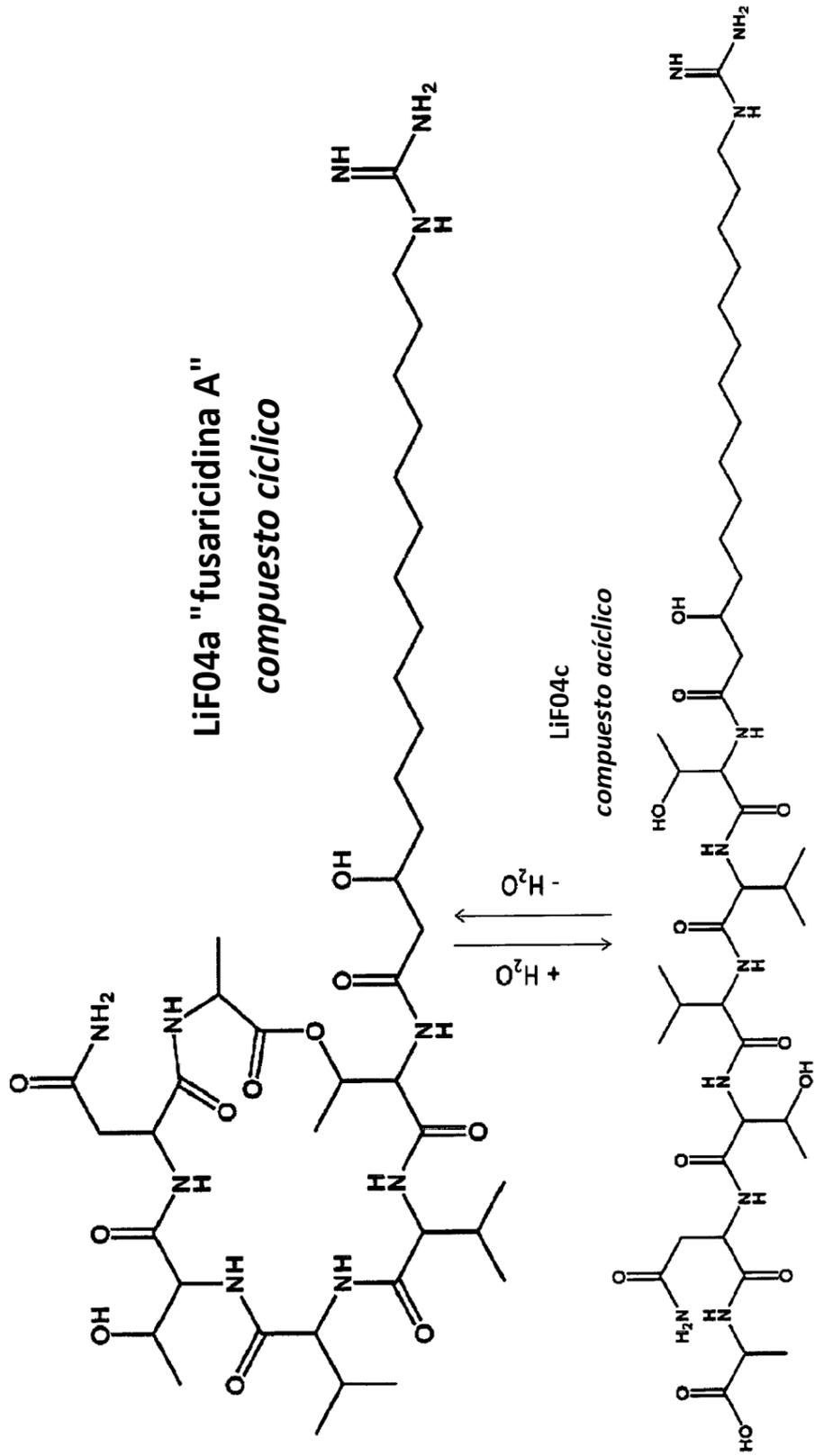


FIG. 4A

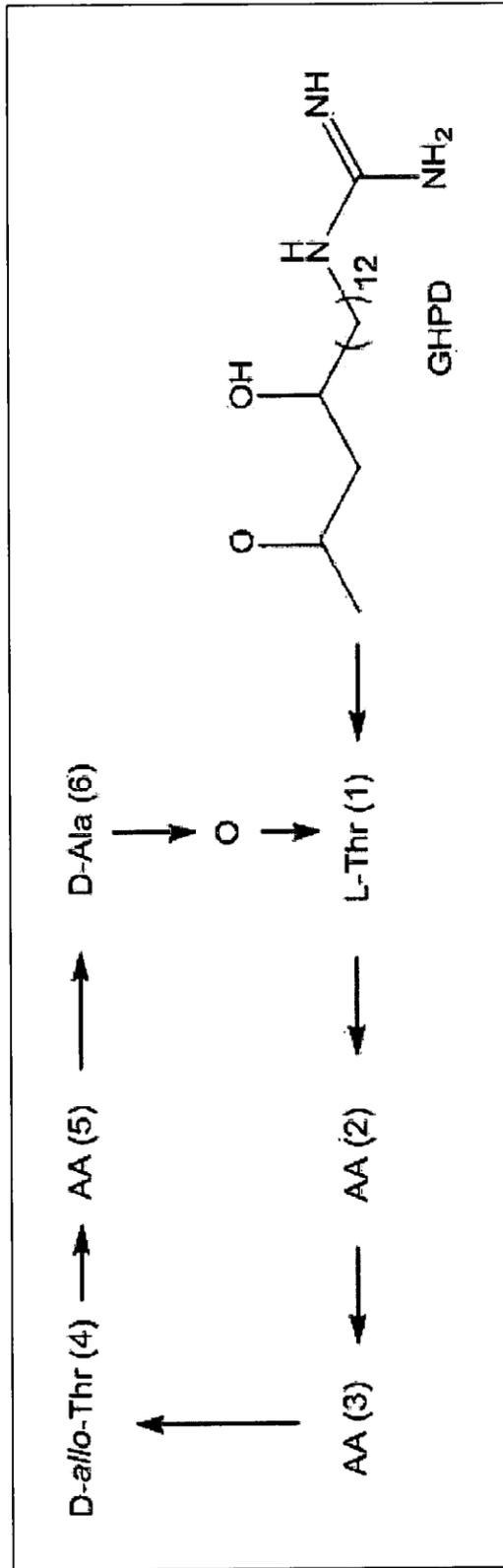


FIG. 4B

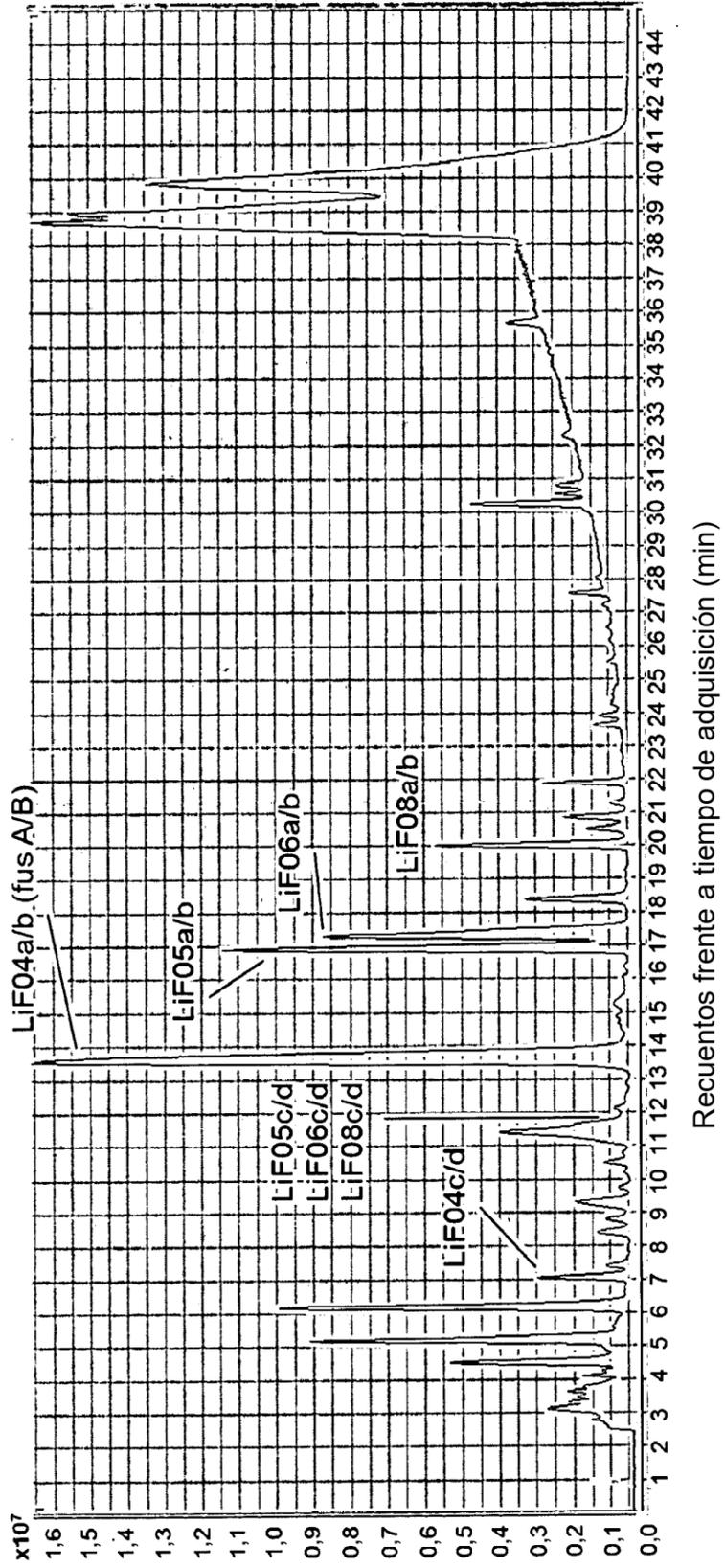


FIG. 4C

Compuesto	Cíclico o acíclico	Fórmula molecular	AA (2)	AA (3)	AA (5)	m/z	TR (min)
"C" - LiF03a	Cíclico	C <sub>45</sub> H <sub>74</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub>	Val	Tyr	Asn	No detectado	
"D" - LiF03b	Cíclico	C <sub>46</sub> H <sub>76</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub>	Val	Tyr	Gln	No detectado	
LiF03c	Acíclico	C <sub>45</sub> H <sub>76</sub> N <sub>10</sub> O <sub>13</sub>	Val	Tyr	Asn	No detectado	
LiF03d	Acíclico	C <sub>46</sub> H <sub>78</sub> N <sub>10</sub> O <sub>13</sub>	Val	Tyr	Gln	No detectado	
"A" - LiF04a	Cíclico	C <sub>41</sub> H <sub>74</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub>	Val	Val	Asn	883,5	13,64
"B" - LiF04b	Cíclico	C <sub>42</sub> H <sub>76</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub>	Val	Val	Gln	897,6	13,57
LiF04c	Acíclico	C <sub>41</sub> H <sub>76</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub>	Val	Val	Asn	901,6	9,33
LiF04d	Acíclico	C <sub>42</sub> H <sub>78</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub>	Val	Val	Gln	915,6	9,35
LiF05a	Cíclico	C <sub>42</sub> H <sub>76</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub>	Val	Ile	Asn	897,6	16,99
LiF05b	Cíclico	C <sub>43</sub> H <sub>78</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub>	Val	Ile	Gln	911,6	16,90
LiF05c	Acíclico	C <sub>42</sub> H <sub>78</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub>	Val	Ile	Asn	915,6	12,12
LiF05d	Acíclico	C <sub>43</sub> H <sub>80</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub>	Val	Ile	Gln	929,6	12,11
LiF06a	Cíclico	C <sub>42</sub> H <sub>76</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub>	Ile	Val	Asn	897,6	17,30
LiF06b	Cíclico	C <sub>43</sub> H <sub>78</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub>	Ile	Val	Gln	911,6	17,35
LiF06c	Acíclico	C <sub>42</sub> H <sub>78</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub>	Ile	Val	Asn	915,6	12,12
LiF06d	Acíclico	C <sub>43</sub> H <sub>80</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub>	Ile	Val	Gln	929,6	12,11
LiF07a	Cíclico	C <sub>45</sub> H <sub>74</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub>	Val	Phe	Asn	No detectado	
LiF07b	Cíclico	C <sub>46</sub> H <sub>76</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub>	Val	Phe	Gln	No detectado	
LiF07c	Acíclico	C <sub>45</sub> H <sub>76</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub>	Val	Phe	Asn	No detectado	
LiF07d	Acíclico	C <sub>46</sub> H <sub>78</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub>	Val	Phe	Gln	No detectado	
LiF08a	Cíclico	C <sub>43</sub> H <sub>78</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub>	Ile	Ile	Asn	911,6	19,99
LiF08b	Cíclico	C <sub>44</sub> H <sub>80</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub>	Ile	Ile	Gln	925,6	20,02
LiF08c	Acíclico	C <sub>43</sub> H <sub>80</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub>	Ile	Ile	Asn	929,6	12,11
LiF08d	Acíclico	C <sub>44</sub> H <sub>82</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub>	Ile	Ile	Gln	943,6	12,11

FIG. 5A

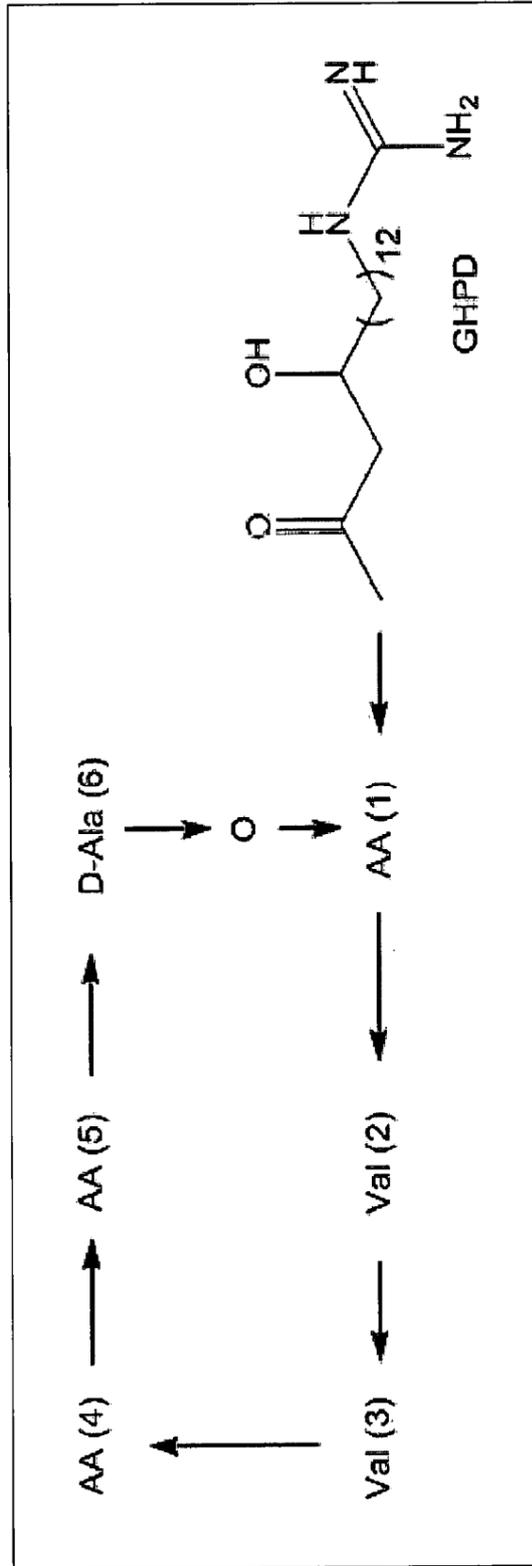


FIG. 5B

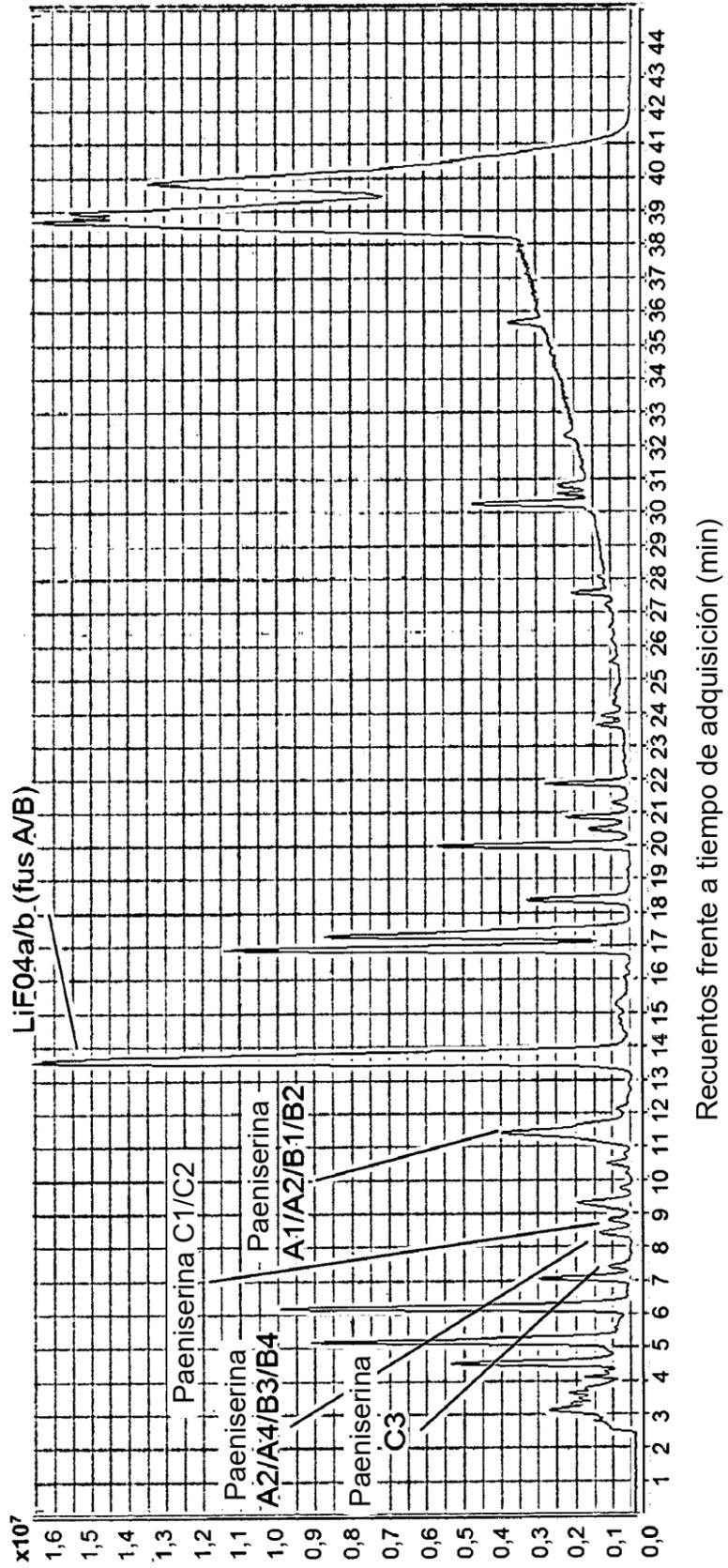


FIG. 5C

Compuesto	Cíclico o acíclico	Fórmula molecular	AA (1)	AA (4)	AA (5)	m/z	TR (min)
Paeniserina A1	Cíclico	C <sub>40</sub> H <sub>72</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub>	Ser	Thr	Asn	869,5	11,26
Paeniserina A2	Cíclico	C <sub>41</sub> H <sub>74</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub>	Ser	Thr	Gln	883,5	11,12
Paeniserina A3	Acíclico	C <sub>40</sub> H <sub>74</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub>	Ser	Thr	Asn	887,5	8,38
Paeniserina A4	Acíclico	C <sub>41</sub> H <sub>76</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub>	Ser	Thr	Gln	901,6	8,41
Paeniserina B1	Cíclico	C <sub>40</sub> H <sub>72</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub>	Thr	Ser	Asn	869,5	11,67
Paeniserina B2	Cíclico	C <sub>41</sub> H <sub>74</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub>	Thr	Ser	Gln	883,5	11,16
Paeniserina B3	Acíclico	C <sub>40</sub> H <sub>74</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub>	Thr	Ser	Asn	887,5	8,79
Paeniserina B4	Acíclico	C <sub>41</sub> H <sub>76</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub>	Thr	Ser	Gln	901,6	8,67
Paeniserina C1	Cíclico	C <sub>39</sub> H <sub>70</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub>	Ser	Ser	Asn	855,5	8,81
Paeniserina C2	Cíclico	C <sub>40</sub> H <sub>72</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub>	Ser	Ser	Gln	869,5	8,62
Paeniserina C3	Acíclico	C <sub>39</sub> H <sub>72</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub>	Ser	Ser	Asn	873,5	7,22
Paeniserina C4	Acíclico	C <sub>40</sub> H <sub>74</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub>	Ser	Ser	Gln	No detectado	

FIG. 6A

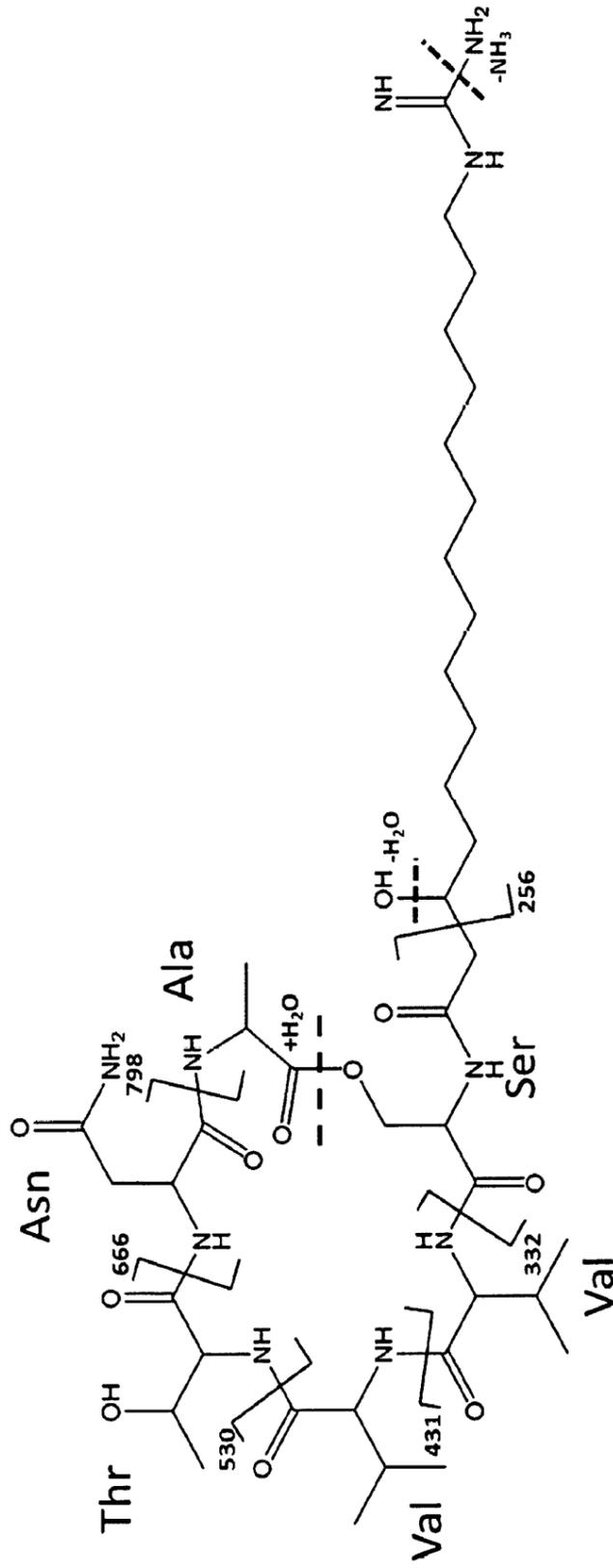


FIG. 6B

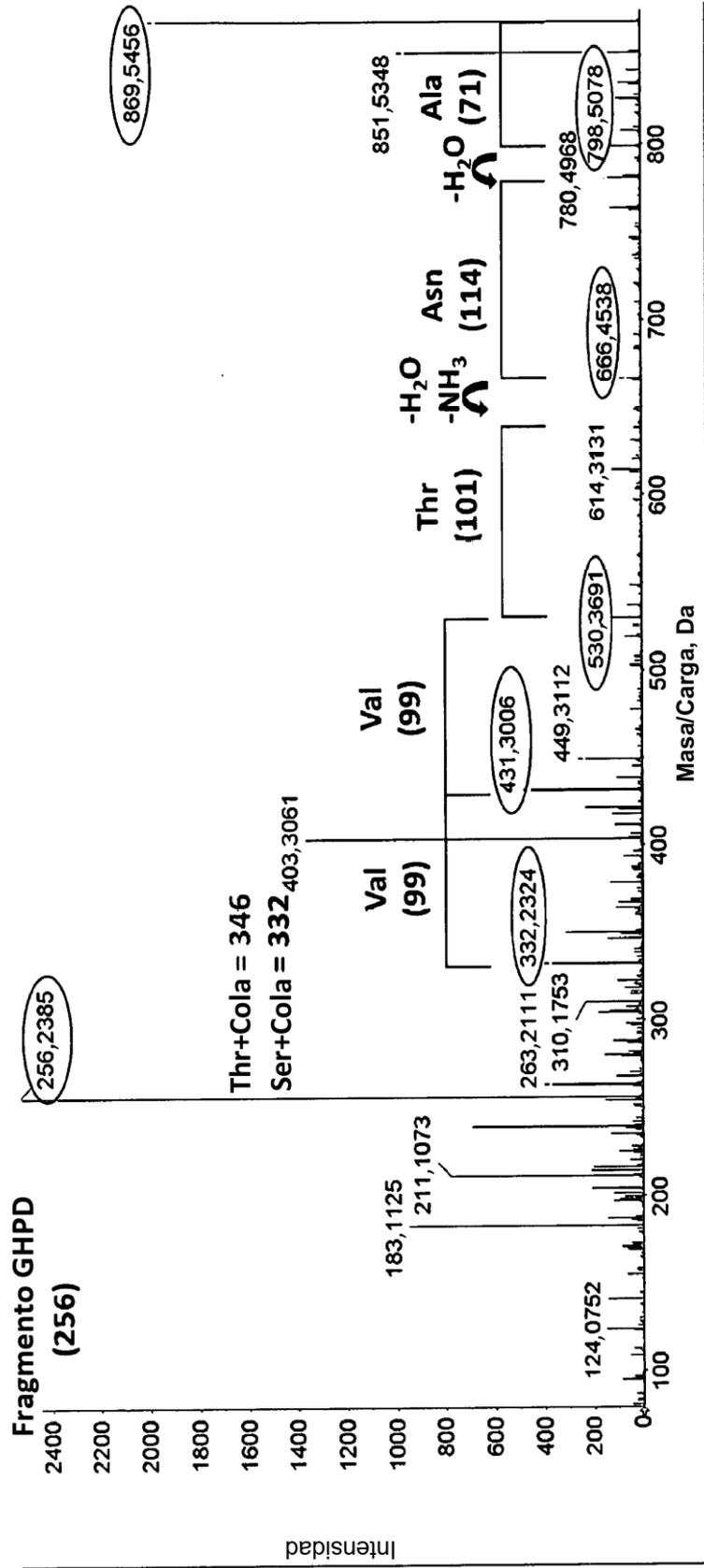
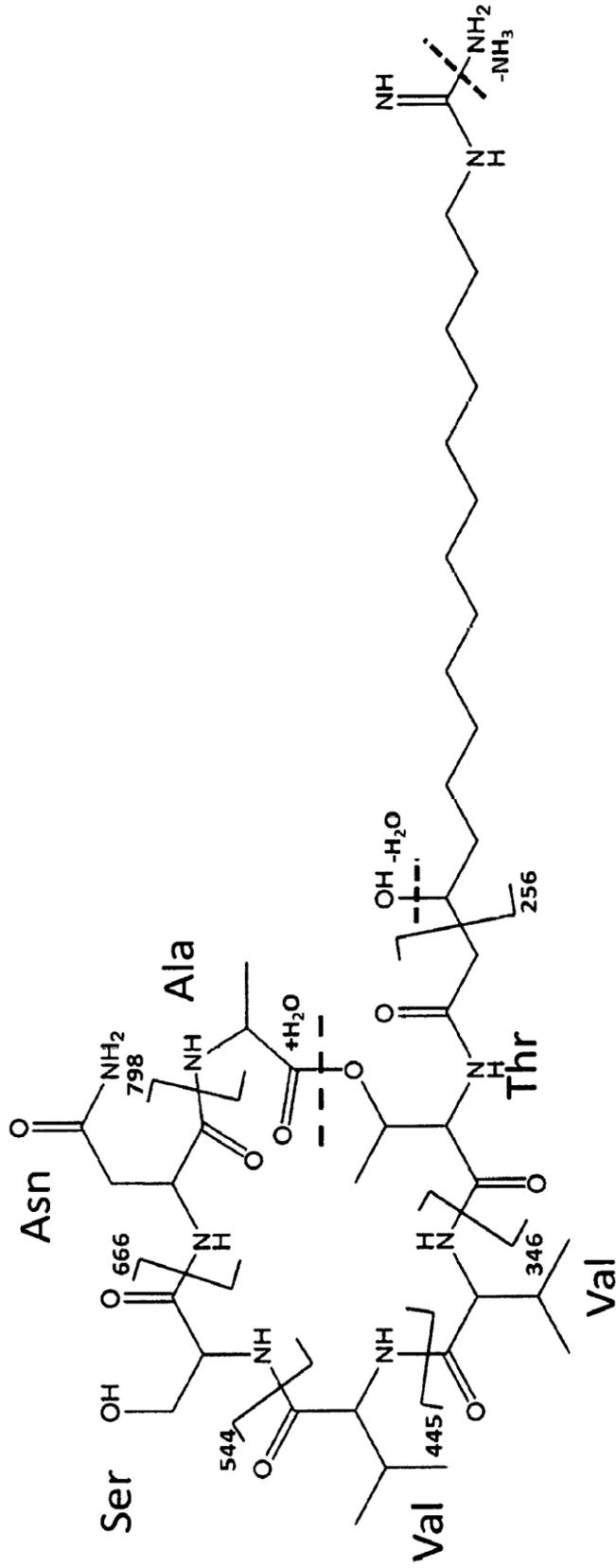


FIG. 7A



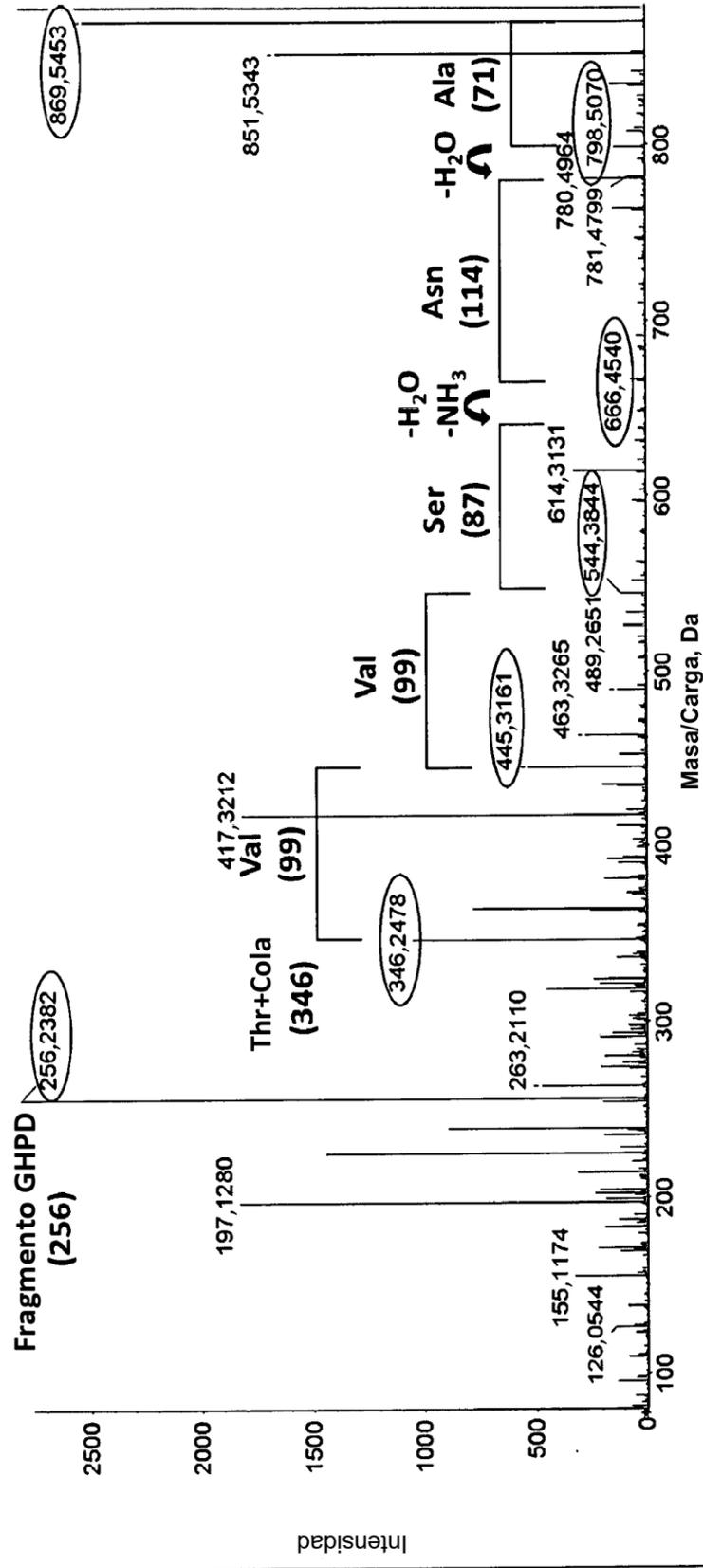


FIG. 7B

FIG. 8A

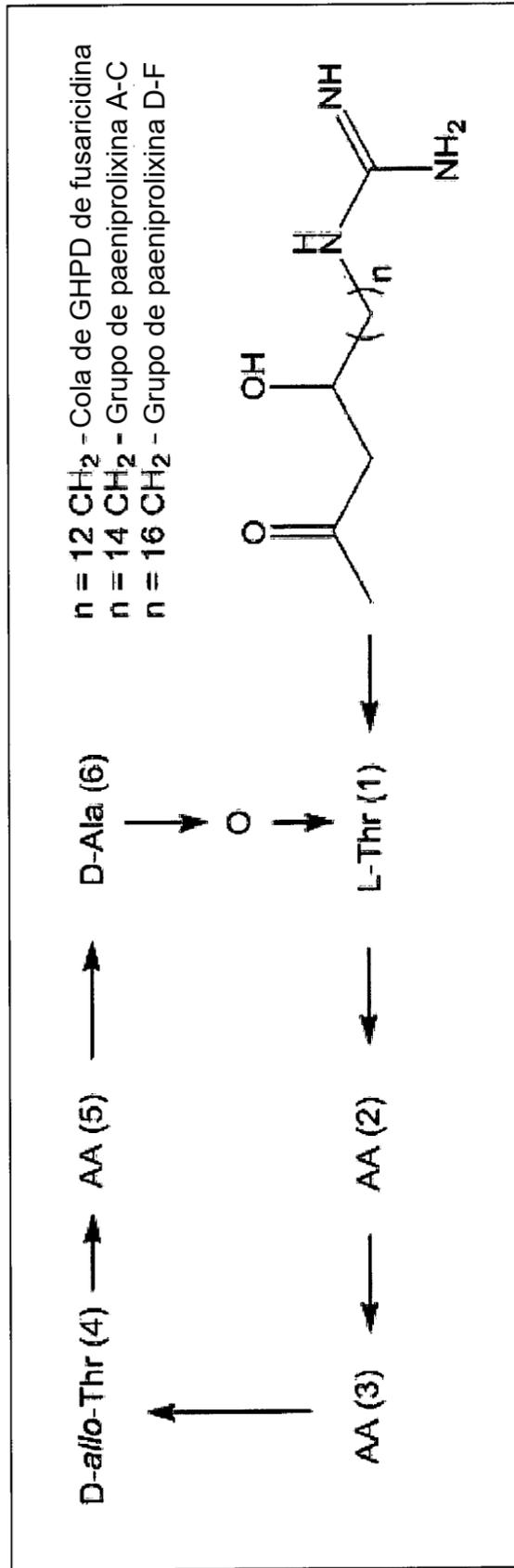


FIG. 8B

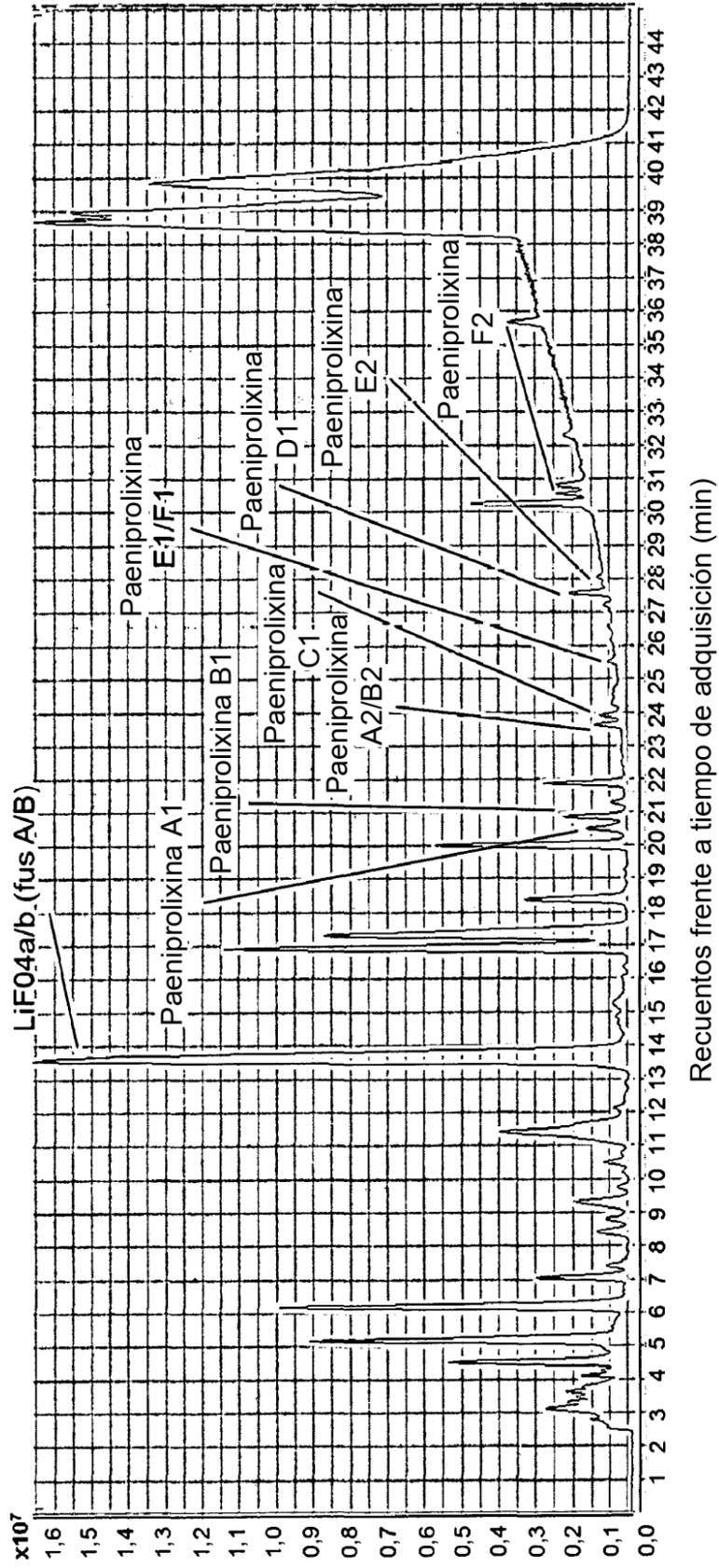


FIG. 8C

Compuesto	Fórmula molecular	AA (2)	AA (3)	AA (5)	Cola	m/z	TR (min)
Paeniprolixina A1	C <sub>44</sub> H <sub>80</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub>	Val	Ile	Asn	GHPD+2CH <sub>2</sub>	925,6	20,87
Paeniprolixina A2	C <sub>45</sub> H <sub>82</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub>	Val	Ile	Gln	GHPD+2CH <sub>2</sub>	939,6	23,63
Paeniprolixina B1	C <sub>44</sub> H <sub>80</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub>	Ile	Val	Asn	GHPD+2CH <sub>2</sub>	925,6	21,88
Paeniprolixina B2	C <sub>45</sub> H <sub>82</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub>	Ile	Val	Gln	GHPD+2CH <sub>2</sub>	939,6	23,92
Paeniprolixina C1	C <sub>45</sub> H <sub>82</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub>	Ile	Ile	Asn	GHPD+2CH <sub>2</sub>	939,6	24,56
Paeniprolixina C2	C <sub>45</sub> H <sub>82</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub>	Ile	Ile	Gln	GHPD+2CH <sub>2</sub>	No detectado	
Paeniprolixina D1	C <sub>45</sub> H <sub>82</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub>	Val	Val	Asn	GHPD+4CH <sub>2</sub>	939,6	27,22
Paeniprolixina D2	C <sub>45</sub> H <sub>82</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub>	Val	Val	Gln	GHPD+4CH <sub>2</sub>	No detectado	
Paeniprolixina E1	C <sub>46</sub> H <sub>84</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub>	Val	Ile	Asn	GHPD+4CH <sub>2</sub>	953,6	25,54
Paeniprolixina E2	C <sub>47</sub> H <sub>86</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub>	Val	Ile	Gln	GHPD+4CH <sub>2</sub>	967,6	28,60
Paeniprolixina F1	C <sub>46</sub> H <sub>84</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub>	Ile	Val	Asn	GHPD+4CH <sub>2</sub>	953,6	26,17
Paeniprolixina F2	C <sub>47</sub> H <sub>86</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub>	Ile	Val	Gln	GHPD+4CH <sub>2</sub>	967,6	30,26
Paeniprolixina G1	C <sub>47</sub> H <sub>86</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub>	Ile	Ile	Asn	GHPD+4CH <sub>2</sub>	966,6	31,02
Paeniprolixina G2	C <sub>48</sub> H <sub>88</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub>	Ile	Ile	Gln	GHPD+4CH <sub>2</sub>	No detectado	

FIG. 9A

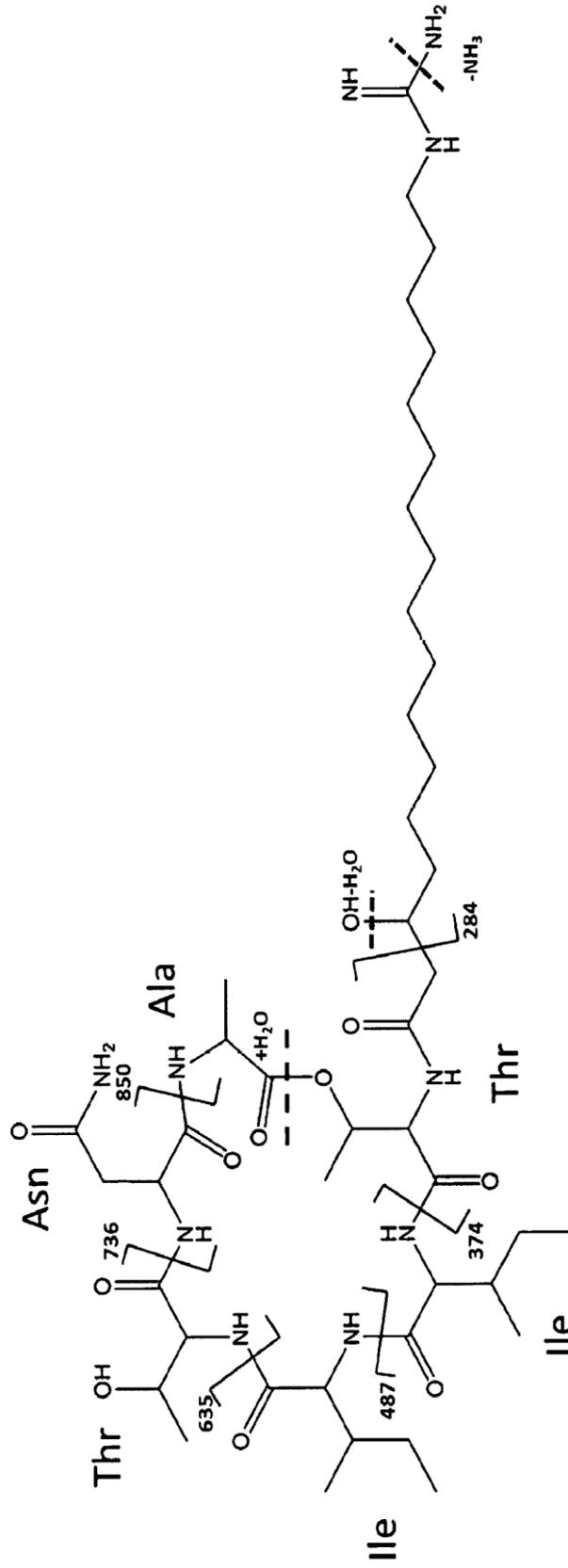


FIG. 9B

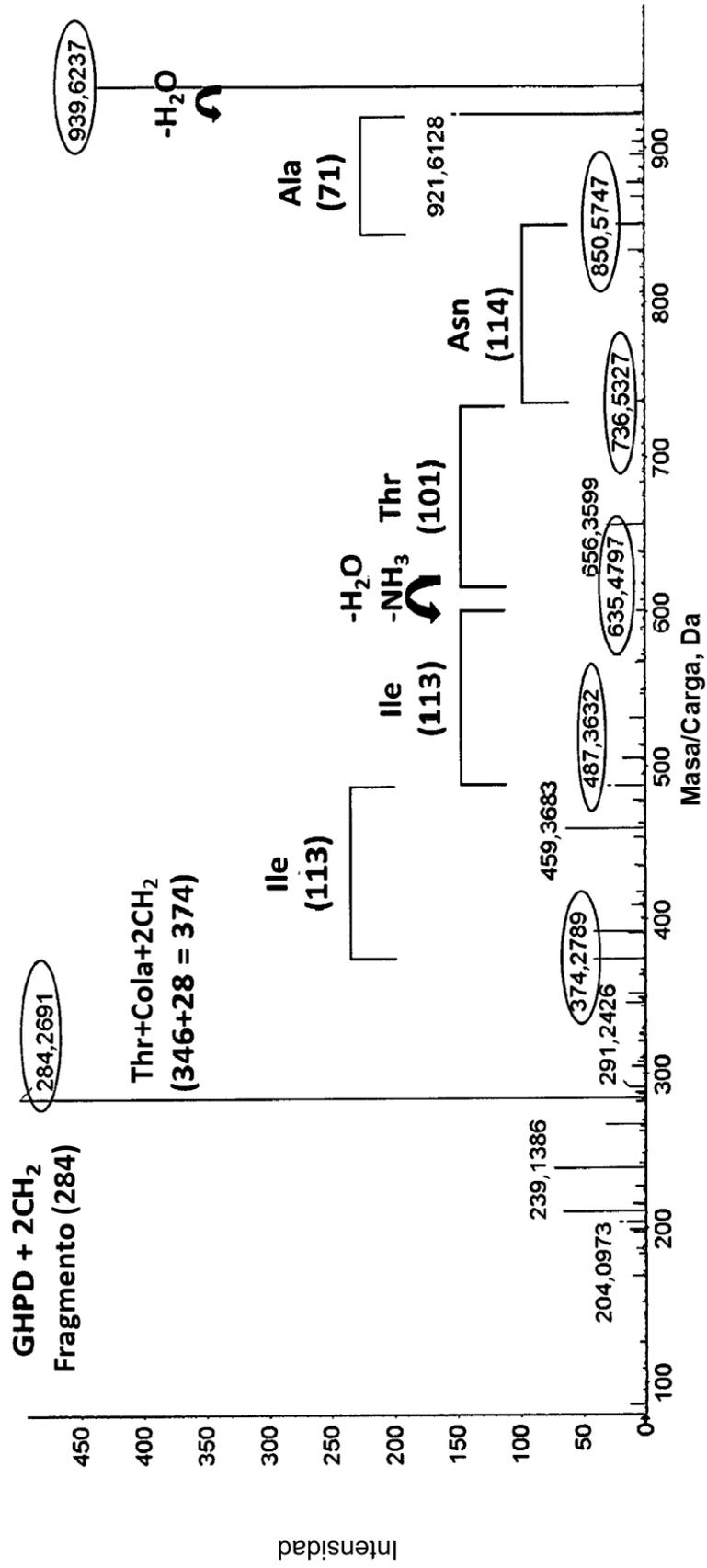


FIG. 10A

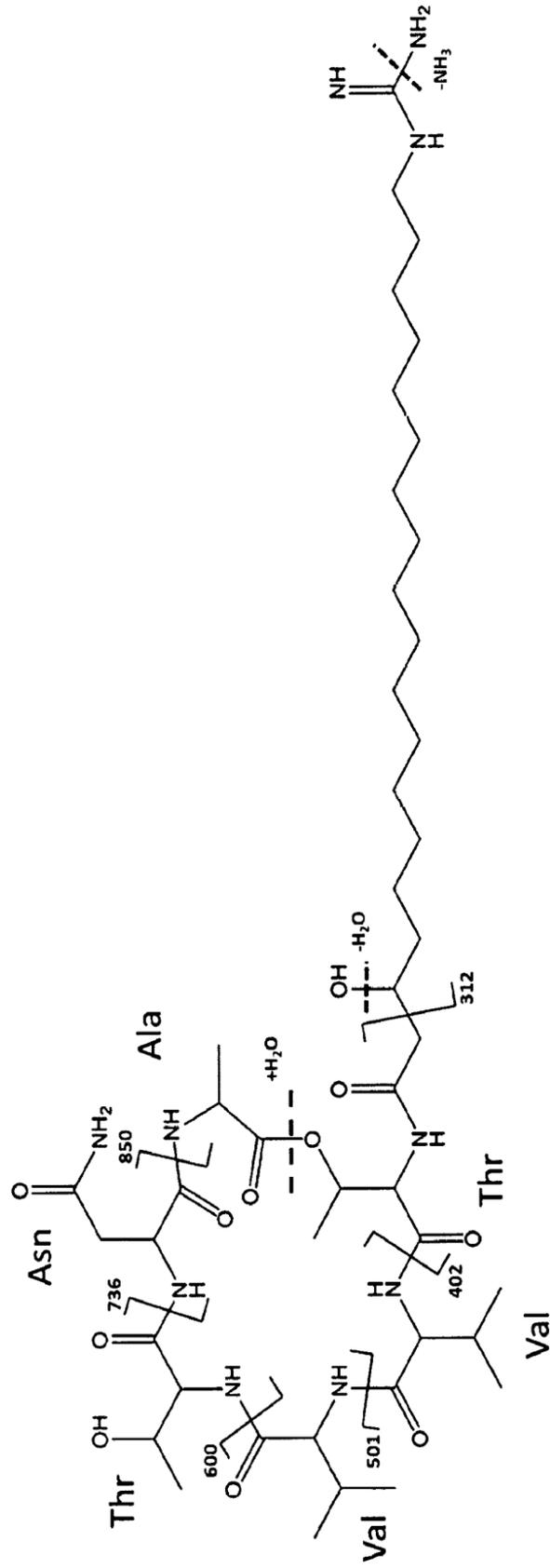


FIG. 10B

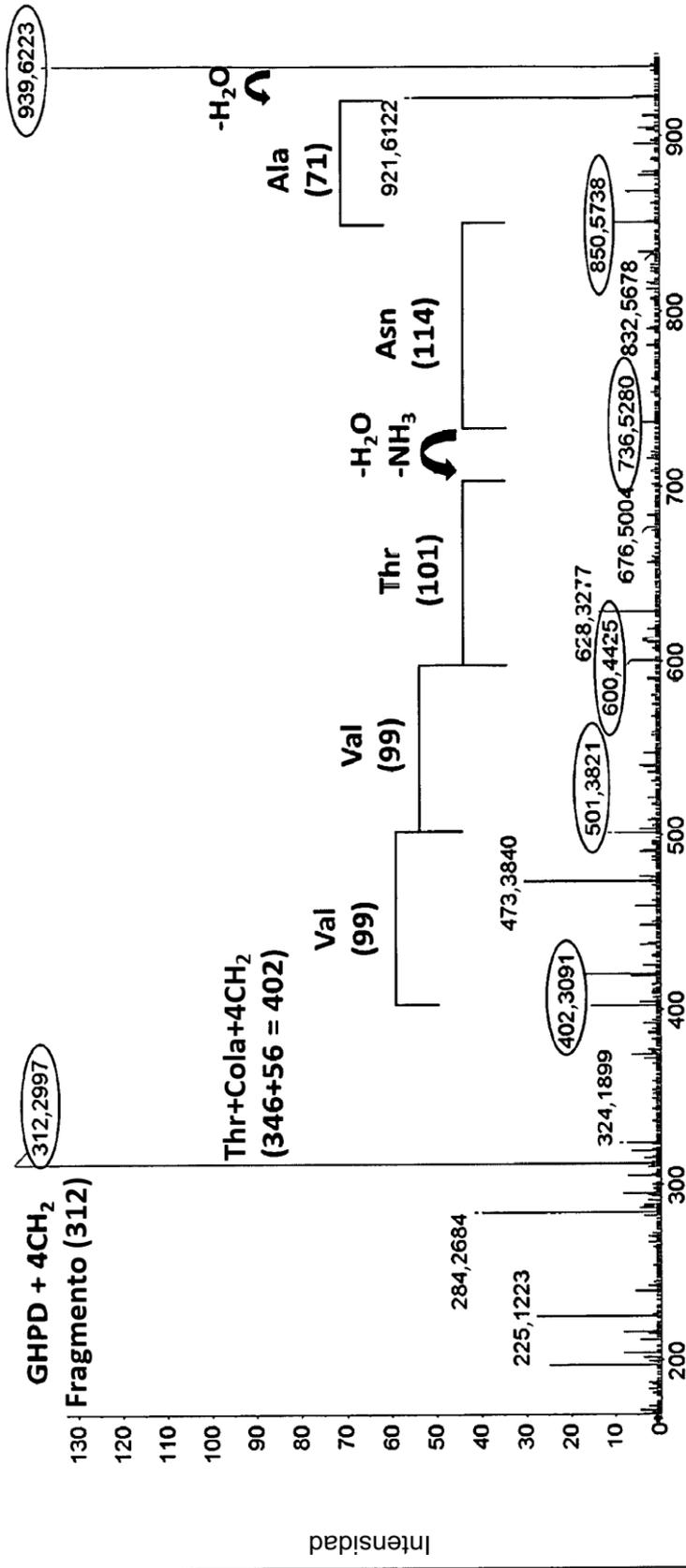
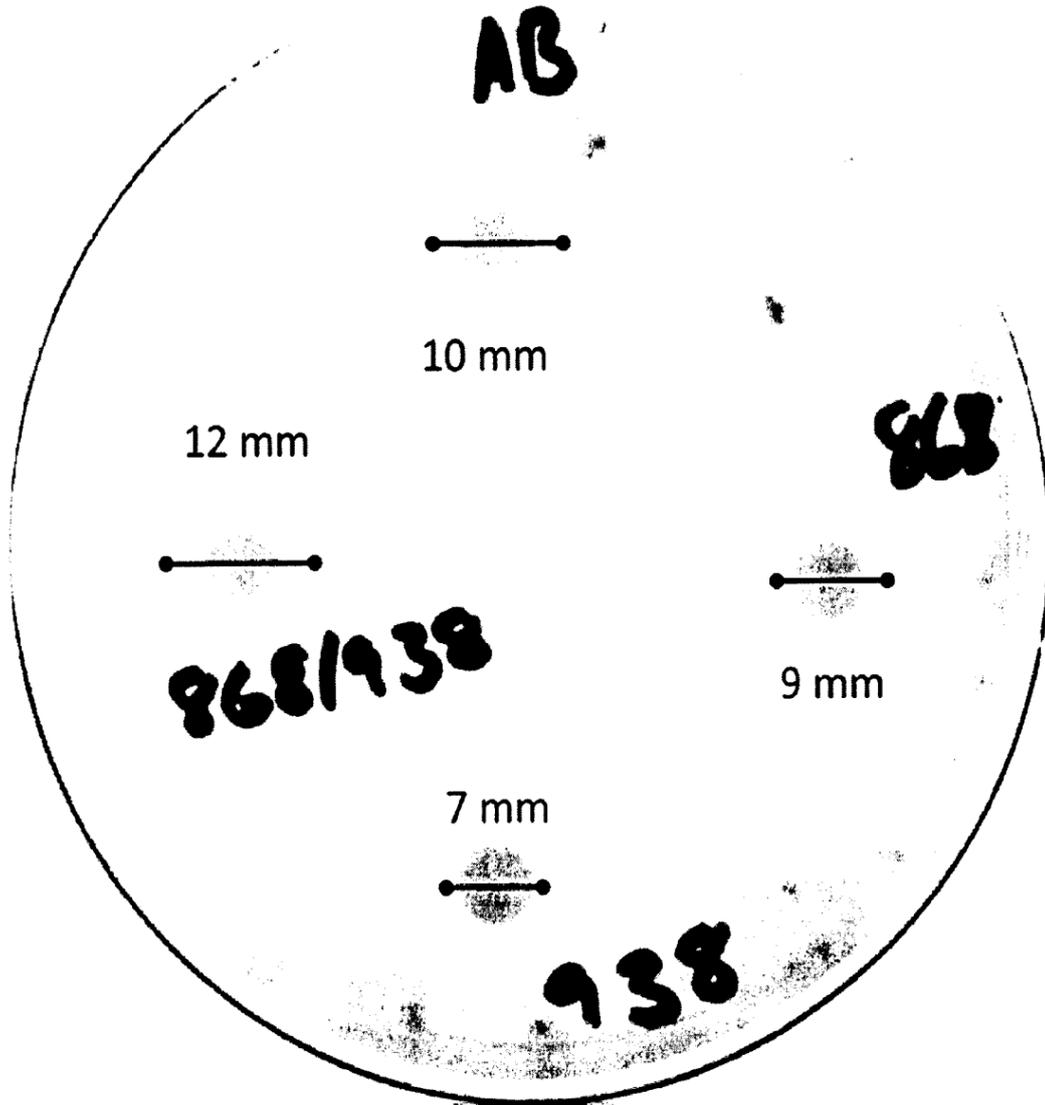


FIG. 11



Código de muestra	Nombre	COLLA
AB	Fusaricidina A y B	10 mm
868	Paeniserinas A1 y B1	9 mm
938	Paeniprolixina A2 y B2	7 mm
868/938	Combinaciones de 868 y 938	12 mm

FIG. 12A

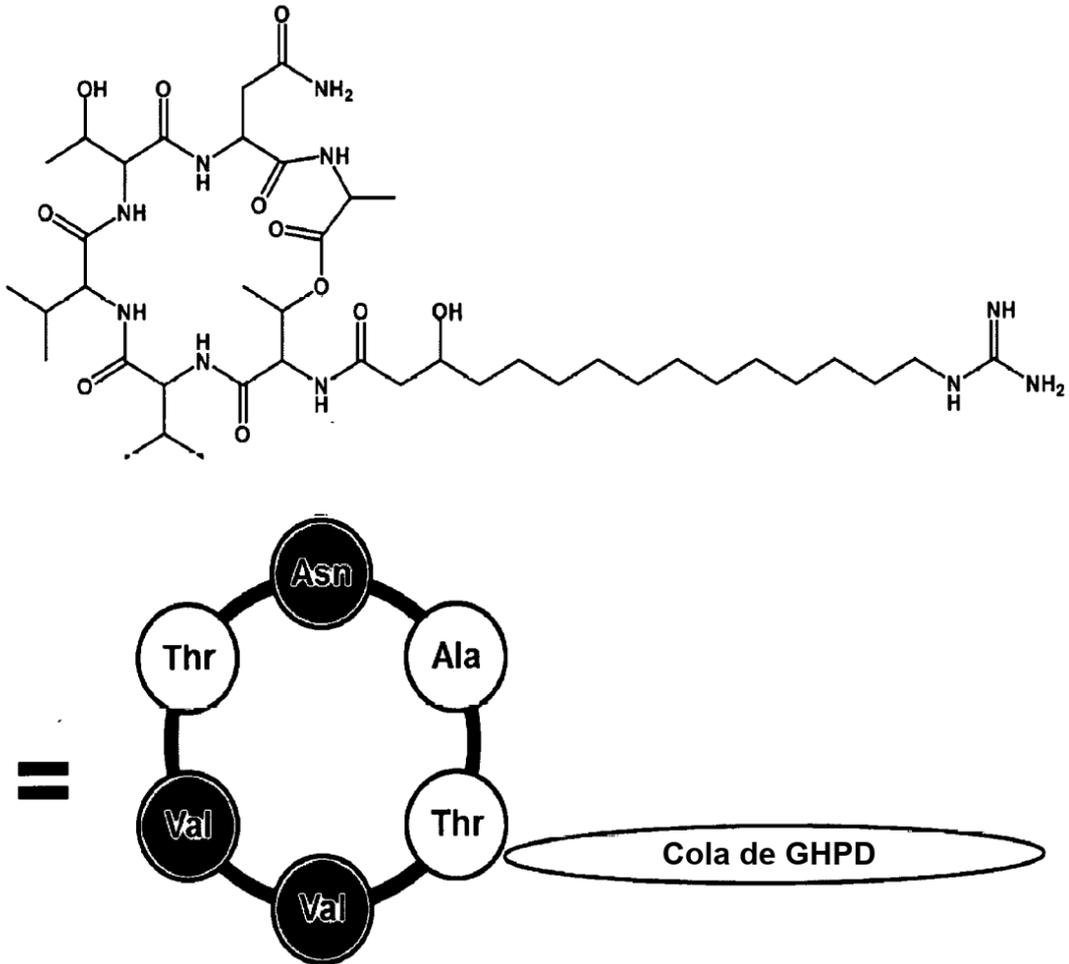


FIG. 12B

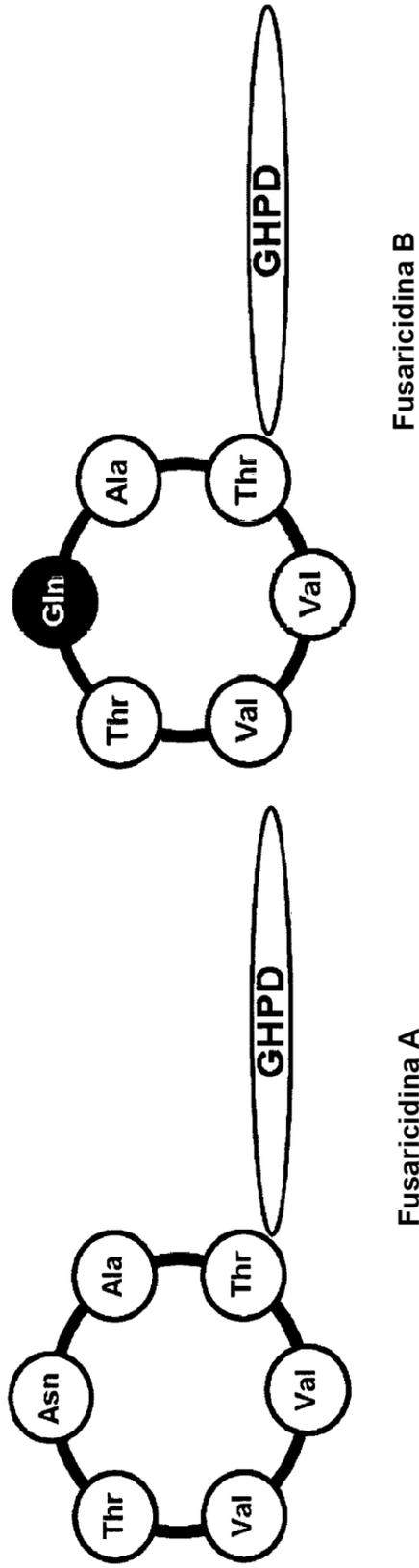


FIG. 12C

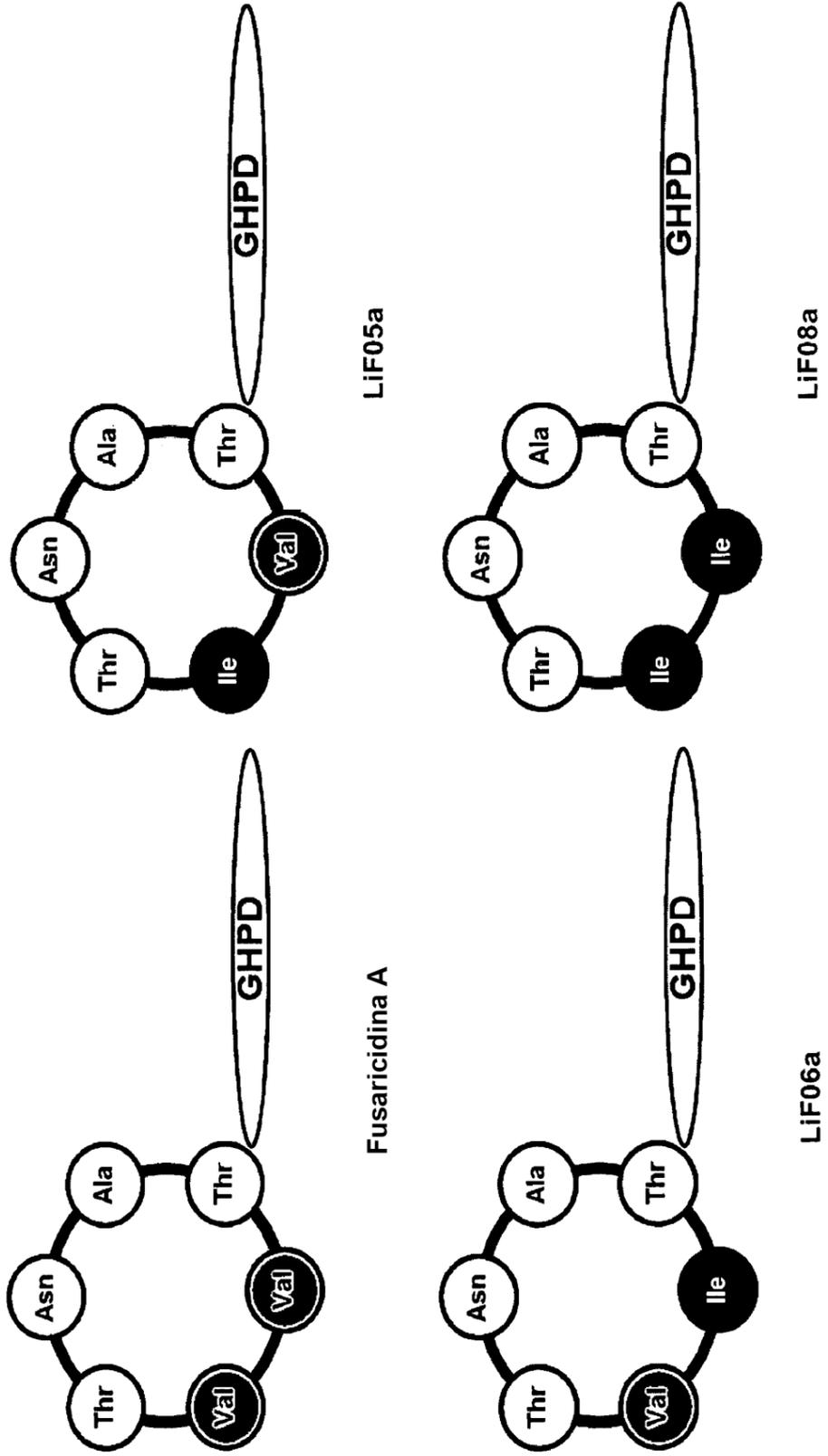


FIG. 12D

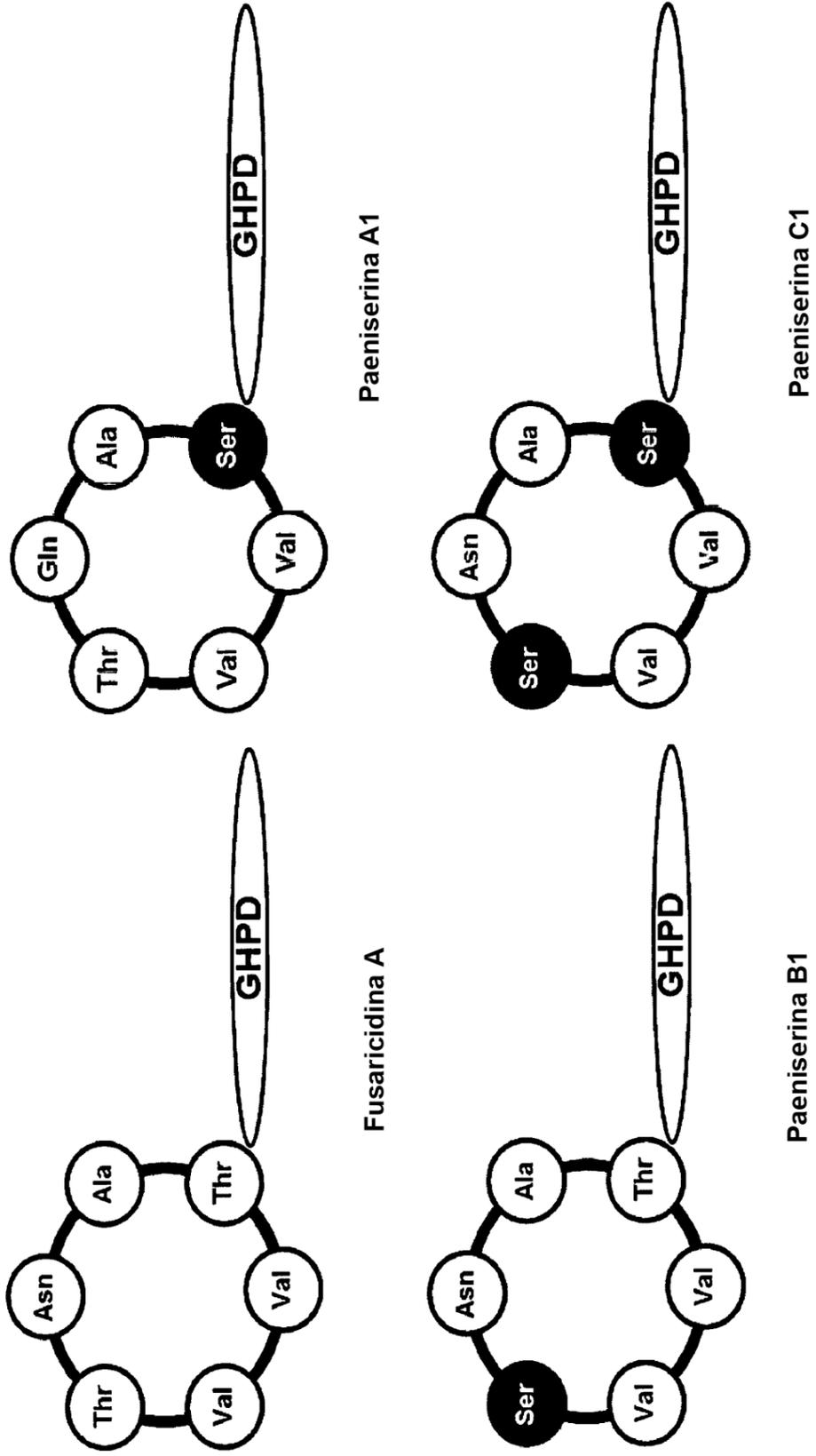
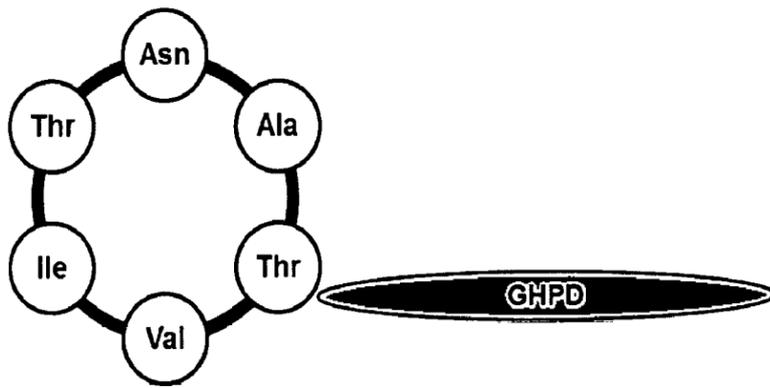
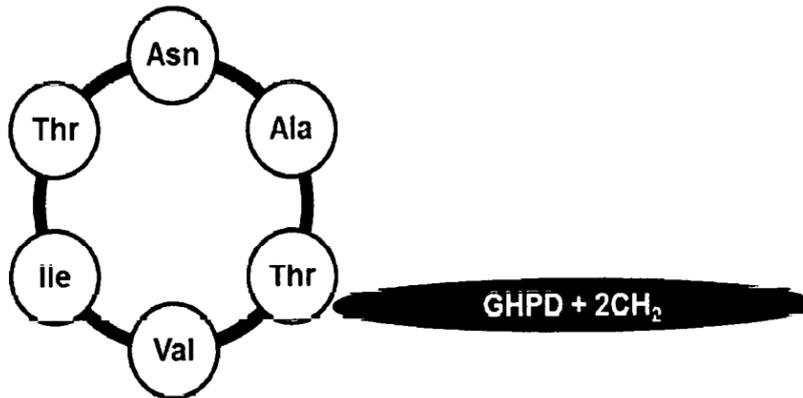


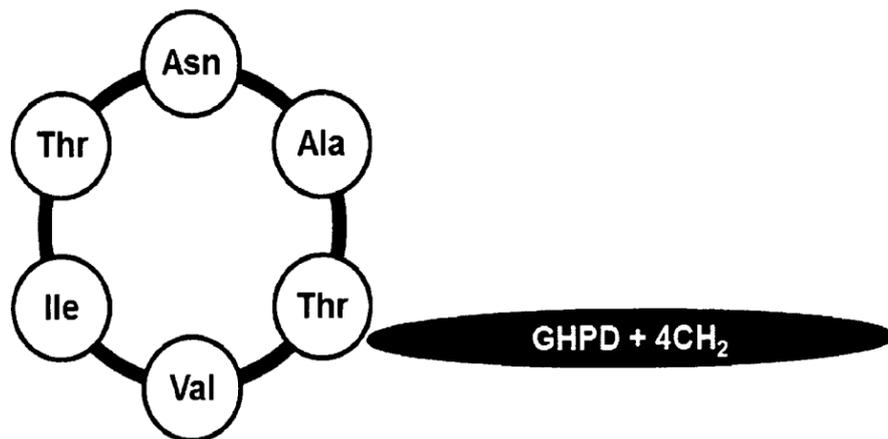
FIG. 12E



LiF05a



Paeniprolixina A2



Paeniprolixina E1



FIG. 13 (continuación)

Paenibacillus_peoriae_A	RRRLTQGIKTGDLV3LI	AERSLEMI	VGIYGIMKAGGAYVPI	DPPEYPKERI	3099
Paenibacillus_polymyxa_A	RRRLTQGIKTGDLV3LI	AERSLEMI	VGIYGIMKAGGAYVPI	DPPEYPKERI	3099
Paenibacillus_polymyxa_PKB1	RRRLTQGIKTGDLV3LI	AERSLEMI	VGIYGIMKAGGAYVPI	DPPEYPKERI	3099
Paenibacillus_polymyxa_E681	RRRLTQGIKTGDLV3LI	AERSLEMI	VGIYGIMKAGGAYVPI	DPPEYPQERI	3099
Paenibacillus_polymyxa_B	RRRLTQGIKTGDLV3LI	AERSLEMI	VGIYGIMKAGGAYVPI	DPPEYPKERI	3099
Paenibacillus_polymyxa_SQR	RRLRAEGIKTGDVGLL	VERSTDMI	VGMYGIMKAGGAYVPI	DPPEYPKERI	3100
Paenibacillus_polymyxa_C	RRLRAEGIKTGDVGLL	VERSTDMI	VGMYGIMKAGGAYVPM	DPPEYPKERI	3100
Paenibacillus_polymyxa_M1	RRLRAEGIKTGDVGLL	VERSTDMI	VGMYGIMKAGGAYVPI	DPPEYPKERI	3100
Paenibacillus_polymyxa_SC2	RRLRAEGIKTGDVGLL	VERSTDMI	VGMYGIMKAGGAYVPI	DPPEYPKERI	3100
Paenibacillus_sp_NRRL B-50972	-----	-----	-----	-----	-----
Paenibacillus_sp_A	RKLRNQC	IQTGDVGLL	ADRSEMIVGIYGIMKAGGAYVPI	DPPEYPKERI	3099
Paenibacillus_peoriae_A	SYMLEDSGAKLILTQA	HLEHLGWTENVLL	LLDESSTYDADT	SNLEDTAGP	3149
Paenibacillus_polymyxa_A	SYMLEDSGAKLILTQA	HLEHLGWTENVLL	LLDESSTYDADT	SNLEDTAGP	3149
Paenibacillus_polymyxa_PKB1	SYMLEDSGAKLILTQA	HLEHLGWTENVLL	LLDESSTYDADT	SNLEDTAGP	3149
Paenibacillus_polymyxa_E681	SYMLEDSGAKLILTQA	HLEHLGWTENVLL	LLDESSTYDADT	SNLEDTAGP	3149
Paenibacillus_polymyxa_B	SYMLEDSGAKLILTQA	HLEHLGWTENVLL	LLDESSTYDADT	SKLEDTAGP	3149
Paenibacillus_polymyxa_SQR	NYMLEDSTGKMI	LTAQAHLEHIGW	GNVLLLEEPSTYDA	ESNLKDTADS	3150
Paenibacillus_polymyxa_C	NYMLEDSTGKMI	LAQAHLLEHIDW	GNVLLLEEPSTYDA	ESNLKDTANS	3150
Paenibacillus_polymyxa_M1	NYMLEDSTGKMI	LAQAHLLEHIGW	TGNVLLLEPSTYDA	DTSNLKDTADP	3150
Paenibacillus_polymyxa_SC2	NYMLEDSTGKMI	LAQAHLLEHIGW	TGNVLLLEPSTYDA	DTSNLKDTADP	3150
Paenibacillus_sp_NRRL B-50972	-----	-----	-----	-----	-----
Paenibacillus_sp_A	SYMLEDSGAKLVL	TQARLLEHLGWTENV	LLLEPSTYDADT	SNLKDVTGP	3149

FIG. 13 (continuación)

Paenibacillus_peoriae_A	DDLAYVIYTSGTTGQPKGVLVEHRGLPN_SDVYGAHFVTPQDRIVQFAS	3199
Paenibacillus_polymyxa_A	DDLAYVIYTSGTTGQPKGVLVEHRGLPN_SNVYGAHFVTPQDRIVQFAS	3199
Paenibacillus_polymyxa_PKB1	DDLAYVIYTSGTTGQPKGVLVEHRGLPN_SDVYGFHFVTPQDRIVQFAS	3199
Paenibacillus_polymyxa_E681	DDLAYVIYTSGTTGQPKGVLVEHRGLPN_SDVYGAHFVTPQDRIVQFAS	3199
Paenibacillus_polymyxa_B	DDLAYVIYTSGTTGQPKGVLVEHRGLPN_SDVYGAHFVTPQDRIVQFAS	3199
Paenibacillus_polymyxa_SQR	DDLAYVIYTSGTTGQPKGVLVEHRGLRN_SDVYRGLFVTPQDRIVQFAS	3200
Paenibacillus_polymyxa_C	DDLAYVIYTSGTTGQPKGVLVEHRGLRN_SDVYRGLFVTPQDRIVQFAS	3200
Paenibacillus_polymyxa_M1	DDLAYVIYTSGTTGRPKGVLVEHRGLQN_SDVYRGLFVTPQDRIVQFAS	3200
Paenibacillus_polymyxa_SC2	DDLAYVIYTSGTTGRPKGVLVEHRGLQNLSDVYRGLFVTPQDRIVQFAS	3200
Paenibacillus_sp_NRRL B-50972	-----	
Paenibacillus_sp_A	DNLAYVIYTSGTTGQPKGVLVEHRGLQNLSDVYGYTYFVTPQDRIVQFAS	3199
Paenibacillus_peoriae_A	LSFDASVSEILTALSHGGVLCIPSTEDILDHALFEQFMNDKGVTVATLPP	3249
Paenibacillus_polymyxa_A	LSFDASVSEILTALSHGGVLCIPSTEDILDHALFEQFMNDKGVTVATLPP	3249
Paenibacillus_polymyxa_PKB1	LSFDASVSEILTALSHGGVLCIPSTQDILDHALFEQFMNDKGVTVATLPP	3249
Paenibacillus_polymyxa_E681	LSFDASVSEILTALSHGGVLCIPSAQDILDHALFEQFMNDKGVTVATLPP	3249
Paenibacillus_polymyxa_B	LSFDASVSEILTALSHGGVLCIPSTQDILDHVLFQFMNDKGVTVATLPP	3249
Paenibacillus_polymyxa_SQR	LSFDASVSEIITALSHGATLTCIPSTQDILDHALFEQFMNSKAITIATLPP	3250
Paenibacillus_polymyxa_C	LSFDASVSEIITALSHGATLTCIPSTQDILDHALFEQFMNSKAITIATLPP	3250
Paenibacillus_polymyxa_M1	LSFDASVSEILTTLSHGATLTCIPSTQEILDHALFEQFMNDKGVTVATLPP	3250
Paenibacillus_polymyxa_SC2	LSFDASVSEILTTLSHGATLTCIPSTQEILDHALFEQFMNDKGVTVATLPP	3250
Paenibacillus_sp_NRRL B-50972	-----	
Paenibacillus_sp_A	LSFDASVSEVLTALSHGAALCIPSTQDILDYALFEQFINDKGITIATLPP	3249





FIG. 13 (continuación)

Paenibacillus_peoriae_A	KLEVSELRAVLSEMLPGYMIPSRFIQLEDMP	3499
Paenibacillus_polymyx_A	KLEVSELRAVLSEILPGYMIPSRFIQLEDMP	3499
Paenibacillus_polymyx_PKB1	KLEVSELRAVLSEMLPGYMIPSRFIQLEDMP	3499
Paenibacillus_polymyx_E681	KLEVSELRAVLSEMLPGYMIPSRFIQLEDML	3499
Paenibacillus_polymyx_B	KLEVSELRAVLSEMLPGYMIPSRFIQLEDMP	3499
Paenibacillus_polymyx_SQR	KLEVSELRAVLSEMLPGYMIPSRFVQLEDMP	3500
Paenibacillus_polymyx_C	KLEVSELRAVLSEMLPGYMIPSRFVQLEDMP	3500
Paenibacillus_polymyx_M1	KLEVSELRADLSEMLPGYMIPSRFIQLEDMP	3500
Paenibacillus_polymyx_SC2	KLEVSELRADLSEMLPGYMIPSRFIQLEDMP	3500
Paenibacillus_sp_NRR1 B-50972	TIEISELRAVLSELLPVYMIPSHFVQLENPL	3199
Paenibacillus_sp_A	ELEVSELTQTVLSEMLPGYMIPSRFIQLEDMP	3499

:\*:\*\*\*:: \*\*\*:\*\* \*\*\*\*\*:\*\*\*: \*\*...\*\*\*:\*\*\*\*:\*\*\*:\*\*\*  
 :\*:\*\*\*:: \*\*\*:\*\* \*\*\*\*\*:\*\*\*: \*\*...\*\*\*:\*\*\*\*:\*\*\*:\*\*\*

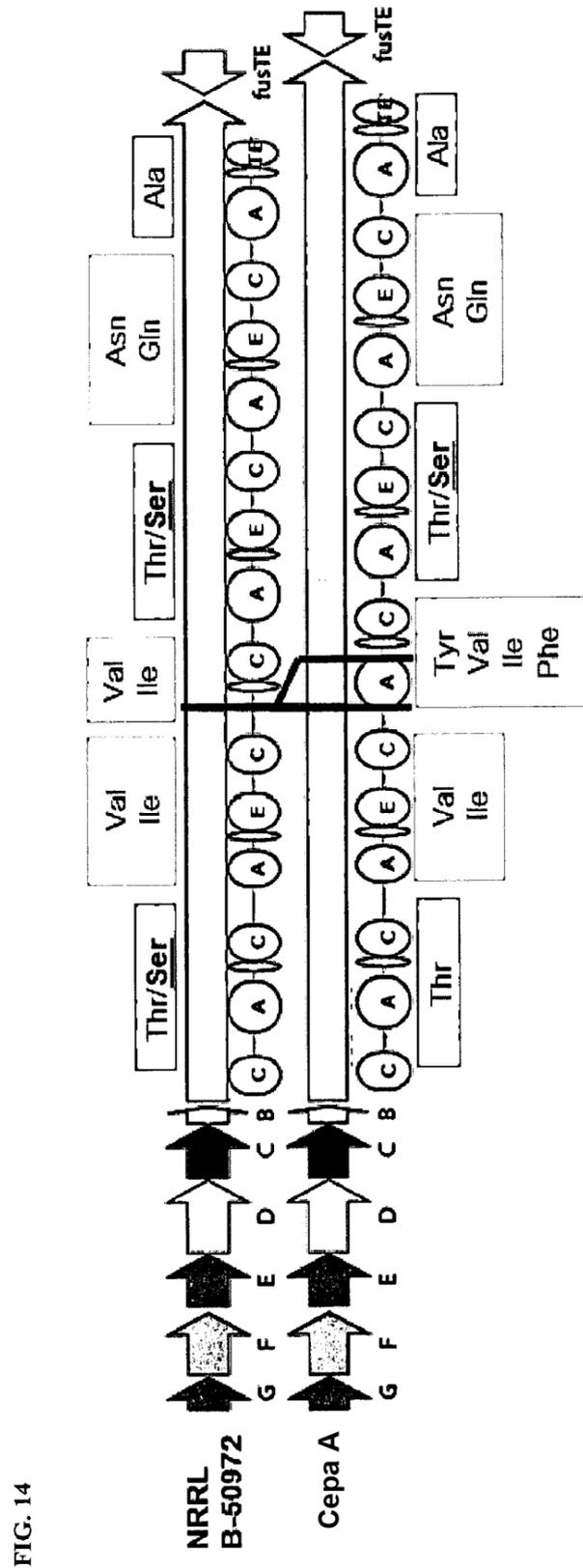


FIG. 15

	20			40		60
NRRL B-50972	TTGCAAAAAA	TTGAGGTATT	GTTGGCTGAT	GACAACCGGG	AATTTACGAA	TCTGCTTGCC
NRRL B-67129	TTGCAAAAAA	TTGAGGTATT	GTTGGCTGAT	GACAACCGGG	AATTTACGAA	TCTGCTTGCC
	80			100		120
NRRL B-50972	GAATATATTT	CCGATCAGGA	GGATATGGAA	GTTACAGGAA	TCGCCATATA	TGGTGAAGAA
NRRL B-67129	GAATATATTT	CCGATCAGGA	GGATATGGAA	GTTACAGGAA	TCGCCATATA	TGGTGAAGAA
	140			160		180
NRRL B-50972	GTGCTCCAAC	ACATCGCAGA	ATCCCGCAAC	GTACCTGATG	TACTTATTTT	AGATATTATC
NRRL B-67129	GTGCTCCAAC	ACATCGCAGA	ATCCCGCAAC	GTACCTGATG	TACTTATTTT	AGATATTATC
	200			220		240
NRRL B-50972	ATGCCTCATC	TGGATGGTCT	CGGCCGTATTG	GAGCGCTTGA	GAGAAATGAA	CCTGTCTCCA
NRRL B-67129	ATGCCTCATC	TGGATGGTCT	CGGCCGTATTG	GAGCGCTTGA	GAGAAATGAA	CCTGTCTCCA
	260			280		300
NRRL B-50972	CAGCCGAAAA	TCATTATGCT	GACTGCATTC	GGTCAAGAAA	ATATTACGCA	AAGAGCCGTA
NRRL B-67129	CAGCCGAAAA	TCATTATGCT	GACTGCATTC	GGTCAAGAAA	ATATTACGCA	AAGAGCCGTA
	320			340		360
NRRL B-50972	CAGCTCGGGG	CATCTTATTA	TATTTTGAAG	CCGTTTGACA	TGGAAGTGCT	TGCCAACCGT
NRRL B-67129	CAGCTCGGGG	CATCTTATTA	TATTTTGAAG	CCGTTTGACA	TGGAAGTGCT	TGCCAACCGT
	380			400		420
NRRL B-50972	GTTTCGTCAAT	TGGTGGGACC	ACAAATTAGTC	AGCAGCAGTC	CGGTGACGGT	TTCTTCCATG
NRRL B-67129	GTTTCGTCAAT	TGGTGGGACC	ACAAATTAGTC	AGCAGCAGTC	CGGTGACGGT	TTCTTCCATG

FIG. 15 (continuación)

	440		460		480
NRRL B-50972	CGGTCTAATG	TGGTGCCAAT	GGGCAAAACG	AAAAACCTGG	ATGCCAGTAT
NRRL B-67129	CGGTCTAATG	TGGTGCCAAT	GGGCAAAACG	AAAAACCTGG	ATGCCAGTAT
	500		520		540
NRRL B-50972	ATCCATGAAA	TCGGTGTGCC	AGCTCATATT	AAGGGCTATC	AATATTTACG
NRRL B-67129	ATCCATGAAA	TCGGTGTGCC	AGCTCATATT	AAGGGCTATC	AATATTTACG
	560		580		600
NRRL B-50972	ACTATGGTGT	ACAATAATAT	CGAAATTTTG	GGTGCCATCA	CCAAAACATT
NRRL B-67129	ACTATGGTGT	ACAATAATAT	CGAAATTTTG	GGTGCCATCA	CCAAAACATT
	620		640		660
NRRL B-50972	ATCGCCGAAA	AATTTAAAAC	GACGGCATCC	CGCGTGGAAC	GCGCCATTTCG
NRRL B-67129	ATCGCCGAAA	AATTTAAAAC	GACGGCATCC	CGCGTGGAAC	GCGCCATTTCG
	680		700		720
NRRL B-50972	GAGGTAGCAT	GGACACGTGG	CAACATCGAC	AGCATCTCTC	ATCTGTTTCGG
NRRL B-67129	GAGGTAGCAT	GGACACGTGG	CAACATCGAC	AGCATCTCTC	ATCTGTTTCGG
	740		760		780
NRRL B-50972	AATATCTCCA	AATCCAAGCC	GACCAACTCA	GAGTTTATTG	CGATGGTAGC
NRRL B-67129	AATATCTCCA	AATCCAAGCC	GACCAACTCA	GAGTTTATTG	CGATGGTAGC
	800				
NRRL B-50972	CGGATTGAGA	ATAAGGTGTC	CTGA	804	
NRRL B-67129	CGGATTGAGA	ATAAGGTGTC	CTGA	804	



FIG. 16

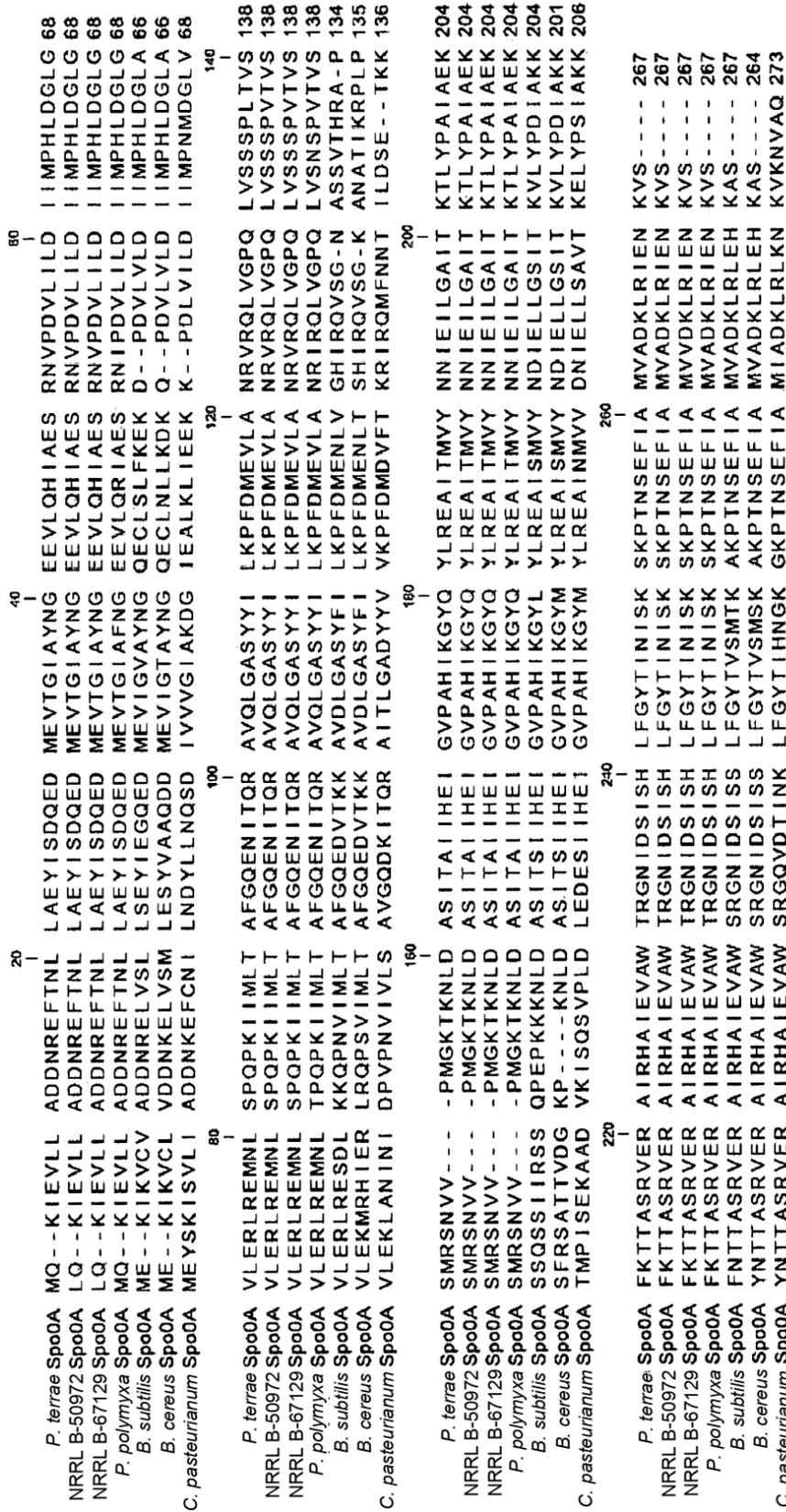
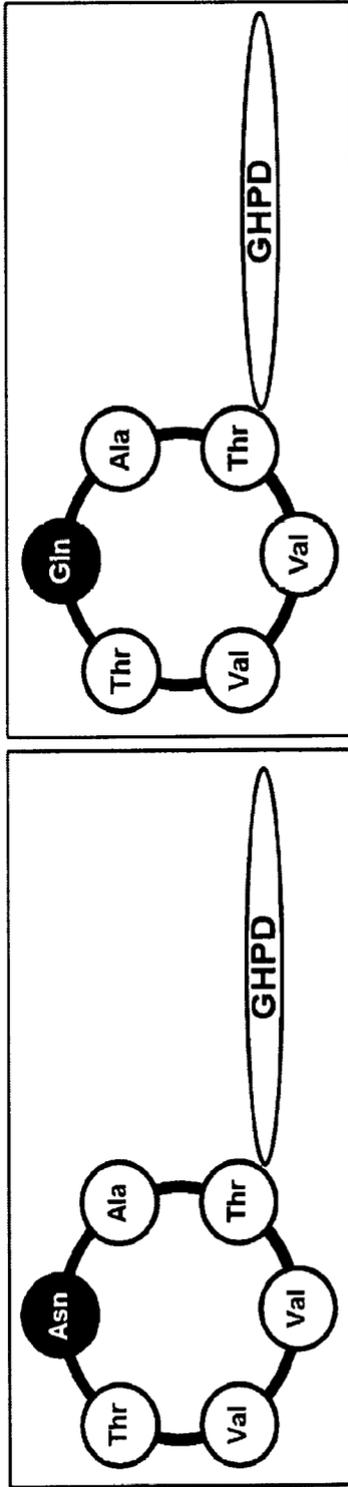
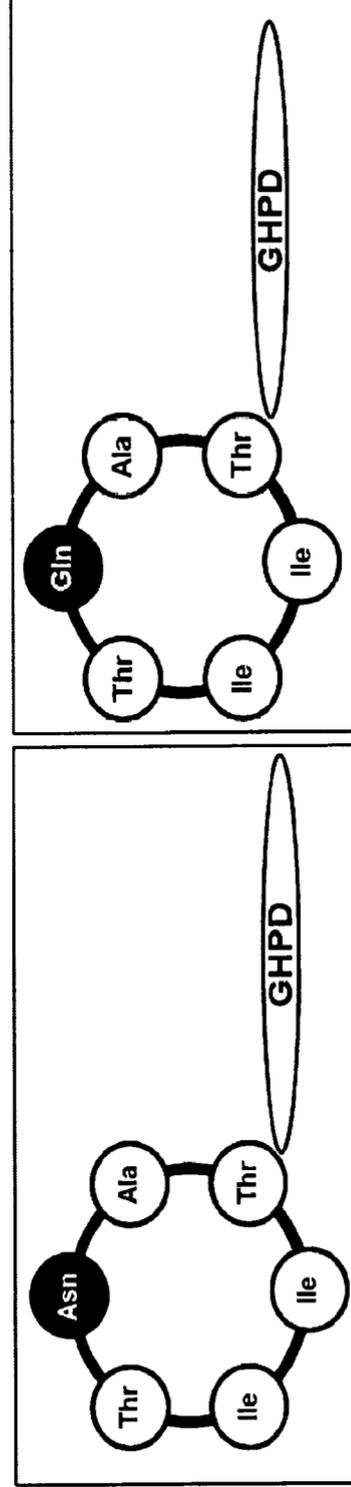


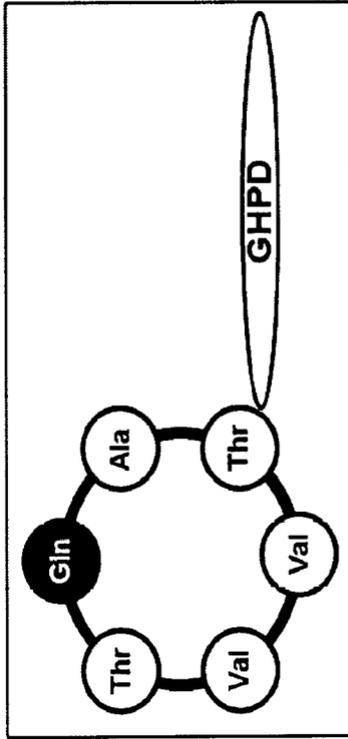
FIG. 17



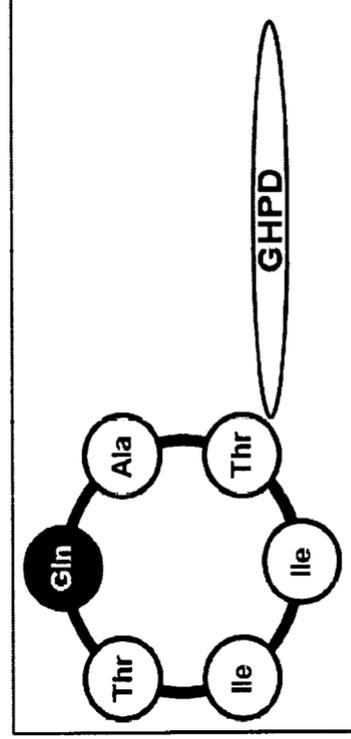
Fusaricidina A  
CIM<sub>80</sub> ALTESO: 1,6 µg/ml



LiF08a  
CIM<sub>80</sub> ALTESO: 1,6 µg/ml

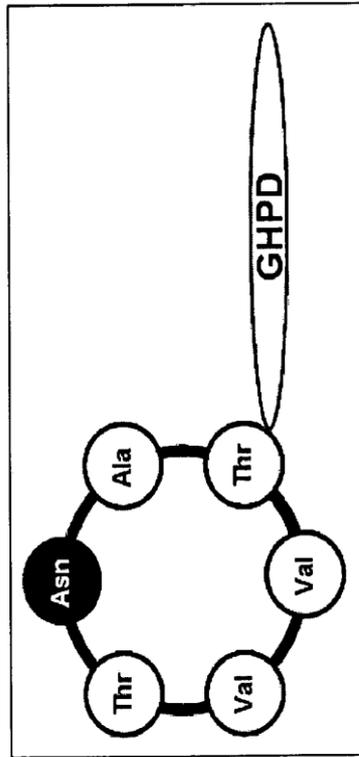


Fusaricidina B  
CIM<sub>80</sub> ALTESO: 5,0 µg/ml

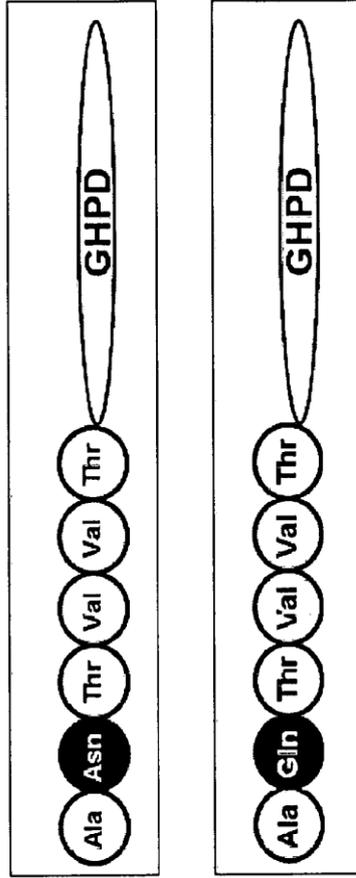


LiF08b  
CIM<sub>80</sub> ALTESO: 3,8 µg/ml

FIG. 17 (continuación)

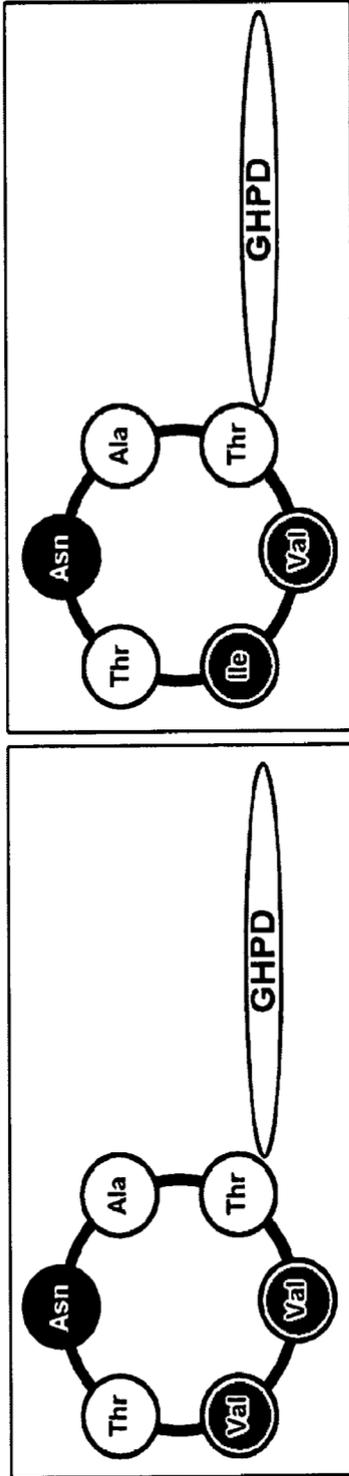


Fusaricidina A  
CIM<sub>80</sub> ALTESO: 1,6 µg/ml

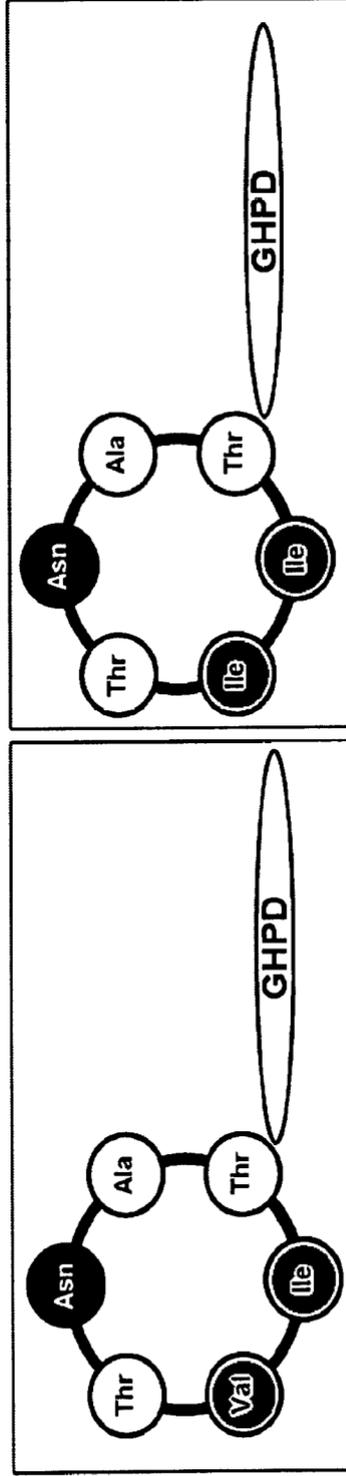


LiF04c y LiF04d (mezcla 2:1)  
CIM<sub>80</sub> ALTESO: >50 µg/ml

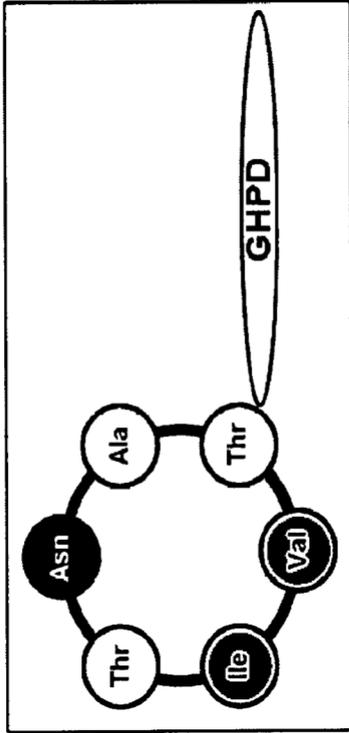
FIG. 17 (continuación)



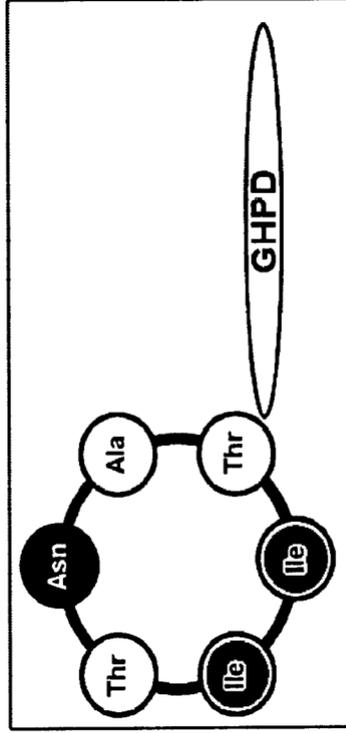
Fusaricidina A  
CIM<sub>80</sub> ALTESO: 1,6 µg/ml



LiF06a  
CIM<sub>80</sub> ALTESO: 5,0 µg/ml

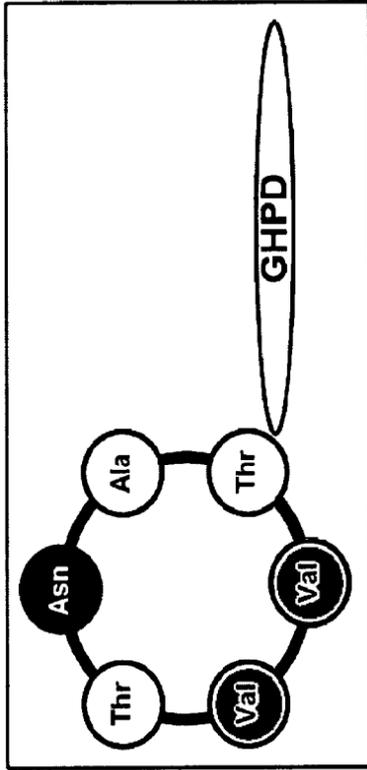


LiF05a  
CIM<sub>80</sub> ALTESO: 5,0 µg/ml



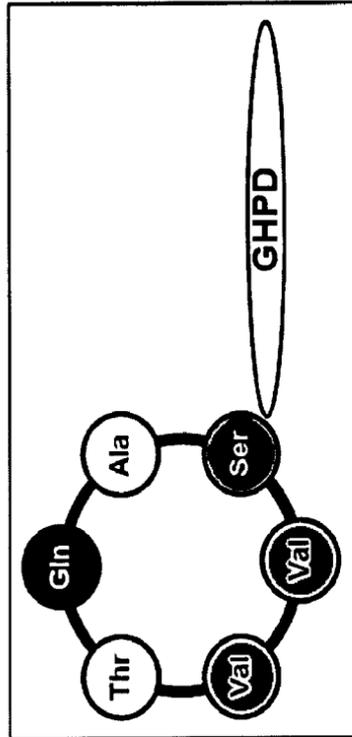
LiF08a  
CIM<sub>80</sub> ALTESO: 1,6 µg/ml

FIG. 17 (continuación)



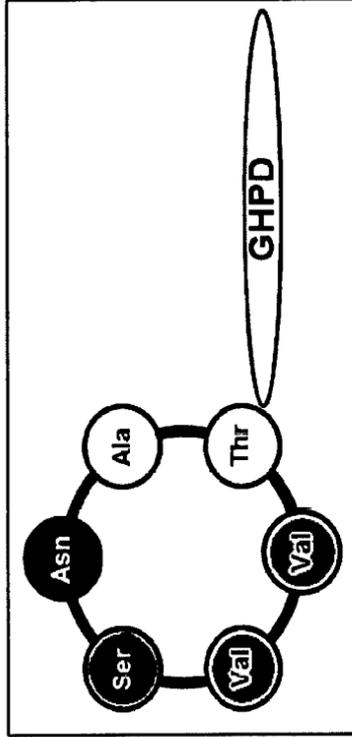
Fusaricidina A

CIM<sub>80</sub> ALTESO: 1,6 µg/ml



Paeniserina A1

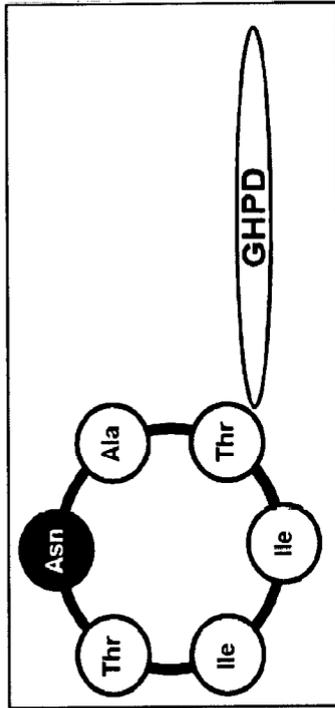
CIM<sub>80</sub> ALTESO: 1,8 µg/ml



Paeniserina B1

CIM<sub>80</sub> ALTESO: 1,8 µg/ml

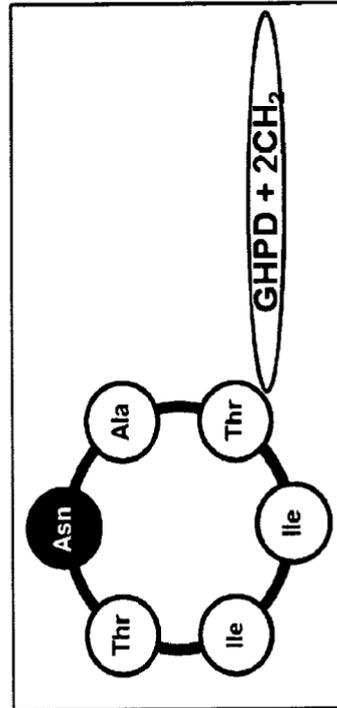
FIG. 17 (continuación)



**LiF08a**

CIM<sub>80</sub> ALTESO: 1,6 µg/ml

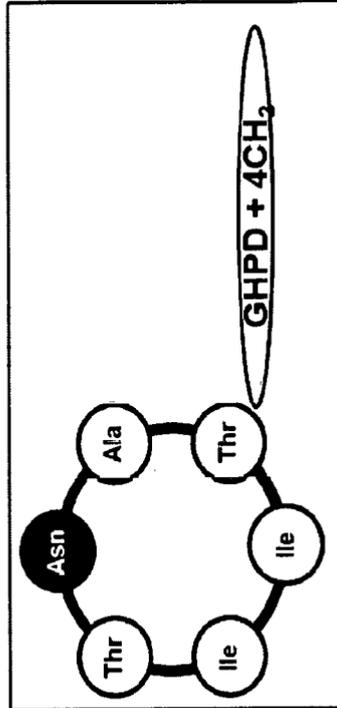
CIM<sub>80</sub> COLLILA: 11 µg/ml



**Paeniprolixina C1**

CIM<sub>80</sub> ALTESO: 4,8 µg/ml

CIM<sub>80</sub> COLLILA: 5,5 µg/ml



**Paeniprolixina G1**

CIM<sub>80</sub> ALTESO: 33 µg/ml

CIM<sub>80</sub> COLLILA: >50 µg/ml