

Señores
Superintendencia de Industria y Comercio
División de Nuevas Creaciones
E. S. D.

83
82

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicacion : 00314742 00000001
Fecha (AMD): 2003-06-01 15:31:48
Tramite : 002 PATENTES D 1 REGISTRO/ 329 COMPLETEN
Dependencia: 2003 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

Folios: 107

Ref: Expediente No. 000-14.742

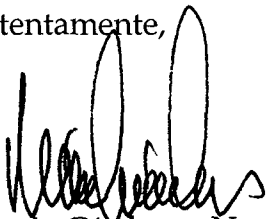
**Solicitud de Patente de Invención denominada
"Compuestos Biológicos y Métodos para Mejorar el
Crecimiento y Salud de las Plantas y para Producir
Plantas que Supriman las Enfermedades"**

**Solicitantes: 1. Auburn University
2. Gustafson, LLC.**

Dario Cárdenas Navas, identificado como aparece al pie de mi firma, en mi condición de apoderado de las sociedades **Auburn University** y **Gustafson, LLC**, solicitantes de la Patente en referencia, me permito adjuntar a este escrito una copia auténtica del documento certificado de prioridad para la patente arriba mencionada, consistente en la solicitud No. 09/511,359 presentada ante la Oficina de Patentes de los Estados Unidos de América el día Febrero 23 de 2.000, la cual va acompañada de la respectiva traducción al español.

Solicito al Despacho continuar con el presente trámite.

Atentamente,



Dario Cárdenas Navas
C.C. 17.066.629 de Bogotá
T. P. 1.250 de Minjusticia

PA 237901



THE UNITED STATES OF AMERICA

TO ALL TO WHOM THESE PRESENTS SHALL COME:

UNITED STATES DEPARTMENT OF COMMERCE

United States Patent and Trademark Office

April 21, 2000

THIS IS TO CERTIFY THAT ANNEXED HERETO IS A TRUE COPY FROM THE RECORDS OF THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE OF THOSE PAPERS OF THE BELOW IDENTIFIED PATENT APPLICATION THAT MET THE REQUIREMENTS TO BE GRANTED A FILING DATE UNDER 35 USC 111.

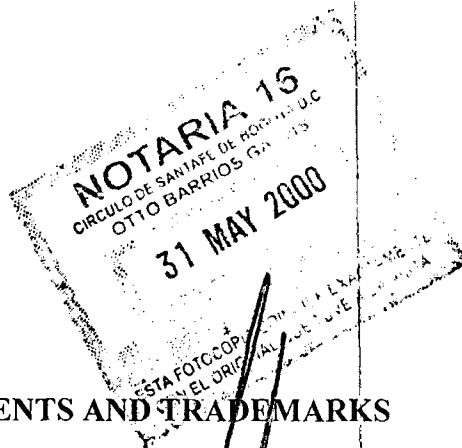
APPLICATION NUMBER: 09/511,359

FILING DATE: February 23, 2000



By Authority of the
COMMISSIONER OF PATENTS AND TRADEMARKS

T. Wallace
T. WALLACE
Certifying Officer



UTILITY PATENT APPLICATION TRANSMITTAL

(Small Entity)

(Only for new nonprovisional applications under 37 CFR 1.53(b))

Docket No.
1025-00Total Pages in this Submission
40**TO THE ASSISTANT COMMISSIONER FOR PATENTS**Box Patent Application
Washington, D.C. 20231

Transmitted herewith for filing under 35 U.S.C. 111(a) and 37 C.F.R. 1.53(b) is a new utility patent application for an invention entitled:

BIOLOGICAL COMPOSITIONS AND METHODS FOR ENHANCING PLANT GROWTH AND HEALTH AND PRODUCING DISEASE-SUPPRESSIVE PLANTS

and invented by:

Joseph W. Kloepper, Rodrigo Rodriguez-Kabana and Donald S. Kenney

If a CONTINUATION APPLICATION, check appropriate box and supply the requisite information:

☐ Continuation ☐ Divisional ☐ Continuation-in-part (CIP) of prior application No.: _____

Which is a:

☐ Continuation ☐ Divisional ☐ Continuation-in-part (CIP) of prior application No.: _____

Which is a:

☐ Continuation ☐ Divisional ☐ Continuation-in-part (CIP) of prior application No.: _____

Enclosed are:

Application Elements

1. ☐ Filing fee as calculated and transmitted as described below
2. ☒ Specification having 34 pages and including the following:
 - a. ☒ Descriptive Title of the Invention
 - b. ☒ Cross References to Related Applications (if applicable)
 - c. ☐ Statement Regarding Federally-sponsored Research/Development (if applicable)
 - d. ☐ Reference to Microfiche Appendix (if applicable)
 - e. ☒ Background of the Invention
 - f. ☒ Brief Summary of the Invention
 - g. ☒ Brief Description of the Drawings (if drawings filed)
 - h. ☒ Detailed Description
 - i. ☒ Claim(s) as Classified Below
 - j. ☒ Abstract of the Disclosure

NOTARIA 16
CIRCUITO DE SAN JUAN DE BOGOTA D.C.
OTTO BALDRIN GALVIS
31 MAY 2000

ESTA COPIA CONCORDA EXACTAMENTE
CON EL ORIGINAL QUE FUE A LA VISTA

UTILITY PATENT APPLICATION TRANSMITTAL
(Small Entity)

(Only for new nonprovisional applications under 37 CFR 1.53(b))

Docket No.
1025-00

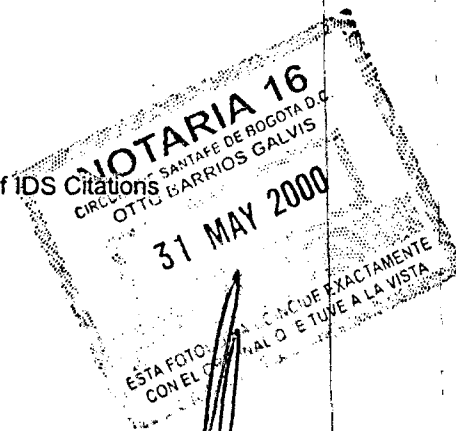
Total Pages in this Submission
40

Application Elements (Continued)

3. ☐ Drawing(s) (when necessary as prescribed by 35 USC 113)
a. ☐ Formal b. ☐ Informal Number of Sheets _____
4. ☒ Oath or Declaration
a. ☐ Newly executed (original or copy) ☒ Unexecuted
b. ☐ Copy from a prior application (37 CFR 1.63(d)) (for continuation/divisional application only)
c. ☒ With Power of Attorney ☐ Without Power of Attorney
d. ☐ DELETION OF INVENTOR(S)
Signed statement attached deleting inventor(s) named in the prior application,
see 37 C.F.R. 1.63(d)(2) and 1.33(b).
5. ☐ Incorporation By Reference (usable if Box 4b is checked)
The entire disclosure of the prior application, from which a copy of the oath or declaration is supplied
under Box 4b, is considered as being part of the disclosure of the accompanying application and is hereby
incorporated by reference therein.
6. ☐ Computer Program in Microfiche
7. ☐ Genetic Sequence Submission (if applicable, all must be included)
a. ☐ Paper Copy
b. ☐ Computer Readable Copy
c. ☐ Statement Verifying Identical Paper and Computer Readable Copy

Accompanying Application Parts

8. ☐ Assignment Papers (cover sheet & documents)
9. ☐ 37 CFR 3.73(b) Statement (when there is an assignee)
10. ☐ English Translation Document (if applicable)
11. ☐ Information Disclosure Statement/PTO-1449 ☐ Copies of IDS Citations
12. ☐ Preliminary Amendment
13. ☒ Acknowledgment postcard
14. ☐ Certificate of Mailing
☐ First Class ☐ Express Mail (Specify Label No.): _____



87
86

UTILITY PATENT APPLICATION TRANSMITTAL (Small Entity) <i>(Only for new nonprovisional applications under 37 CFR 1.53(b))</i>	Docket No. 1025-00				
	Total Pages in this Submission 40				
Accompanying Application Parts (Continued)					
15. ☐ Certified Copy of Priority Document(s) <i>(if foreign priority is claimed)</i>					
16. ☐ Small Entity Statement(s) - Specify Number of Statements Submitted: _____					
17. ☐ Additional Enclosures <i>(please identify below)</i> : 					
Fee Calculation and Transmittal					
CLAIMS AS FILED					
For	#Filed	#Allowed	#Extra	Rate	Fee
Total Claims	55	- 20 =	35	x \$9.00	\$315.00
Indep. Claims	9	- 3 =	6	x \$39.00	\$234.00
Multiple Dependent Claims (check if applicable) ☐					\$0.00
BASIC FEE					\$380.00
OTHER FEE <i>(specify purpose)</i> _____					\$0.00
TOTAL FILING FEE					\$929.00
☐ A check in the amount of _____ to cover the filing fee is enclosed. ☒ The Commissioner is hereby authorized to charge and credit Deposit Account No. 13-3405 as described below. A duplicate copy of this sheet is enclosed. ☐ Charge the amount of _____ as filing fee. ☒ Credit any overpayment. ☐ Charge any additional filing fees required under 37 C.F.R. 1.16 and 1.17. ☐ Charge the issue fee set in 37 C.F.R. 1.18 at the mailing of the Notice of Allowance, pursuant to 37 C.F.R. 1.311(b).					
Dated: 2/23/00 GERARD J. WEISER, 19763					
cc:					

88
87

1025-00 (922.6739)

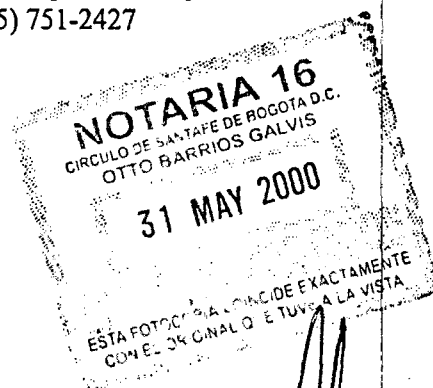
**PATENT APPLICATION
FOR UNITED STATES LETTERS PATENT**

FOR

**BIOLOGICAL COMPOSITIONS AND METHODS FOR
ENHANCING PLANT GROWTH AND HEALTH AND
PRODUCING DISEASE-SUPPRESSIVE PLANTS**

Inventors: Joseph W. Kloepper
Rodrigo Rodriguez-Kabana
Donald S. Kenney

Prepared by: Schnader Harrison Segal & Lewis LLP
1600 Market Street, 36th Floor
Philadelphia, Pennsylvania 19103
(215) 751-2427



00511355 022300

29
88

**Biological Compositions and Methods for
Enhancing Plant Growth and Health and
Producing Disease-Suppressive Plants**

5

CROSS-REFERENCE TO RELATED APPLICATIONS

This application is based on provisional application Serial No. 60/122,311, filed March 1, 1999, and provisional application Serial No. 60/139,850, filed June 18, 1999 entitled: Biological Preparations for Enhanced Plant Growth and Health", Attorney Docket No. 922.6739PROV. This application claims the benefit of the filing dates of the above-identified provisional applications, which are incorporated herein by reference in its entirety.

10

BACKGROUND OF THE INVENTION

15

Field of Invention

20

The invention relates to improvements in plants. In particular, the invention relates to improved biological compositions which are effective to increase the growth rate of seedlings and develop systemic disease immunity in plants and to control soil nematodes. The invention relates also to seeds treated with the composition and to the treated seedlings and plants.

Organic Amendments and Chitin

25

Naturally occurring nematode suppressiveness has been reported for several agricultural systems (Stirling *et al.*, 1979, Kerry, 1982, Kluepfel *et al.*, 1993), but suppressiveness can also be induced by crop rotation with antagonistic plants such as switchgrass (*Panicum virgatum*) (Kokalis-Burelle *et al.*, 1995) and velvetbean (*Mucuna deeringiana*) (Vargas *et al.*, 1994) or organic amendments including pine bark (Kokalis-Burelle *et al.*, 1994), hemicellulose (Culbreath *et al.*, 1985), and chitin (Mankau and Das, 1969, Spiegel *et al.*, 1986, Rodriguez-Kábana and Morgan-Jones, 1987). A major component of the suppressiveness of chitin amendments is believed to be biotic, and several reports confirm increased numbers of nematode antagonistic microorganisms associated with chitin-induced suppressive soils (Godoy *et al.*, 1983, Rodriguez-Kábana *et al.*, 1984). Extensive work has been done over the past years on fungi associated with chitin amendments (Godoy *et al.*, 1983, Rodriguez-Kábana *et al.*, 1984), while less information is available on bacterial community structure and the role of bacteria in chitin-induced suppressiveness.

30

35

Chitin, a glucosamine polysaccharide, is a structural component of some fungi, insects, various crustaceans and nematode eggs. In egg shells of tylenchoid nematodes, chitin is located between the outer vitelline layer and the inner lipid layer and may occur in association with proteins (Bird and Bird, 1991). The breakdown of this polymer by chitinases can cause premature hatching which results in fewer viable juveniles (Mercer *et al.*, 1992). In the soil, chitinases are produced by some actinomycetes (Mitchell and Alexander, 1962), fungi (Mian *et al.*, 1982), and bacteria (Ordentlich *et al.*, 1988, Inbar and Chet, 1991), but chitinases are also released by many plants as part of their defense mechanism against various pathogens (Punja and Zhang, 1993) and plant-parasitic nematodes (Roberts *et al.*, 1992). Chitinases depolymerize the chitin polymer into N-acetylglucosamine and chitobiose. Further microbial activity results in the deamination of the sugar and accumulation of ammonium ions and nitrates (Rodriguez-Kábana *et al.*, 1983). Nematicidal concentrations of ammonia in association with a newly formed

40

45

00511359.022300

31 MAY 1999
ESTA FOTOCOPIA COINCIDE EXACTAMENTE
CON EL ORIGINAL QUE TUVE A LA VISTA

98
89

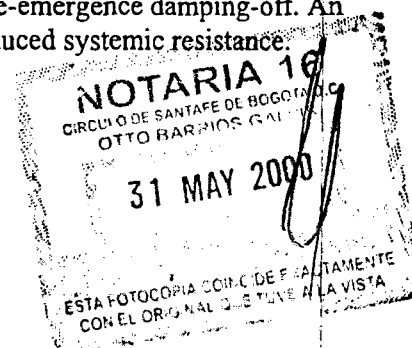
chitinolytic microflora are believed to cause nematode suppressiveness (Mian *et al.*, 1982, Godoy *et al.*, 1983). Benhamou *et al.* (1994) have shown that chitosan, the deacetylated derivative of chitin, induces systemic plant resistance against *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* in tomato when applied as a seed treatment or soil amendment. This suggests that plant defense mechanisms might contribute to the overall nematode suppression.

Changes in one component of the microflora in a community often leads to other changes, and it was recently reported that soil amendment with 1% chitin led to alterations in the taxonomic structure of the bacterial communities of the soil, rhizosphere and endorhiza (Hallmann *et al.*, 1998). Several bacterial species were found in chitin-amended soils and cotton rhizospheres which were not detected in non-amended soils and rhizospheres. Additionally, it was determined that chitin-amended soils selectively influenced the community structure of endophytic bacteria within cotton roots. For example, *Phyllobacterium rubiacearum* was not a common endophyte-following chitin amendment, although its populations in soil were stimulated by chitin. *Burkholderia cepacia* was the dominant endophyte-following chitin amendment but was rarely found among the endophytic community of non-amended plants. Hence, alterations in microbial community structure are associated with the control of nematodes which occurs upon soil amendment with chitin.

Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR)

Plant-associated microorganisms have been extensively examined for their roles in natural and induced suppressiveness of soilborne diseases. Among the many groups of such organisms are root-associated bacteria, which generally represent a subset of soil bacteria. Rhizobacteria are a subset of total rhizosphere bacteria which have the capacity, upon re-introduction to seeds or vegetative plant parts (such as potato seed pieces), to colonize the developing root system in the presence of competing soil microflora. Root colonization is typically examined by quantifying bacterial populations on root surfaces; however, some rhizobacteria can also enter roots and establish at least a limited endophytic phase. Hence, root colonization may be viewed as a continuum from the rhizosphere to the rhizoplane to internal tissues of roots.

Rhizobacteria which exert a beneficial effect on the plant being colonized are termed PGPR. PGPR may benefit the host by causing plant growth promotion or biological disease control. The same strain of PGPR may cause both growth promotion and biological control. Efforts to select and apply PGPR for control of specific soilborne fungal pathogens have been reviewed (Kloepper, 1993; Glick and Bashan, 1997). Among the soilborne pathogens shown to be negatively affected by PGPR are *Aphanomyces* spp., *Fusarium oxysporum*, *Gaeumannomyces graminis*, *Phytophthora* spp., *Pythium* spp., *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii*, *Thielaviopsis basicola*, and *Verticillium* spp. In most of these cases, biological control results from bacterial production of metabolites which directly inhibit the pathogen, such as antibiotics, hydrogen cyanide, iron-chelating siderophores, and cell wall-degrading enzymes. Plant growth promotion by PGPR may also be an indirect mechanism of biological control, leading to a reduction in the probability of a plant contracting a disease when the growth promotion results in shortening the time that a plant is in a susceptible state, e.g. in the case where PGPR cause enhanced seedling emergence rate, thereby reducing the susceptible time for pre-emergence damping-off. An alternative mechanism for biological control by PGPR is induced systemic resistance.



0511359.022300

9/90

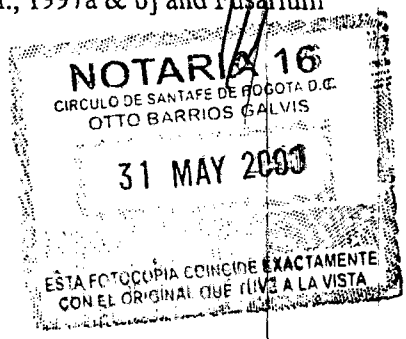
Nematode Biocontrol Agents

Many recently published examples of biocontrol of nematodes by antagonists involve use of the non-culturable pathogen *Pasteuria penetrans* (reviewed in Stirling, 1991b). Populations of the pathogen often increase upon continual cropping of crops susceptible to nematodes and may contribute to soil suppressiveness to nematodes in these cases. *P. penetrans* produces resting spores which adhere to the cuticle of nematodes, where they produce a germ tube, penetrate the host, and develop an extensive colonization and digestion of the host nematode. Unfortunately, procedures to produce sufficient spores for inoculative biocontrol studies are laborious, and no practical mass cultivation systems are available (Ciancio, 1995). Nematode-trapping fungi have provided control under greenhouse conditions, however practical control in the field has not been consistently achieved. This result most likely occurs since nematode-trapping capacity of most species is not related to nematode density as would be required for economic control (Stirling, 1991a). Several reports of culturable rhizobacteria as biocontrol agents of nematodes have been published (Becker et al., 1988; Hallmann, et al., 1997; Kloepper et al., 1992; Kluepfel, et al., 1993; Martinez-Ochoa et al., 1997; Oka et al., 1993; Sikora, 1988). While some reductions in nematode damage or populations have been reported upon introduction of bacteria in these model systems, none of the studies present data showing field efficacy at levels which would provide economically practical protection.

Induced Systemic Resistance (ISR)with PGPR

Induced resistance, whereby a plant's natural defenses are triggered by a physical, chemical, or biological agent, has been extensively studied and reviewed (Kuc, 1982; Ross, 1961; Ryals et al., 1996; Sticher et al. 1997; van Loon, 1997). Biological agents which induce resistance are of two general types: those that induce a necrotic lesion on the plant, indicating an incompatible pathogen-host interaction, and those that colonize the plant, usually roots, without visible necrosis. Certain rhizosphere bacteria have been shown to colonize roots of plants resulting in increased plant growth or biological control of plant diseases (reviewed in van Loon et al, 1998). Some PGPR strains, like necrosis-inducing biological agents and chemical inducers, trigger the plant's natural defenses in response to pathogen attack. Unlike necrosis-inducing biological agents and chemical inducers which provide a short-term period of induction, PGPR colonize plant roots, thereby potentially providing an extensive period of induction. Most of these published systems use fluorescent pseudomonads, and the mechanism appears to be distinct from ISR induced by pathogens or chemicals in that pathogenesis-related (PR) proteins typically do not accumulate, and the systemic protection is most typically not dependent upon activation of salicylic acid (Press et al., 1998; reviewed in van Loon et al. 1998).

Research in support of the present invention has studied the phenomenon of PGPR-mediated ISR, and the results indicate the following points. Selected PGPR strains belonging to diverse Gram-positive and Gram-negative genera (including *Pseudomonas*, *Serratia*, and *Bacillus*) can, upon seed treatment or soil drench treatment to plant root systems, reduce the incidence of distally infecting pathogens. Single PGPR strains have been shown to reduce pathogen infection and symptoms of multiple diseases on cucumber and tomato. Cucumber diseases affected under both greenhouse and field studies in multiple years include foliar diseases (angular leaf spot, caused by *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* [Liu et al., 1991a & b] and anthracnose [Wei et al., 1996], caused by *Colletotrichum orbiculare*), systemic wilt diseases (cucurbit wilt, caused by *Erwinia tracheiphila* [Zehnder et al., 1997a & b] and *Fusarium*



wilt, caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* [Liu et al. 1991c]), and the systemic viral disease caused by cucumber mosaic virus (CMV) (Raupach et al., 1996; Yao et al., 1997). In the case of cucurbit wilt, disease control is linked to PGPR-mediated reductions in plant preference by the insect vectors, such as the striped and spotted cucumber beetles. In field and greenhouse studies, PGPR treatments led to significant reduction in beetle feeding (Zehnder et al., 1997a) which was associated with PGPR-mediated reductions in cucurbitacin C, a feeding attractant. With tomato, protection has been noted in the greenhouse or field against CMV, bacterial spot, caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*; tomato mottle geminivirus, and bacterial speck, caused by *P. syringae* pv. *tomato*.

Botanical Aromatic Compounds

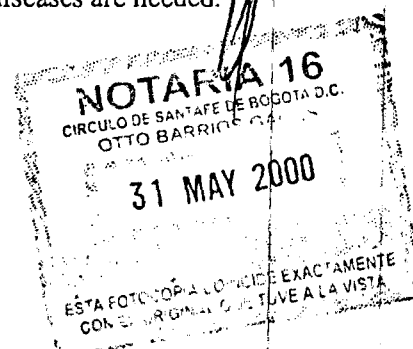
Another approach for control of nematodes which may lead to at least a limited induction of suppressiveness through microbial activity is the use of selected "botanical aromatic compounds". "Botanical aromatics" are low-molecular weight, volatile plant metabolites, many of which are found in essential oils of plants. When incorporated into soil, the volatile nature of botanical aromatics causes the compounds to act as fumigants. Furfural (2-furfuraldehyde) mixed into soil in greenhouse trials suppressed initial populations of the root-knot nematode *Meloidogyne arenaria* and the number of subsequent galls on squash. Similar protections were observed against *M. incognita* (root-knot nematode) and *Heterodera glycines* (cyst nematode) on soybean (Rodríguez-Kábana et al., 1993). Furfural also reduced root-knot damage of okra and increased yields in a microplot trial (Rodríguez-Kábana et al., 1993). Canullo et al. (1992) demonstrated that soil treatments with furfural reduced damage to the pathogenic fungus *Sclerotium rolfsii* on lentil, although populations of *Trichoderma* spp. and bacterial antagonists to *S. rolfsii* increased.

In a separate study with cotton, the use of the botanical aromatics furfural, benzaldehyde, and citral reduced populations of *M. incognita* juveniles in soil and on roots (Bauske et al., 1994). These same three botanical aromatics (furfural, citral, and benzaldehyde) have shown potential for control of both fungal pathogens and phytoparasitic nematodes (reviewed in Bauske et al., 1997). Applications of furfural and benzaldehyde to soil cause both quantitative and qualitative shifts in the composition of the soil bacterial community (reviewed Bauske et al., 1997). After decreasing in the first 24 hr after application, bacterial populations increased by 1 week after application and remained higher than in non-treated control soils for 7 weeks. There was a corresponding increase in frequency of *Burkholderia cepacia* in treated soils.

Soler-Serratosa et al. (1996) reported that pre-plant applications of thymol to soil reduced initial and final populations of *M. incognita* and *H. glycines* on soybean. When thymol was combined with benzaldehyde, a synergistic effect on nematode populations occurred. The effects of thymol on nematodes was related to changes in the indigenous soil microflora following treatment, and specifically to an increase in *Pseudomonas* spp. (Soler-Serratosa et al., 1994).

Contribution of the Invention

Notwithstanding this extensive work, an adequate strategy has been developed that provides satisfactory compositions suitable to treat plants from a very early stage (e.g., seeds or seedlings) to yield fast-growing plants which have a systemic resistance against foliar pathogens and alter the soil microflora to effectively control nematodes. Further alternatives to chemical pesticides and methyl bromide soil fumigation for control of plant diseases are needed.



Reducing the pressure and dependence of control of plant diseases on chemical pesticide solutions is highly desired.

Therefore, there is an urgent need, both environmentally and economically, for such compositions and methods of treatment devoid of pesticides and pesticide-like elements. It is evident from the prior art that no previous disclosure nor publication has contemplated the invention in that it is possible to achieve synergistic plant growth promotion and induced systemic resistance with the present invention of PGPR and an organic amendment thereby producing plants having an increased growth rate and systemic disease immunity. This invention contributes to the solution of this need and to the problems confronting this field of art.

RELATED ART

A bibliography of related publications appears prior to the claims section of this document.

BRIEF SUMMARY OF INVENTION

The invention relates broadly to the field of plant growth and development, particularly to methods and compositions for enhancing plant growth and disease resistance. The invention relates to the initiation and promotion of plant growth using a combination of multiple tactics of biological control in soil or in a soil-less plant growth medium for controlling nematodes and foliar pathogens.

The invention also relates to a novel composition of a plant growth medium comprising chitin and nonchitinolytic plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) which creates a synergy in plant growth and disease resistance. Further the invention relates to a novel synergistic method of using either seed treatment or the application to a soil-less potting media composition of a chitinolytic element and bacteria elements for the preparation and development of plants and transplants.

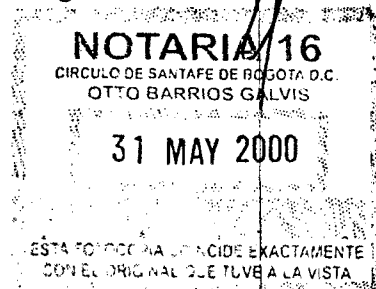
The invention relates to various plant products, such as tomato and cucumber plants obtained from the invention. The invention also relates to various other compositions and plants described further below.

The invention provides several useful embodiments.

The invention provides a composition which comprises at least two PGPR bacterial strains and a chitinolytic compound or a compound of equivalent effect. The plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) comprise at least one bacterial strain which can induce systemic plant resistance to plant diseases. The composition further comprises a chitinolytic compound which may have nematode-control activity. At least one of the PGPR bacterial strains in a preferred embodiment is non-chitinolytic. The chitinolytic compound is preferably either an aminated organic compound or an aminated polysaccharide.

Other compositions of the invention may include optional ingredients such as at least one botanical aromatic compound. Usually, a botanical aromatic compound for the present invention will have a low molecular weight and be of a volatile plant metabolite, such as citral, furfural or benzaldehyde. Numerous other compounds which do not detrimentally affect the function of the chitinolytic compound and of the PGPR may be included in the composition.

The invention provides further a method for exposing seeds and growing transplant plugs in soil or a soil-less medium, which includes the biological composition of the invention. Thereafter, the seeds and/or plugs are continued to be exposed and/or grown, respectively, in either the field or in an environment having conditions similar to that of greenhouses. These

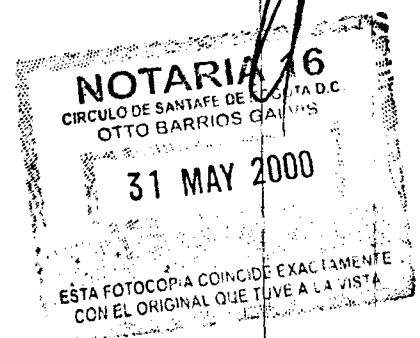


5 The resulting plants, from either seeds or plugs, have been observed to have developed a systemic disease resistance, increased growth vigor and other desirable properties.

Another embodiment of the invention relates to the improved plants obtained by the invention including plants that exhibit a systemic resistance to infectious diseases, whether the infection is of the root system, the foliage or other parts of the plants.

[illegible]

Other embodiments of the invention will become apparent hereinafter.



DETAILED DESCRIPTION OF INVENTION

5 The invention relates to various combinations of biocontrol tactics applied together into soil or plant growth media used for production of plants or transplant plugs. The "tactics" may include mixtures of two or more PGPR strains where one or more can induce plant resistance. These "tactics" may further include organic amendments, which may have nematode-control activity, and "selector compounds", such as botanical aromatic compounds (including thymol, benzaldehyde, citral, furfural, menthol and alpha-terpineol), which alter soil microflora to enhance activity of indigenous antagonistic microorganisms. The invention may also consist of 10 using two of these three tactics, i.e. PGPR mixtures together with organic amendments, but without addition of selector compounds. The invention provides other embodiments further discussed hereinafter.

15 In accordance with the invention, a novel synergy of biocontrol tactics of a heretofore unidentified composition has been discovered. The composition, in accordance with the invention, initiates and promotes plant growth and synergistically induces systemic disease resistance in plants. The characteristics of the composition are both novel and synergistic. The invention provides a composition comprised of chitinolytic and nonchitinolytic constituents for plant growth and disease resistance. The composition results in a synergy of constituent characteristics including initiation and promotion of plant growth and the inducing of systemic 20 plant disease resistance.

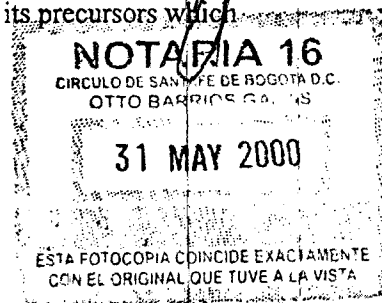
The Composition of the Invention

25 The composition is comprised of at least one PGPR strain and an organic amendment. The biological PGPR mixture preferably comprises spore preparations of the bacteria. Additionally, in the PGPR mixture, at least one PGPR strain can induce systemic plant resistance to disease. The presence of the bacteria in the mixture is generally on the order of 10^3 to 10^{10} bacteria per seed or per liter of soil-less mix. A preferred embodiment of the invention is where the bacteria presence is approximately 1×10^{10} bacteria per liter of soil-less mix and 1×10^8 30 bacteria per seed.

35 Examples of two formulated PGPR strains include but are not limited to *Bacillus subtilis* strain GB03 (available from Gustafson LLC., Plano, Texas as Kodiak™) and *Bacillus amyloliquefaciens* strain IN937a. Other types of nonchitinolytic bacteria suitable for the composition include: root-colonizing bacteria including the family BACILLIACEAE which is spore-forming and comprises the genera *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Brevibacillus*, *Virgibacillus*, *Alicyclobacillus* and *Aneurinibacillus*; fluorescent pseudomonads; isolates of *Pseudomonas* spp., *Serratia* spp., *Cornynebacterium* spp., *Enterobacterspp.*, *Arthrobacter* spp., and *Burkholderia* spp.; and beneficial fungi such as *Trichoderma* spp., *Gliocladium* spp., and others; yeasts, and actinomycetes. Additional examples of the group of bacilli and their spore-forming 40 genera, including *Bacillus*, are referenced in the "ATCC catalogue of Bacteria", published by the American Type Culture Collection, and are incorporated herein by reference.

45 The organic amendment is also known as a chitinolytic component as it exhibits nematode-control activity. The chitinolytic component in the composition is in an amount sufficient to cause a chitinolytic effect. The amount of the chitinolytic component present may range from 0.1% to 10.0%. A preferred embodiment of the invention is where the composition is comprised of approximately 2.5% of the chitinolytic component.

Examples of the chitinolytic component include but are not limited to chitin, flaked chitin, and chitosan. The chitinolytic component can also be derived from its precursors which



upon hydrolysis or other chemical or biochemical breakdown will yield the chitinolytic component. Preferably, the organic amendment is a glucose polysaccharide. Such precursors are organic natural compounds like pine bark, crab or shrimp shells, soybean meal, cotton seed meal and casein.

5 A further embodiment of the invention is a composition comprising at least one of the PGPR strains, an organic amendment, and an optional botanical aromatic compound. The optional addition of a botanical aromatic compound, also known as a selector compound, to the primary composition further introduces a fumigant for altering soil microflora. The presence of the fumigant reduces parasitic nematodes and increases antagonists. An example of the botanical
10 aromatic compound includes but is not limited to benzaldehyde. Other types of botanical aromatic compounds suitable for the composition include citral. Further optional components include components which do not negatively affect the function of the two principal components of the composition, referred to as non-essential ingredients.

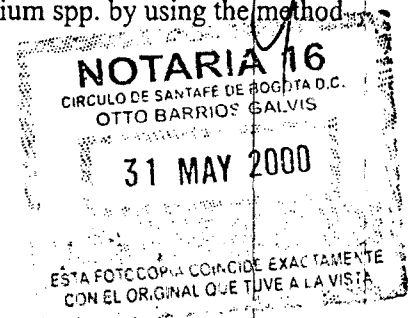
15 A further embodiment of the invention is a composition comprising the two PGPR strains, an organic amendment, and an optional botanical aromatic compound.

The Method of the Invention

20 An embodiment of the invention is a method for promoting plant growth and synergistically inducing disease resistance in plants. The method comprises exposing seed to the novel biological composition or growing seedlings in a soil-less potting media containing the novel biological composition, for a period of time sufficient to initiate improved growth and disease-suppressive characteristics. A seed is planted in the soil or in the soil-less media and grown in a greenhouse under conditions previously discussed. By way of example, the
25 biological composition may be incorporated into a soil-less media such as in a styrofoam transplant flat and then seeded. During this growth period, if desired, additional treatments of the composition are provided to the plant in predetermined amounts at predetermined times. Then, if desired, when the seedlings have advanced to an age of approximately four to six weeks, or where the plants are ready for transplant, the plant is transplanted to field conditions or
30 greenhouse conditions where the plant has been observed to continue to grow normally. Further, the plants are then optionally treated with the composition, in which the composition is in either a liquid or solid form. Preferably, this treatment is in the form of a foliar spray, drench application, drip application or through irrigation where it has been observed that the plants achieve a greater resistance to disease. This optional treatment may also be performed at any
35 time during the growth period. Further, untreated seeds are coated by exposing the seed with the composition, either in a liquid or solid form, preferably in a foliar spray, drench application, drip application or through irrigation. This treatment may be optional, and may additionally be performed at any time to untreated or treated seeds.

40 Particularly, this method stimulates and promotes plant growth in the early seedling stages which is known to be a difficult stage of plant growth to stimulate with PGPR alone. The method also induces disease resistance systemically in plants to a greater extent than previously achieved in the prior art. The invention also synergistically enables both the stimulation and promotion of plant growth in combination with systemically protecting a plant from disease by exposure to the biological composition.

45 Further embodiments of the invention provide methods for inhibiting the growth of disease agent *Phytophthora infestans* (a causal agent of late blight disease), *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* (a causal agent of bacteria spot disease), *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* (a causal agent of angular leaf spot disease), and *Fusarium* spp. by using the method



97
7/96

discussed above and challenging the plant with a treatment of the disease agent. The challenged seedling is then evaluated and the incidence and severity of disease are measured. It has been observed that plants grown under the present invention and challenged with the disease exhibited a significantly greater ability to resist the disease.

5

The Seed, Seedling and Plant of the Invention

10 An additional embodiment of the invention is a plant which having been exposed to the composition exhibits the synergistic effects of improved growth in combination with the systemic protection from disease. Seeds, seedling and plants which may be treated and obtained in accordance with the invention include both monocotyledonous and dicotyledonous plant species including barley, oats, rice, wheat, soybean, corn; melons including cucumber, muskmelon, canteloupe and watermelon; vegetables including beans, pea, peanut; oil crops including canola and soybean; solanaceous plants including tobacco; tuber crops including
15 potato; vegetables including tomato, pepper, cucumber, broccoli, cabbage, cauliflower, lettuce and radish; fruits including strawberry; fiber crops including cotton; other plants including coffee, bedding plants, perennials, woody ornamentals, turf and cut flowers including carnation and roses; sugar cane; containerized tree crops; evergreen trees including fir and pine; deciduous trees including maple and oak; and fruit trees including cherry, apple, pear and orange. In general
20 any seed, seedling or plant that is susceptible to plant disease and does respond to the composition of the invention may be treated in accordance with the invention.

The resulting plant of the present invention exhibits improved plant growth in the early seedling stages, which is known to be a difficult stage of plant growth to stimulate with PGPR alone. The plant further exhibits measurably improved plant physical characteristics such as
25 greater height, weight, vigor, leaflets and leaflet surface area, at growth stages earlier than non-treated, control plants. Similarly, the plant displays less disease than untreated, control plants.

Other Embodiments of the Invention

30 Further embodiments of the invention include various media for culturing the plants using the composition, in particular tomato, cucumber, and classes previously discussed, and parts thereof which have been developed in accordance with the invention.

Other embodiments of the invention will become apparent in the further detailed description of preferred and other embodiments of the invention.

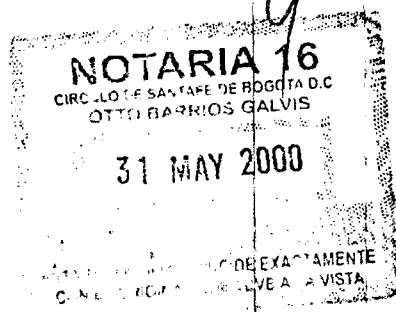
35 The term "transplant" as used herein is a term of art used to designate a plant of any age of any variety that is moved from one growing location to another.

The term "transplant plug" as used herein is a plant of any age situated in a contained growth medium in which the plant is prepared to be transplanted or transported from one location to another.

40 The term "soil-less medium" as used herein is a growth medium comprising peat-based products which may contain perlite, vermiculite, a fertilizer component and other ingredients. Examples of a soil-less medium include readily available products such as "Pro-mix", "Redi-Gro" and "Speedling Mix".

45 The term "seedling" as used herein is a term of art used to designate a plant of an age ranging from the day of emergence to one year after planting or an age where transplant of the plant occurs and is not limited to or by any plant class. The term also includes "forest seedlings" which can be one year old.

0051355022300



The term "synergy" as used herein is used to designate the resulting action of two or more substances to achieve an effect of which each is individually incapable of achieving.

EXAMPLE 1
SYNERGY OF TACTICS

A. Growth Promotion of Tomato

As the first example of the invention, a biological preparation was made containing two PGPR strains together with chitin. Specifically, the biological preparation (termed LS213), which is publicly available, contained *Bacillus subtilis* strain GB03, has been shown to control some diseases by production of iturin antibiotics, and *Bacillus amyloliquefaciens* strain IN937a which was selected for activation of induced resistance. With both of these bacteria, industrial formulations of spores were prepared and were mixed with flaked chitin. The biological preparation was added to soil-less potting media which was used to prepare tomato transplant plugs. Additional treatments consisted of each bacterial strain alone with and without chitin, chitin alone, and a nontreated control. Transplant plugs were grown in transplant trays in the greenhouse and effects on seedling growth were noted. Results are presented in Table 1.

Across all three measurements (vigor, shoot fresh weight, and leaflet surface area), significantly greater seedling growth occurred with LS213 than with the various individual components. This indicates a clear synergy in plant growth promotion by the combination of chitin and the two PGPR strains.

Table 1. Results of Example 1A—growth promotion of tomato—synergy of tactics.

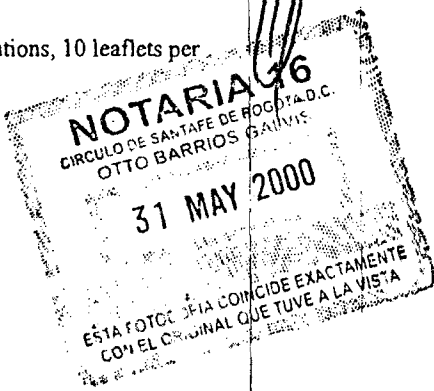
Treatment and components ¹	Vigor ²	Shoot Fresh Weight (g) ³	Leaflet surface area (cm ²) ⁴
Control; no components	1.4 a	0.4113 a	3.22 a
LS213; chitin + GB03 + IN937a	4.9 e	1.6555 f	18.37 e
Chitin alone	2.3 b	0.6088 bc	6.40 b
Chitin + GB03	2.9 c	0.7393 de	6.69 b
Chitin + IN937a	3.6 d	0.8255 e	8.29 c
GB03	2.4 bc	0.6393 bc	7.76 c
IN937a	2.1 b	0.6821 cd	7.74 c
GB03 + IN937a	2.1 b	0.5931 b	6.57 b
LSD (P = 0.05)	0.53	0.088	0.84

¹Biological treatments were incorporated into soil-less mix at 1:40 (v/v), placed into Styrofoam transplant flats, and then seeded with tomato cv. Solar Set. There were four replicated flats per treatment. GB03 and IN937a are PGPR strains.

²Seedling vigor was rated at 3 weeks after seeding on a scale of 1-5; 1 = poor, 2 = average, 3 = good, 4 = very good and 5 = excellent. Mean of four replications.

³Seedling shoot fresh weight. Mean of 4 replications, 10 seedlings per replication.

⁴Largest leaflet surface area (usually from the 4th or 5th true leaf). Mean of 4 replications, 10 leaflets per



99
98

replication.
Means followed by different letters are significantly different according to the protected least significance difference (LSD) test at $P = 0.05$.

5

B. Induced Resistance on Tomato

10 Certain of the transplant plugs of the above experiment, those being treated with the control, the chitin alone and the LS213, were transplanted to larger pots immediately after making the measurements of growth shown in Table 1. Ten plants of each treatment type were then challenged with *Phytophthora infestans* (causal agent of late blight disease) or *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* (causal agent of bacterial spot disease). After a
15 predetermined time, the plants were measured for disease resistance. Results of disease development are shown in Table 2.

The highest degree of disease protection against both pathogens occurred with LS213. With bacterial spot, the protection afforded by LS213 was significantly greater than both the nontreated control and the chitin alone treatment. This indicates that the synergy in plant growth promotion noted in Table 1 translates into synergy in disease protection.

20

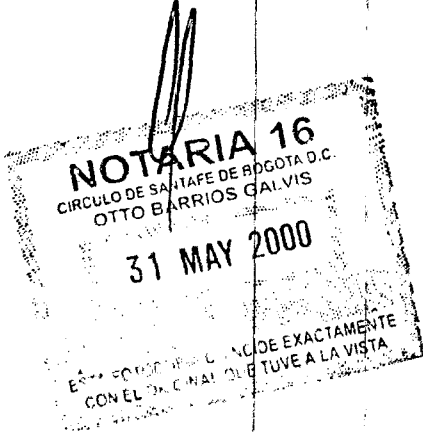
Table 2 Results of Example 1B—Induced resistance on tomato—synergy of tactics.

Treatments	% Late blight disease/plant ¹	Bacterial spot lesions/leaflet ²
25 Control	19.1 b	22.9 b
Chitin	16.5 a	22.35 b
LS213	7.7 a	11.87 a
LSD ($P = 0.05$)	9.98	2.42

¹ Mean of 10 replications, one plant per replication. ² Mean of 10 replications, 6 leaflets per plant.

30

00541359.022300



100
99

EXAMPLE TWO
SYNERGY OF TACTICS

A. Growth Promotion of Tomato and Cucumber

5

An experiment similar to that described in example 1 was conducted. The components of chitin, GB03 and IN937a were tested in soil-less plant growth medium for effects on seedling growth using tomato and cucumber. Additional measurements of plant growth were conducted as shown in Tables 3 and 4. Results are shown in Table 3 and Table 4.

10

The results with both tomato (Table 3) and cucumber (Table 4) demonstrate again that there is a clear synergy of tactics for growth promotion. For example, with tomato (Table 3), chitin alone had some growth promotion, causing significant increases, relative to the control, in height, number of leaflets, and leaflet surface area; but not causing significant increases in vigor, weight, or chlorophyll content. In contrast, LS213 treatment resulted in significant increases, relative to the control, for all of these parameters. Similarly on cucumber (Table 4), LS213 caused significant increases in all parameters, compared both to the nontreated control and chitin alone.

15

B. Induced Resistance

20

After making the growth measurements described above, plants from three treatments of tomato and cucumber were transplanted to pots. Treatments tested were the nontreated control, chitin alone, and LS213. Tomato plants were inoculated with the tomato spot pathogen (as described in example 1B), and cucumber plants were inoculated with *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*, causal agent of angular leaf spot disease. The results are shown in Table 5.

25

The results shown in Table 5 indicate that seedlings prepared from LS213 treatments had induced disease resistance. Interestingly, the seedlings prepared from treatment with chitin alone, which caused some significant plant growth increases, were not resistant. The lack of induced resistance with chitin when significant growth promotion occurred further demonstrates that the benefits of LS213 are synergistic.

30

09514355 022300

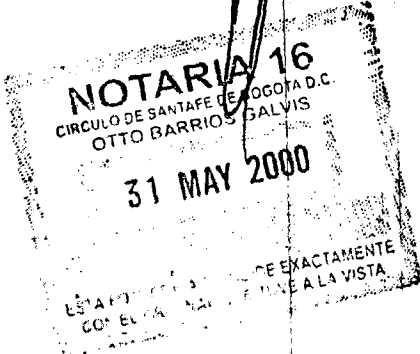


Table 3. Results of Example 2A—growth promotion of tomato—synergy of tactics.

Treatments and components ¹	Vigor ²	Height (cm) ³	Weight (g) ⁴	Number of leaflets ⁵	Leaflet surface area (cm ²) ⁶	Chlorophyll ⁷
Control; no components	1.5 a	7.0 a	0.19 a	4.2 a	1.64 a	28.09 a
LS213; chitin + GB03 + IN937a	4.5 c	13.31 d	0.91 d	9.6 d	5.77 e	32.36 c
Chitin	2.3 a	10.7 c	0.71 a	8.9 cd	3.89 c	28.89 ab
Chitin + GB03	2.8 b	10.83 c	0.72 c	8.9 cd	4.09 c	32.54 c
Chitin + IN937a	2.8 b	11.03 c	0.74 c	8.9 cd	4.75 d	31.39 bc
GB03	1.8 a	7.40 a	0.23 a	4.6 a	1.80 a	28.64 ab
IN937a	2.8 b	8.80 b	0.36 b	5.8 b	2.68 b	28.17 a
GB03 + IN937a	1.5 a	7.33 a	0.25 a	4.7 a	1.78 a	30.58 abc
LSD (0.05)	0.86	0.71	0.07	0.70	0.56	2.86

¹Biological treatments were incorporated into soil-less mix at 1:40 (v/v) and placed into Styrofoam transplant flats and then seeded with tomato cv. Solar Set. There were four replicated flats per treatment.

²Seedling vigor was rated at 3 weeks after seeding on a scale of 1-5; 1 = poor, 2 = average, 3 = good, 4 = very good and 5 = excellent. Mean of four replication.

³Seedling height from the soil level to the tip. Mean of 4 replications, 5 seedlings per replication.

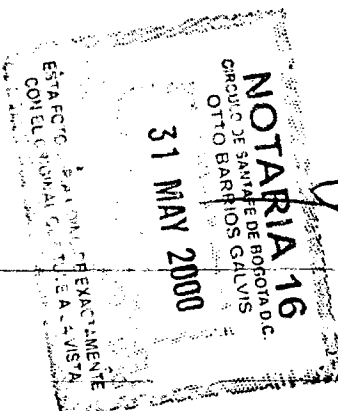
⁴Seedling shoot fresh weight. Mean of 4 replications, 5 seedlings per replication.

⁵Number of leaflets per plant. Mean of 4 replications, 5 plants per replication.

⁶Largest leaflet surface area (usually from the 4th or 5th true leaf). Mean of 4 replications, 5 plants per replication.

⁷Chlorophyll content from the largest leaflet either from 4th or 5th true leaf. Mean of 4 replications, 5 plants per replication.

Means followed by different letters are significantly different according to the protected least significance difference (LSD) test at $P = 0.05$.



107
106

Table 4. Results of Example 2A—growth promotion of cucumber—synergy of tactics.

Treatments and components ¹	Vigor ²	Height (cm) ³	Weight (g) ⁴	No. leaves ⁵	Leaf area (cm ²) ⁶	Chlorophyll ⁷
Control; no components	1.8 a	9.13 a	1.39 a	1.9 ab	13.99 a	22.99 a
LS213; chitin + GB03 + IN937a	4.8 d	16.28 e	2.97 e	2.8 d	27.68 d	29.72 c
Chitin alone	2.3 ab	14.65 d	2.23 d	2.1 c	24.62 c	25.22 bcd
Chitin + GB03	2.8 bc	12.33 c	1.93 bc	2.1 bc	20.89 b	26.49 cd
Chitin + IN937a	2.8 bc	13.05 c	2.12 cd	2.1 c	21.28 b	26.86 cd
GB03	1.5 a	8.80 a	1.40 a	1.9 ab	13.60 a	23.01 a
IN937a	3.5 c	12.88 c	1.97 bc	2.0 abc	18.47 b	24.07 ab
GB03 + IN937a	1.8 a	9.2 a	1.42 a	1.8 a	13.80 a	23.14 a
LSD (0.05)	0.86	1.23	0.25	0.21	2.81	1.67

¹Biological treatments were incorporated into soil-less mix at 1:40 (v/v) and placed into Styrofoam transplant flats and then seeded with tomato cv. Solar Set. There were four replicated flats per treatment.

²Seedling vigor was rated at 3 weeks after seeding on a scale of 1-5; 1 = poor, 2 = average, 3 = good, 4 = very good and 5 = excellent. Mean of four replication.

³Seedling height from the soil level to the tip. Mean of 4 replications, 5 seedlings per replication.

⁴Seedling shoot fresh weight. Mean of 4 replications, 5 seedlings per replication.

⁵Number of leaflets per plant. Mean of 4 replications, 5 plants per replication.

⁶Largest leaf surface area (usually from the 4th or 5th true leaf). Mean of 4 replications, 5 plants per replication.

⁷Chlorophyll content from the largest leaf either from 4th or 5th true leaf. Mean of 4 replications, 5 plants per replication.

Means followed by different letters are significantly different according to the protected least significance difference (LSD) test at $P = 0.05$.

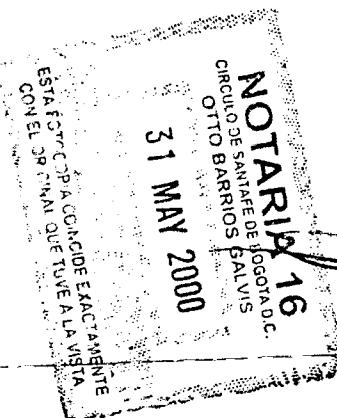


Table 5. Results of Example 2B—induced resistance on tomato and cucumber—synergy of tactics

Treatment ¹	Tomato/ <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i> ²	Cucumber/ <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>lachrymans</i> ³
Control	18.97 b	18.45 b
Chitin	17.63 b	17.90 b
LS213	7.87 a	10.80 a
LSD (P = 0.05)	3.04	3.23

¹Biocontrol products applied as soil amendments prior to seeding.

²Values for *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* represent the mean number of lesions per leaflet of each tomato seedling from four replications, 5 plants per replication per treatment.

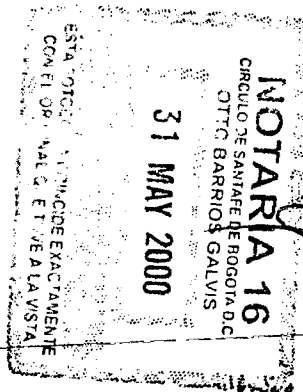
³Values for *P. syringae* pv. *lachrymans* represent the mean number of total leaf spot symptoms per leaf from four replications, 5 plants per replication per treatment.

EXAMPLE THREE SYNERGY OF TACTICS MULTIPLE CROPS, GROWTH PROMOTION

An experiment was conducted to determine if the synergistic effects on seedling plant growth noted in examples 1 and 2 occurred with additional crops. In this experiment, a nontreated control, chitin alone, and LS213 treatments were prepared as described in example 1 and used to grow seedlings of tomato (cv. Solar Set), cucumber (cv. SMR 48), bell pepper (cv. California Wonder), and tobacco (cv. TN90). Seedling growth was monitored by measuring the parameters listed in Table 6. With tomato and cucumber, the results previously seen repeated in which LS213 treatment generally resulted in significant growth promotion compared both to the nontreated control and the treatment with chitin alone (Table 6). This same synergistic effect on growth was seen with pepper and tobacco.

EXAMPLE FOUR DIFFERENT MIXTURES OF PGPR WITH CHITIN

An experiment was conducted to determine if one of the PGPR strains used in LS213 could be replaced with another strain.

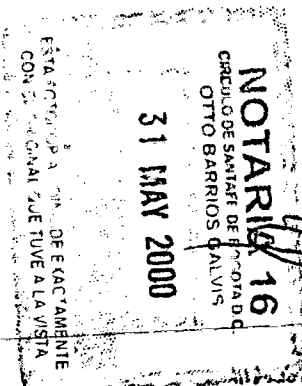


102

009220" 65ETT560

1025-00 (922.6739P)

More specifically, PGPR strain IN937a from LS213 was replaced with 8 different bacilli, each of which had induced resistance activity by itself. The bacteria were mixed with PGPR strain GB03 and chitin prior to incorporating into soil-less plant growth medium. Effects on seedling growth of cherry tomato (cv. RX 335) were tested along with effects on induced resistance against bacterial spot. Results shown in Table 7 show that LS213 caused significant promotion of plant growth and induction of resistance, compared to the control with this cultivar of tomato similar to what was seen previously on 'Solar Set' tomato. Other combinations of bacteria and chitin generally caused significant enhancements in growth compared to the control; however, not all of these caused significant protection against bacterial spot. Overall the results show that the beneficial effects of the invention are bacterial-strain dependent, but that different mixtures of bacteria may be used to achieve the same results.



104
103

00E220' 6SETT560

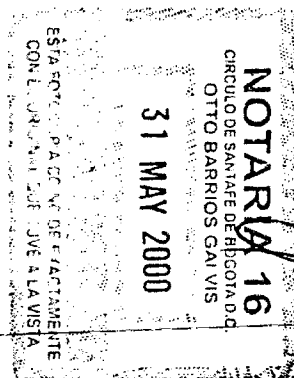
1025-00 (922.6739P)

104

Table 6. Results of Example 3-synergy of tactics on multiple crops

<u>Treatments</u> ¹	<u>Healthy stand</u> ²	<u>Vigor</u> ³	Tomato			
			<u>Height (cm)</u> ⁴	<u>Number of leaves</u> ⁵	<u>Shoot fresh weight (g)</u> ⁶	<u>Leaf surface area (cm²)</u> ⁷
Control	22.5 a	1.0 a	4.68 a	2.3 a	0.079 a	0.69 a
Chitin	22.0 a	2.3 b	6.98 b	7.1 b	0.266 b	1.65 b
LS213	23.0 a	3.3 c	9.03 c	8.5 c	0.539 c	3.03 c
LSD (<i>P</i> = 0.05)	2.73	0.51	0.719	0.77	0.103	0.45

<u>Treatments</u> ¹	<u>Healthy stand</u> ²	<u>Vigor</u> ³	Cucumber			
			<u>Height (cm)</u> ⁴	<u>Number of leaves</u> ⁵	<u>Shoot fresh weight (g)</u> ⁶	<u>Leaf surface area (cm²)</u> ⁷
Control	22.3 a	1.0 a	4.35 a	2.0 a	0.709 a	5.56a
Chitin	23.8 b	1.3 a	4.58 ab	2.1 a	0.927 a	7.49 b
LS213	23.3 a	2.5 b	6.40 c	2.2 a	1.351 b	14.20 c
LSD (<i>P</i> = 0.05)	1.22	0.49	0.704	0.29	0.304	2.89



105

Table 6. - continued

Pepper

<u>Treatments</u> ¹	<u>Healthy stand</u> ²	<u>Vigor</u> ³	<u>Height (cm)</u> ⁴	<u>Number of leaves</u> ⁵	<u>Shoot fresh weight (g)</u> ⁶	<u>Leaf surface area (cm²)</u> ⁷
Control	18.5 a	1.0 a	3.30 a	2.0 a	0.054 a	0.21 a
Chitin	20.0 a	1.8 b	3.78 b	4.2 b	0.163 b	1.43 b
LS213	20.0 a	3.3 c	4.83 c	4.4 b	0.299 c	2.64 c
LSD ($P = 0.05$)	3.48	0.69	0.39	0.41	0.052	0.364

Tobacco

<u>Treatments</u> ¹	<u>Healthy stand</u> ²	<u>Vigor</u> ³	<u>Height (cm)</u> ⁴	<u>Number of leaves</u> ⁵	<u>Shoot fresh weight (g)</u> ⁶	<u>Leaf surface area (cm²)</u> ⁷
Control	21.5 a	2.5 a	0.1 a	1.0 a	0.002 a	0.01 a
Chitin	17.0 a	2.0 a	0.98 b	3.1 b	0.079 b	1.37 b
LS213	21.5 a	4.0 b	1.8 c	4.0 c	0.169 c	3.22 c
LSD ($P = 0.05$)	4.96	0.8	0.32	0.45	0.047	0.736

Biological treatments were incorporated into soil-less mix at 1:40 (v/v). There were four replicated flats per treatment.

²Seedling stand was rated at 3 weeks after seeding. Values represent mean of 4 replications per treatment.

³Seedling vigor was rated at 3 weeks after seeding on a scale of 1-5; 1 = poor, 2 = average, 3 = good, 4 = very good and 5 = excellent. Mean of four replication.

⁴Seedling height from the soil level to the tip. Mean of 4 replications, 5 seedlings per replication.

⁵Seedling shoot fresh weight. Mean of 4 replications, 5 seedlings per replication.

⁶Number of leaves per plant. Mean of 4 replications, 5 plants per replication.

⁷Largest leaf surface area (usually from the 4th or 5th true leaf). Mean of 4 replications, 5 plants per replication.

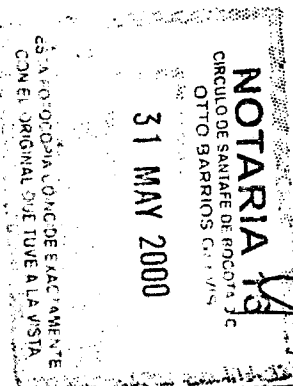


Table 7. Results of Example 4— Different mixtures of PGPR with Chitin

Treatments; components ¹	Vigor ²	Height (cm) ³	Number of leaflets ⁴	Stem diameter (mm) ⁵	Shoot fresh weight (g) ⁶	Leaflet surface area (cm ²) ⁷	Induced resistance; No. bacterial spot lesions per leaflet
LS254; chitin + GB03 +SE34	2.5 a	9.64 c	19.1 bc	1.99 cd	0.709 cd	2.46 b	12.2 cd
LS255; chitin + GB03 +IN937b	3.5 bc	9.58 c	20.1 c	2.02 cd	0.651 bc	2.33 b	10.6 c
LS256; chitin + GB03 +INR7	4.0 bcd	11.89 de	21.5 c	2.14 cd	0.946 e	3.49 c	9.5 bc
LS257; chitin + GB03 +T4	3.5 bc	13.23 f	21.4 c	2.38 d	0.984 e	3.42 c	4.6 ab
LS258; chitin + GB03 +IPC11	2.5 ab	10.01 c	22.2 c	2.19 cd	0.884 dc	3.03 c	17.8 d
LS259; chitin + GB03 +IPN19	2.0 a	7.65 bc	16.9 b	1.64 b	0.502 bc	2.10 b	9.4 bc
LS260; chitin + GB03 +3P114	2.5 ab	9.24 c	19.9 c	2.10 cd	0.721 cd	2.14 b	10.3 bc
LS261; chitin + GB03 +C1	4.5 cd	10.99 cd	20.9 c	2.28 d	0.869 de	3.52 c	3.3 a
LS213; chitin + GB03 +IN937a	5.0 d	12.43 ef	22.0 c	2.46 d	1.033 e	3.36 c	3.9 ab
Nontreated control	1.5 a	4.13 a	5.9 a	1.10 a	0.085 a	0.36 a	12.7 cd
LSD (P = 0.05)	1.32	1.31	2.8	0.28	0.186	0.568	5.69

¹Biological treatments were incorporated into soil-less mix) at 1:40 (v/v) and placed into Styrofoam transplant flats and then seeded with tomato cv. Cherry RX 335. There were two replicated flats per treatment.

²Seedling vigor was rated at 4 weeks after seeding on a scale of 1-5; 1 = poor, 2 = average, 3 = good, 4 = very good and 5 = excellent. Mean of 2 replications.

³Seedling height from the soil level to the tip. Mean of 2 replications, 10 seedlings per replication.

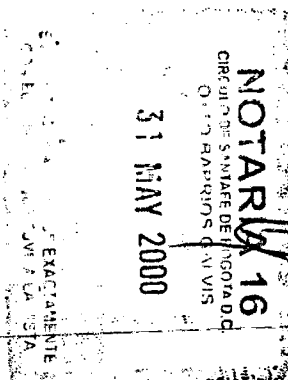
⁴Number of leaflets per plant. Mean of 2 replications, 10 leaflets per replication.

⁵Stem diameter is the mean of 2 replications, 10 seedlings per replication.

⁶Seedling shoot fresh weight. Mean of 2 replications, 10 seedlings per replication.

⁷Largest leaflet surface area (usually from the 4th or 5th true leaf). Mean of 2 replications, 10 leaflets per replication.

Means followed by different letters are significantly different according to the protected least significance difference (LSD) test at $P = 0.05$.



PGPR can result in disease protection activity in the field. The results also demonstrate that the beneficial effects of the biological preparations are not limited to a single cultivar of cucumber, since some reductions in incidence of both root-knot nematodes and anthracnose occurred on each cultivar tested.

A comparison of results in Table 10 from the field with and without foliar spray demonstrates that this "booster" treatment of the same PGPR contained in the biological preparation used in the soil-less seedling mix provides additional efficacy for disease protection. This can be seen by comparisons of the frequency of significant

Table 8 – Results of Example 5, field trial on tomato

Treatment	BIOLOGICAL CONTROL ACTIVITY AGAINST ^a						Bacterial spot	
	Root-knot nematode ^b		Fusarium crown rot ^b					
	no. plants with severe symptoms ^c	root- knot index ^d	with MeBr ^e	without MeBr		no. of fruit with symptoms ^g	mean no. of spots/leaf ^h	
			FORL index ^f	no. of plants with symptoms	FORL index ^f			
Control	4.2	8.0	1.5	8.0	1.3	11.3	58.5	
LS213	2.6	7.2	0.9	0.6	0.6	4.0	25.1	
LS254	0.8	4.4	1.0	0.8	0.8	5.7	20.2	
LSD _{0.05}	1.6	1.4	0.4	0.7	0.7	2.6	9.4	
LSD _{0.10}	1.4	1.2	0.3	0.6	0.6			

^a Experiment was a randomized complete block with 5 replications of each treatment; 10 plants per replication.

^b Values shown are means of 9 root systems at harvest time.

^c Severe symptoms were determined by the presence of large, coalescent galls in most of the root system.

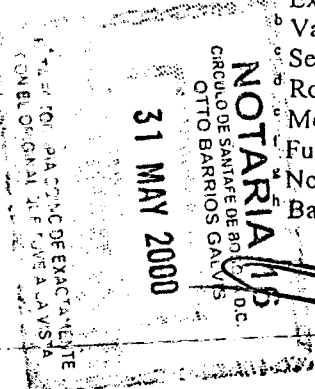
^d Root-knot index was based on a scale from 0 (no galls) to 10 (completely galled with poor root system).

^e MeBr = methyl bromide.

^f Fusarium crown and root rot index was determined using a scale of 0 (no symptoms) to 3 (severe and extended discoloration).

^g No. of green tomato fruit (out of 20 picked per plot) with 2 or more lesions.

^h Based on 10 leaves collected per plot.



00E220* 65ETT560

1025-00 (922.6739P)

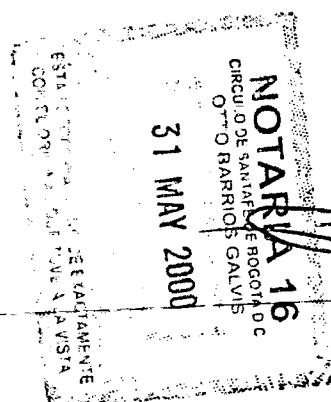
Table 9. Results of Example 6--Field trial on tomato; Effect of different bacterial mixtures with and without foliar spray.

Treatments; components used in seedling mix	Additional foliar spray of PGPR (+ or -)	Severity of root- knot nematode ¹	Severity of bacterial spot per leaf ²
LS254; chitin + GB03 + SE34	+	3.85*	3.54*
LS255; chitin + GB03 + IN937b	+	4.0*	5.06
LS257; chitin + GB03 + T4	+	3.92*	4.22*
Nontreated control	+	5.47	5.82
LS254; chitin + GB03 + SE34	-	2.77*	4.03
LS255; chitin + GB03 + IN937b	-	3.38*	3.61*
LS257; chitin + GB03 + T4	-	3.36*	3.43*
Nontreated control	-	4.60	4.54

¹ Mean of 3 replications, 3-5 plants per replication. Root-knot severity was measured on a 0-10 scale per entire root system; 0 = no galls; 10 = total galling.

² Mean of 3 replications, 10-15 leaves per replication. Bacterial spot was assessed on a 0 - 10 scale; 0 = no lesions; 10 = maximum lesions.

* Indicates significantly different from the appropriate control at $P = 0.05$.



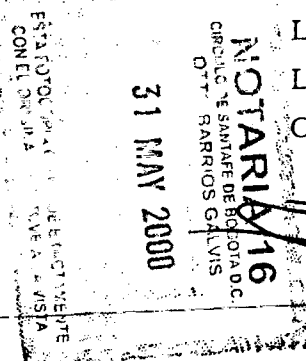
109

Table 10. Results of Example 7 --Field trial on cucumber; effect of different bacterial mixtures with and without foliar spray

Treatment; Components used in soil-less mix	Without foliar spray cv. Straight-8		cv. Fancypak	
	Root-knot ¹	% Anthracnose ²	Root-knot ¹	% Anthracnose ²
LS213; chitin + GB03 + IN937a	2.92*	17	1.85*	27
LS254; chitin + GB03 + SE34	2.77*	20	1.46*	27
LS255; chitin + GB03 + IN937b	2.21*	13	0.82*	20
LS258; chitin + GB03 + IPC11	3.79	20	0.92*	37
LS260; chitin + GB03 + 3PI14	2.46*	23	2.67*	13*
Control	5.0	30	4.3	43

Treatment; Components used in soil-less mix	With foliar spray cv. Straight-8		cv. Fancypak	
	Root-knot ¹	% Anthracnose ²	Root-knot ¹	% Anthracnose ²
LS213; chitin + GB03 + IN937a	4.79	17*	0.83*	17*
LS254; chitin + GB03 + SE34	5.43	3*	1.00*	27*
LS255; chitin + GB03 + IN937b	2.70*	13*	2.00	17*
LS258; chitin + GB03 + IPC11	3.80	20*	1.00*	37*
LS260; chitin + GB03 + 3PI14	3.08*	17*	0.83*	17*
Control	4.87	53	2.89	50

¹Mean of 3 replications, 3-5 plants per replication. ²Mean of 3 replications, 3-5 plants per replication. *Significantly different from control at P = 0.05.



07/6

disease reduction for one treatment with and without foliar spray. For example, with LS213, with foliar spray, 3 of the 4 disease incidence means were significantly reduced compared to the control, while without foliar spray, 2 of the 4 means were significantly reduced. With LS260, this "frequency of significance" increased from 2 of 4 without foliar spray to 4 of 4 with foliar spray.

It will be understood that many variations can be made in the procedures described for the composition, the methods and the plant products of the present invention while still remaining within the bounds and the spirit of the invention.

BIBLIOGRAPHY

All publications identified in this document are incorporated herein by reference in their entirety:

Bauske, E.M., Backman, P.A., Harper, K.M., Brannen, P.M., Rodríguez-Kábana, R., and Kloepper, J.W. 1997. Effect of botanical aromatic compounds and seed-surface pH on growth and colonization of cotton plant growth-promoting rhizobacteria. *Biocontrol Science and Technology* 7, 415-421.

Bauske, E.M., Rodríguez-Kábana, R., Esaun, V., Kloepper, J.W., Robertson, D.G., Weaver, C.F., and King, P.S. 1994. Management of *Meloidogyne incognita* on cotton by use of botanical aromatic compounds. *Nematropica* 24:143-150.

Becker, J.O., Zavaleta-Meija, E., Colbert, S.F., Schroth, M.N., Weinhold, A.R., Hancock, J.G., and Van Gundy, S.D. 1988. Effects of rhizobacteria on root-knot nematodes and gall formation. *Phytopathology* 78:1466-1459.

Benhamou, N., Lafontaine, P. J. and Nicole, M. (1994) Induction of systemic resistance to *Fusarium crown* and root rot in tomato plants by seed treatment with chitosan. *Phytopathology* 84, 1432-1444.

Bird, A. F. and Bird, J. (1991) *The Structure of Nematodes*. Academic Press, San Diego.

Canullo, G.,C., Rodríguez-Kábana, R., and Kloepper, J.W. 1992. Changes in soil microflora associated with control of *Sclerotium rolfsii* by furfuraldehyde. *Biocontrol Science and Technology* 2:159-169.

Ciancio, A. 1995. Density-dependent parasitism of *Xiphinema diversicaudatum* by *Pasteuria penetrans* in a naturally infested field. *Phytopathology* 85:144-149.

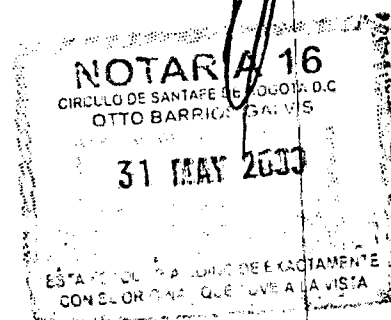
Culbreath A. K., Rodríguez-Kábana, R. and Morgan-Jones, G. (1985) The use of hemicellulosic waste matter for reduction of the phytotoxic effects of chitin and control of root-knot nematodes. *Nematropica* 15, 49-75.

Glick, B.R., and Bashan, Y. 1997. Genetic manipulation of plant growth-promoting bacteria to enhance biocontrol of phytopathogens. *Biotechnology Advances* 15, 353-378.

Godoy, G., Rodríguez-Kábana, R., Shelby, R. A. and Morgan-Jones, G. (1983) Chitin amendments for control of *Meloidogyne arenaria* in infested soil. II. Effects on microbial population. *Nematropica* 13, 63-74.

Hallmann, J., Rodríguez-Kábana, R., and Kloepper, J.W. 1998. Chitin-mediated changes in bacterial communities of the soil, rhizosphere and within roots of cotton in relation to nematode control. *Soil Biology and Biochemistry* In press.

Hallmann, J., Rodríguez-Kábana, R., and Kloepper, J.W. 1997. Nematode interactions with endophytic bacteria. pp. 243-245 in: *Plant Growth-Promoting Rhizobacteria—Present Status*



30
147
111

and Future Prospects. Eds. A. Ogoshi, K. Kobayashi, Y. Homma, F. Kodama, N. Kondo, and S. Akino. Nakanishi Publishing, Sapporo.

Inbar, J. and Chet, I. (1991) Evidence that chitinase produced by *Aeromonas caviae* is involved in the biological control of soil-borne plant pathogens by this bacterium. *Soil Biology and Biochemistry* 23, 973-978.

Kerry, B. R. (1982) The decline of *Heterodera avenae* populations. *European Plant Protection Organization Bulletin* 12, 491-496.

Kloepper, J.W. 1993. Plant growth-promoting rhizobacteria as biological control agents. In 'Soil Microbial Ecology - Applications in Agricultural and Environmental Management,' ed. F.B. Metting, Jr., pp. 255-274 (Marcel Dekker, Inc., New York).

Kloepper, J.W., Rodríguez-Kábana, R., McInroy, J.A., and Young, R.W. 1992. Rhizosphere bacteria antagonistic to soybean cyst (*Heterodera glycines*) and root-knot (*Meloidogyne incognita*) nematodes: Identification by fatty acid analysis and frequency of biological control activity. *Plant and Soil* 139:75-84.

Kluepfel, D. A., McInnis, T. M. and Zehr, E. I. (1993) Involvement of root-colonizing bacteria in peach orchard soils suppressive of the nematode *Criconebella xenoplax*. *Phytopathology* 83, 1240-1245.

Kokalis-Burelle, N., Rodríguez-Kábana, R., Weaver, C. F. and King, P. S. (1994) Evaluation of powdered pine bark for control of *Meloidogyne arenaria* and *Heterodera glycines* on soybean. *Plant and Soil* 162, 163-168.

Kokalis-Burelle, N., Rodríguez-Kábana, R., Robertson, D. G., Mahaffee, W. F., Kloepper, J. W. and Bowen, K. L. (1995) Effects of forage grass rotations on soil microbial ecology and nematode populations. *Phytopathology* 85, 1124.

Kuč, J. 1982. Induced immunity to plant disease. *Bioscience* 32:854-60.

Liu, L., Kloepper, J.W., and Tuzun, S. 1995a. Induction of systemic resistance in cucumber against bacterial angular leaf spot by plant growth-promoting rhizobacteria. *Phytopathology* 85:843-847.

Liu, L., Kloepper, J.W., and Tuzun, S. 1995b. Induction of systemic resistance in cucumber by plant growth-promoting rhizobacteria: duration of protection and effect of host resistance on protection and root colonization. *Phytopathology* 85:1064-1068.

Liu, L., Kloepper, J.W., and Tuzun, S. 1995c. Induction of systemic resistance in cucumber against Fusarium wilt by plant growth-promoting rhizobacteria. *Phytopathology* 85:695-698.

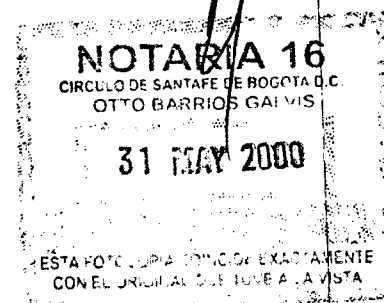
Mankau, R. and Das, S. (1969) The influence of chitin amendments on *Meloidogyne incognita*. *Journal of Nematology* 1, 15-16.

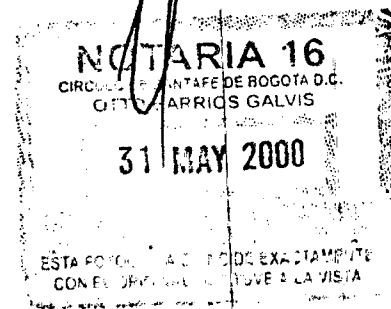
Martinez-Ochoa, N., Kloepper, J.W., Rodríguez-Kábana, R., and Ji, P. 1997. Induced resistance and phenotypic characteristics of several PGPR compared to biocontrol activity against the root knot nematode *Meloidogyne incognita*. pp. 296-300 in: *Plant Growth-Promoting Rhizobacteria-Present Status and Future Prospects*. Eds. A. Ogoshi, K. Kobayashi, Y. Homma, F. Kodama, N. Kondo, and S. Akino. Nakanishi Publishing, Sapporo.

Mercer, C. F., Greenwood, D. R. and Grant, J. L. (1992) Effect of plant and microbial chitinases on the eggs and juveniles of *Meloidogyne hapla* Chitwood. *Nematologica* 8, 227-236.

Mian, I. H., Godoy, G., Shelby, R. A., Rodríguez-Kábana, R. and Morgan-Jones, G. (1982) Chitin amendments for control of *Meloidogyne arenaria* in infested soil. *Nematropica* 12, 71-84.

Mitchell, R. and Alexander, M. (1962) Microbiological processes associated with the use



[illegible]

Stirling, G.R. 1991a. Mass production and release of biological control agents. Chapter 6 in: *Biological Control of Plant Parasitic Nematodes—Progress, Problems and Prospects*. CAB International, Wallingford, Oxon, UK.

Stirling, G.R. 1991b. Naturally occurring biological control. Chapter 5 in: *Biological Control of Plant Parasitic Nematodes—Progress, Problems and Prospects*. CAB International, Wallingford, Oxon, UK.

Stirling, G. R., McKenry, M. V. and Mankau, R. (1979) Biological control of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) on peach. *Phytopathology* 69, 806-809.

Van Loon, L.C., 1997. Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins. *Eur. J. Plant Pathol.* 103:753-65.

Van Loon, L.C., Bakker, P.A.H.M., and Pieterse, C.M.J. 1998. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* 36:453-83.

Vargas, R., Rodríguez-Kábana, R. and Kloepper, J. W. (1994) Study of microbial ecology in a crop rotation program with soybean, velvetbean, and winter crops. *Phytopathology* 84, 1084.

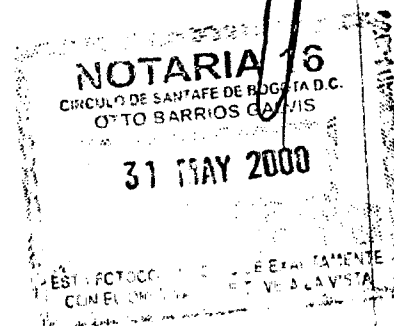
Wei, G., Kloepper, J.W., and Tuzun, S. 1996. Induced systemic resistance to cucumber diseases and increased plant growth by plant growth-promoting rhizobacteria under field conditions. *Phytopathology* 86:221-224.

Yao, C.-B., Zehner, G.W., Sikora, E., Murphy, J., and Kloepper, J.W. 1997. Evaluation of induced systemic resistance and plant growth promotion in tomato with selected PGPR strains. In 'Plant Growth-Promoting Rhizobacteria—Present Status and Future Prospects,' eds. A. Ogoshi, K. Kobayashi, Y. Homma, F. Kodama, N. Kondo, and S. Akino, pp. 285-288. (Nakanishi Printing, Sapporo).

Zehnder, G., Kloepper, J., Tuzun, S., Yao, C. Wei, G., Chambliss, O., and Shelby, R. 1997a. Insect feeding on cucumber mediated by rhizobacteria-induced plant resistance. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 83:81-85.

Zehnder, G., Kloepper, J., Yao, C., and Wei, G. 1997b. Induction of systemic resistance in cucumber against cucumber beetles (Coleoptera: Chrysomelidae) by plant growth-promoting rhizobacteria). *J. Econ. Entomol.* 90:391-396.

00511350.022300

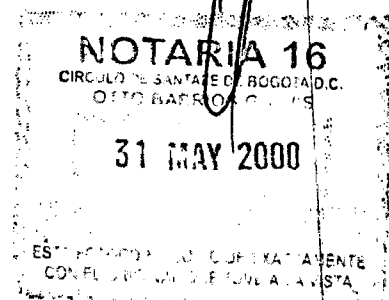


115
114

What is claimed is:

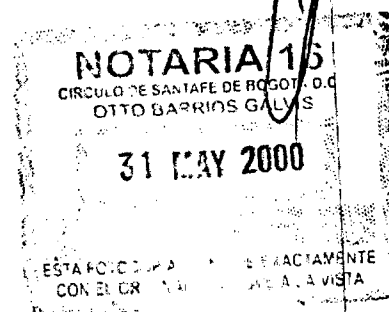
1. A composition for affecting at least one of the following plant growth or imparting disease resistance which comprises at least one plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and an organic amendment effective and in an amount sufficient to induce resistance to plant diseases.
2. A composition for affecting both plant growth and imparting disease resistance which comprises at least one plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and an organic amendment effective and in an amount sufficient to induce resistance to plant diseases.
3. A composition for affecting at least plant growth and imparting disease resistance which comprises at least one plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and an organic amendment effective and in an amount sufficient to induce systemic resistance to plant diseases.
4. The composition of claim 3, wherein the plant diseases, which are caused by plant pathogens, comprise at least one of the following: bacterial, fungal, viral, and nematode diseases.
5. The composition of claim 3, wherein the organic amendment is either a natural or a synthetic aminated organic compound.
6. The composition of claim 5, wherein the aminated organic compound is selected from the group consisting of pinebark, soybean meal, cotton seed meal, casein, crab shells, shrimp shells, chitin, and chitosan.
7. The composition of claim 3, wherein at least one of the PGPR is non-chitinolytic.
8. The composition of claim 7, wherein at least one of the PGPR is selected from the family BACILLIACEAE.
9. The composition of claim 8, wherein the BACILLIACEAE is selected from the genera *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Brevibacillus*, *Virgibacillus*, *Alicyclobacillus* and *Aneurinibacillus*.
10. The composition of claim 9, wherein the bacteria is selected from the following: *Bacillus subtilis*, *Bacillus subtilis* strain GB03, *Bacillus amyloliquefaciens*, and *Bacillus amyloliquefaciens* strain IN937a.
11. The composition of claim 8, wherein the composition comprises at least two different bacteria of the family BACILLIACEAE.
12. The composition of claim 11, wherein the bacteria are *Bacillus subtilis* strain GB03 and *Bacillus amyloliquefaciens* strain IN937a.

00511359.022300



46
115

13. The composition of claim 7, wherein at least one of the PGPR comprises one selected from the following: root-colonizing bacteria, fungi, yeasts and actinomycetes.
14. The composition of claim 13, wherein at least one of the PGPR is a root-colonizing bacteria selected from a fluorescent pseudomonad and isolates of *Pseudomonas* spp., *Serratia* spp. *Corynebacterium* spp., *Enterobacter* spp., *Arthrobacter* spp. and *Burkholderia* spp.
15. The composition of claim 13, wherein at least one of the PGPR is a fungus selected from *Trichoderma* spp. and *Glioladium* spp.
16. The composition of claim 3, wherein at least one of the PGPR is chitinolytic.
17. The composition of claim 3, wherein at least one of the PGPR is a spore-forming bacterium.
18. The composition of claim 3, wherein at least one of the PGPR is a non-spore forming bacterium.
19. The composition of claim 3 wherein the composition further comprises at least one non-essential ingredient, which does not detrimentally affect the function of the PGPR or the organic amendment.
20. The composition of claim 19, wherein the non-essential ingredient comprises at least one botanical aromatic compound.
21. The composition of claim 20, wherein the botanical aromatic compound is selected from the group of benzaldehyde, citral, thymol, furfural, menthol and alpha-terpineol.
22. The composition of claim 3 which is a liquid, powder or solid.
23. The composition of claim 3 which is in a soil-less medium.
24. A method for affecting at least plant growth or imparting disease resistance to plants or seeds comprising the steps of treating a seed or seedling of a target plant with a composition comprising at least one plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and an organic amendment effective and in an amount sufficient to induce resistance to plant diseases, and growing the treated seed or seedling.
25. A method for affecting at least plant growth and imparting disease resistance to plants or seeds comprising the steps of treating a seed or seedling of a target plant with a composition comprising at least one plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and an organic amendment effective and in an amount sufficient to induce resistance to plant diseases, and growing the treated seed or seedling.
26. A method for affecting at least plant growth and imparting disease resistance to plants or seeds comprising the steps of treating a seed or seedling of a target plant with a



117
116

composition comprising at least one plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and an organic amendment effective and in an amount sufficient to induce systemic resistance to plant diseases, and growing the treated seed or seedling.

27. The method of claim 26, wherein the method further comprises collecting a treated seed or seedling.

28. The method of claim 26, wherein the method further comprises transplanting a treated seed or seedling at least once.

29. The method of claim 26, wherein the method further comprises planting a treated seed or seedling into soil.

30. The method of claim 26 in which the composition is contained in a collectible container.

31. The method of claim 26 wherein the treatment is exposing the treated seed or seedling to the composition by foliar spray, drench, drip or irrigation treatment.

32. The method of claim 31, wherein the method comprises repeating the exposure.

33. The method of claim 26 wherein the treatment is exposing the untreated seed or seedling to the composition by a foliar spray, drench, drip or irrigation treatment.

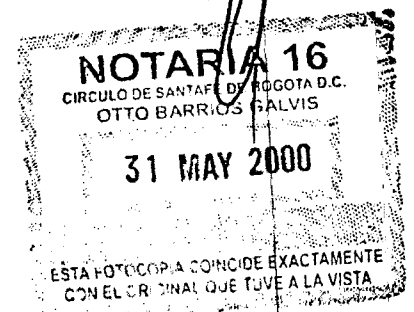
34. The method of claim 26, wherein the method further comprises coating an untreated seed with the composition comprising at least one plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and an organic amendment effective and in an amount sufficient to induce resistance to plant diseases, by exposing the untreated seed to the composition.

35. A seed, seedling, or plant treated with a composition, for affecting at least one of the following plant growth or imparting disease resistance to plants or seeds, comprising at least one plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and an organic amendment effective and in an amount sufficient to induce resistance to plant diseases.

36. A seed, seedling, or plant treated with a composition, for affecting both plant growth and imparting disease resistance to plants or seeds, comprising at least one plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and an organic amendment effective and in an amount sufficient to induce resistance to plant diseases.

37. A seed, seedling, or plant treated with a composition, for affecting at least plant growth and imparting disease resistance to plants or seeds, comprising at least one plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and an organic amendment effective and in an amount sufficient to induce systemic resistance to plant diseases

38. The seed, seedling or plant of claim 37, wherein the plant diseases, which are caused by plant pathogens, comprise at least one of the following: bacterial, fungal, viral, and



nematode diseases.

39. The treated seedling or plant of claim 37, treated with the composition by immersing, spraying, powdering, drenching, dripping or irrigating.

40. The seed, seedling, or plant of claim 37, wherein the seed, seedling, and plant are selected from the group consisting of a monocotyledonous and dicotyledonous plant species.

41. The seed, seedling, or plant of claim 37, wherein the organic amendment is a natural or a synthetic aminated organic compound.

42. The seed, seedling or plant of claim 41, wherein the aminated organic compound is selected from the group consisting of pinebark, soybean meal, cotton seed meal, casein, crab shells, shrimp shells, chitin, and chitosan.

43. The seed, seedling or plant of claim 41, wherein the composition comprises a synthetic aminated compound.

44. The seed, seedling or plant of claim 37, wherein the composition further comprises at least one non-essential ingredient, which does not detrimentally affect the function of the PGPR or the organic amendment.

45. The seed, seedling or plant of claim 44, wherein the non-essential ingredient comprises at least one botanical aromatic compound.

46. The seed, seedling or plant of claim 45, wherein the botanical aromatic compound is selected from the group of benzaldehyde, citral, thymol, furfural, menthol and alpha-terpineol.

47. The coated seed of claim 37.

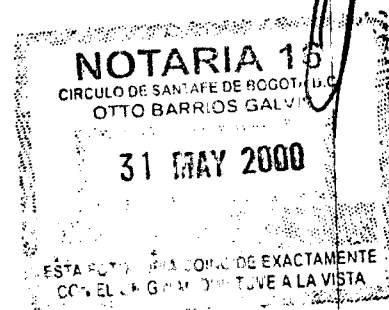
48. The coated seed of claim 47, wherein the plant diseases are caused by plant pathogens, comprise at least one of the following: bacterial, fungal, viral, and nematode diseases.

49. The coated seed of claim 47 wherein the seed is selected from the group consisting of monocotyledonous and dicotyledonous plant species.

50. The coated seed of claim 47, wherein the organic amendment is a natural or a synthetic aminated organic compound.

51. The coated seed of claim 47, wherein the composition further comprises at least one non-essential ingredient, which does not detrimentally affect the function of the PGPR or the organic amendment.

52. The coated seed of claim 51, wherein the non-essential ingredient comprises at least one botanical aromatic compound.



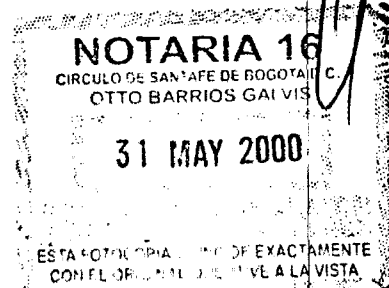
179
178

53. The coated seed of claim 52, wherein the botanical aromatic compound is selected from the group of: benzaldehyde, citral, thymol, furfural, menthol and alpha-terpineol.

54. The coated seed of claim 47, which is planted into soil.

55. The treated seed of claim 37, treated with the composition by immersing, spraying, powdering, drenching, dripping, or irrigating an untreated seed.

00511359.022300

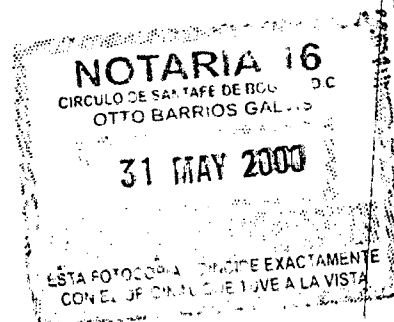


120
119

ABSTRACT

The invention accelerates the growth of all types of plants, i.e. tomato, cucumber, bell pepper, tobacco, horticultural crops, and others, and increases plant health. The invention is designed to increase the rate of seedling growth in the soil or in the greenhouse; and produce seeds having a coating imparting resistance to disease, thereby decreasing the time required to produce transplants in seedling greenhouses prior to transplanting into agricultural fields; and develop "disease-suppressive" transplant plugs, which are protected for a time from multiple diseases through combined mechanisms of stimulated plant defense and increased activity of indigenous antagonistic microorganisms on plant roots. Compositions and methods of use are provided.

05511350 022300



Please type a plus sign (+) inside this box → ☐

PTO/SB/01 (12-97)
Approved for use through 9/30/00. OMB 0651-0032
Patent and Trademark Office, U.S. DEPARTMENT OF COMMERCE

Under the Paperwork Reduction Act of 1995, no persons are required to respond to a collection of information unless it contains a valid OMB control number.

**DECLARATION FOR UTILITY OR
DESIGN
PATENT APPLICATION
(37 CFR 1.63)**

☒ Declaration Submitted with Initial Filing OR ☐ Declaration Submitted after Initial Filing (surcharge (37 CFR 1.16 (e)) required)

Attorney Docket Number 922.6739P
First Named Inventor Joseph W. Kloepper

COMPLETE IF KNOWN

Application Number

Filing Date

Group Art Unit

Examiner Name

As a below named inventor, I hereby declare

My residence, post office address, and citizenship are as stated below next to my name.

I believe I am the original, first and sole inventor (if only one name is listed below) or an original, first and joint inventor (if plural names are listed below) of the subject matter which is claimed and for which a patent is sought on the invention entitled:

BIOLOGICAL COMPOSITIONS AND METHODS FOR ENHANCING PLANT GROWTH AND HEALTH AND PRODUCING DISEASE-SUPPRESSIVE PLANTS

the specification of which (Title of the Invention)

☒ is attached hereto

OR

☐ was filed on (MM/DD/YYYY)

as United States Application Number or PCT International

Application Number and was amended on (MM/DD/YYYY) (if applicable).

I hereby state that I have reviewed and understand the contents of the above identified specification, including the claims, as amended by any amendment specifically referred to above.

I acknowledge the duty to disclose information which is material to patentability as defined in 37 CFR 1.56.

I hereby claim foreign priority benefits under 35 U.S.C. 119(a)-(d) or 365(b) of any foreign application(s) for patent or inventor's certificate, or 365(a) of any PCT international application which designated at least one country other than the United States of America, listed below and have also identified below, by checking the box, any foreign application for patent or inventor's certificate, or of any PCT international application having a filing date before that of the application on which priority is claimed.

Prior Foreign Application Number(s)	Country	Foreign Filing Date (MM/DD/YYYY)	Priority Not Claimed	Certified Copy Attached?	
				YES	NO
			☐ ☐ ☐ ☐	☐ ☐ ☐ ☐	☐ ☐ ☐ ☐

☐ Additional foreign application numbers are listed on a supplemental priority data sheet PTO/SB/02B attached hereto.

I hereby claim the benefit under 35 U.S.C. 119(e) of any United States provisional application(s) listed below

Application Number(s)	Filing Date (MM/DD/YYYY)	☐ Additional provisional application numbers are listed on a supplemental priority data sheet PTO/SB/02B attached hereto.
60/139,850 60/122,311	June 18, 1999 March 1, 1999	

[Page 1 of 2]

Burden Hour Statement: This form is estimated to take 0.4 hours to complete. Time will vary depending upon the needs of the individual case. Any comments on the amount of time you are required to complete this form should be sent to the Chief Information Officer, Patent and Trademark Office, Washington, DC 20231. DO NOT SEND FEES OR COMPLETED FORMS TO THIS ADDRESS. SEND TO: Assistant Commissioner for Patents, Washington, DC 20231.

NOTARIA 16
CIRCULO DE SANTA FE DE BOGOTA D.C.
OTTO BARRIOS GALVIS

31 MAY 2000

ESTA FOTOCOPIA COINCIDE EXACTAMENTE
CON EL ORIGINAL QUE TUVE A LA VISTA

Please type a plus sign (+) inside this box → ☐

PTO/SB/01 (12-97)
Approved for use through 9/30/00. OMB 0651-0032
Patent and Trademark Office; U.S. DEPARTMENT OF COMMERCE

Under the Paperwork Reduction Act of 1995, no persons are required to respond to a collection of information unless it contains a valid OMB control number.

DECLARATION—Utility or Design Patent Application

I hereby claim the benefit under 35 U.S.C. 120 of any United States application(s), or 365(c) of any PCT International application designating the United States of America, listed below and, insofar as the subject matter of each of the claims of this application is not disclosed in the prior United States or PCT International application in the manner provided by the first paragraph of 35 U.S.C. 112, I acknowledge the duty to disclose information which is material to patentability as defined in 37 CFR 1.56 which became available between the filing date of the prior application and the national or PCT International filing date of this application.

U.S. Parent Application or PCT Parent Number	Parent Filing Date (MM/DD/YYYY)	Parent Patent Number (if applicable)

☐ Additional U.S. or PCT International application numbers are listed on a supplemental priority data sheet PTO/SB/02B attached hereto.

As a named inventor, I hereby appoint the following registered practitioner(s) to prosecute this application and to transact all business in the Patent and Trademark Office connected therewith:

Name	Registration Number	Name	Registration Number

☐ Additional registered practitioner(s) named on supplemental Registered Practitioner Information sheet PTO/SB/02C attached hereto.

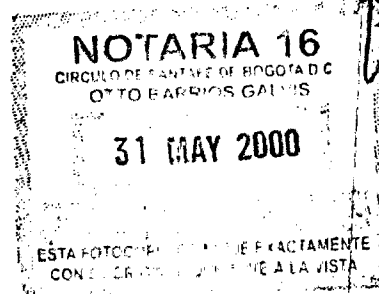
Direct all correspondence to: ☒ Customer Number or Bar Code Label 22469 OR ☐ Correspondence address below

Name			
Address			
Address			
City	State	ZIP	
Country	Telephone	Fax	

I hereby declare that all statements made herein of my own knowledge are true and that all statements made on information and belief are believed to be true; and further that these statements were made with the knowledge that willful false statements and the like so made are punishable by fine or imprisonment, or both, under 18 U.S.C. 1001 and that such willful false statements may jeopardize the validity of the application or any patent issued thereon.

Name of Sole or First Inventor:	☐ A petition has been filed for this unsigned inventor		
Given Name (first and middle (if any))	Family Name or Surname		
Joseph W.	Kloepper		
Inventor's Signature			Date
Residence: City	Auburn	State AL	Country US
Post Office Address	2608 Orchard Circle		
Post Office Address			
City	Auburn	State AL	ZIP 36832
		Country	US

☒ Additional inventors are being named on the 1 supplemental Additional Inventor(s) sheet(s) PTO/SB/02A attached hereto



123
122

Please type a plus sign (+) inside this box — ☐

PTO/SB/02A (12/97)
Approved for use through 9/30/98. OMB 0651-0032
Patent and Trademark Office: U.S. DEPARTMENT OF COMMERCE

Under the Paperwork Reduction Act of 1995, no persons are required to respond to a collection of information unless it

DECLARATION

ADDITIONAL INVENTOR(S)
Supplemental Sheet
Page 3 of 3

Name of Additional Joint Inventor, if any:				☐ A petition has been filed for this unsigned inventor				
Given Name (first and middle (if any))				Family Name or Surname				
Rodrigo				Rodriguez-Kabana				
Inventor's				Date				
Residence: City		Auburn	State	AL	Country	U.S.	Citizenship	
Post Office		P.O. Box 334						
Post Office								
City		Auburn	State	AL	ZIP	36832	Country	U.S.
Name of Additional Joint Inventor, if any:				☐ A petition has been filed for this unsigned inventor				
Given Name (first and middle (if any))				Family Name or Surname				
Donald S.				Kenney				
Inventor's				Date				
Residence: City		Denton	State	TX	Country	US	Citizenship	US
Post Office		3801 Lariat Road						
Post Office								
City		Denton	State	TX	ZIP	76207	Country	US
Name of Additional Joint Inventor, if any:				☐ A petition has been filed for this unsigned inventor				
Given Name (first and middle (if any))				Family Name or Surname				
Inventor's Signature				Date				
Residence: City			State		Country		Citizenship	
Post Office								
Post Office								
City			State		ZIP		Country	

Burden Hour Statement: This form is estimated to take 0.4 hours to complete. Time will vary depending upon the needs of the individual case. Any comments on the amount of time you are required to complete this form should be sent to the Chief Information Officer, Patent and Trademark Office, Washington, DC 20231. DO NOT SEND FEES OR COMPLETED FORMS TO THIS ADDRESS. SEND TO: Assistant Commissioner for Patents, Washington, DC 20231.

NOTARIA 16
CIRCULO DE SAJART DE NOTARIA
OTTO BARRIOS GALVIS
31 MAY 2000

ESTA FOTOCOPIA NO TIENE VALOR EXACTAMENTE
COMO EL ORIGINAL QUE SE VE A LA VISTA

124
123

Traducción Oficial de la Solicitud de Patente del Invento de Composiciones Biológicas y Métodos para Incrementar el Crecimiento y Salud de las Plantas y Producir Plantas Supresoras de Enfermedades. Registro No. 09/511.359, del 23 de febrero de 2000

LOS ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

A todos aquellos que reciban estos documentos:

DEPARTAMENTO DE COMERCIO DE LOS ESTADOS UNIDOS

Oficina de Marcas y Patentes de los Estados Unidos

Abril 21, 2000

LA PRESENTE CERTIFICA QUE EL DOCUMENTO ANEXO ES FIEL COPIA DE LOS REGISTROS DE LA OFICINA DE MARCAS Y PATENTES DE LOS ESTADOS UNIDOS DE LOS DOCUMENTOS DE LA SOLICITUD DE PATENTE IDENTIFICADA A CONTINUACION Y QUE CUMPLIO CON LOS REQUISITOS PARA CONCEDER UNA FECHA DE REGISTRO BAJO EL 111 DEL CODIGO 35 DE LOS EE.UU.

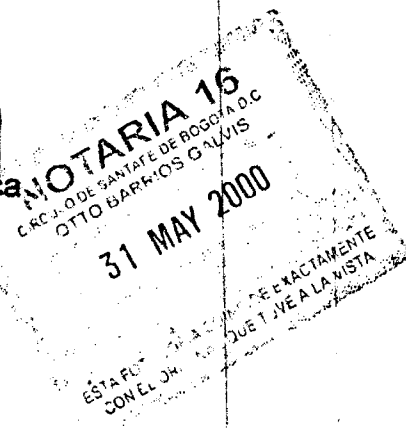
NUMERO DE SOLICITUD: 09/511.359

FECHA DE REGISTRO: Febrero 23, 2000

(Sello Seco) Oficina de Marcas y Patentes - Estados Unidos de America

Por autoridad del COMISIONADO DE MARCAS Y PATENTES

(firmado) T. WALLACE - Funcionario que Certifica



Cecilia Garcia de Gonzalez

CECILIA GARCIA DE GONZALEZ

TRADUCTORA OFICIAL

Resolución 1443 Minjusticia

125
124

TRANSMISION SOLICITUD DE PATENTE DE UTILIDAD (Pequeña Entidad)

Archivo No. 1025-00

Total páginas en esta Entrega: 40

AL COMISIONADO ASISTENTE DE PATENTES – Washington D.C. 20231

Transmitida para su presentación bajo el Código 35 de EE.UU. 111(a) y 37 C.F.R. 1.53(b) de una nueva solicitud de patente de utilidad del invento intitulado:

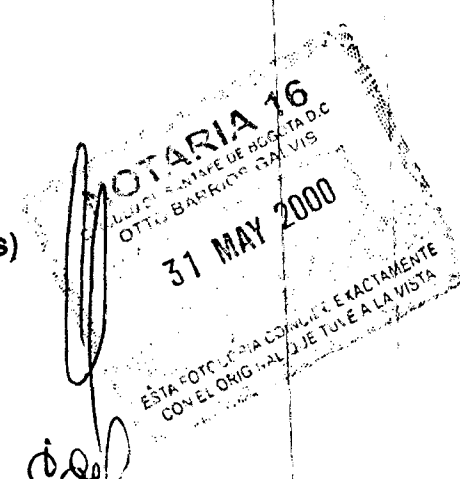
COMPOSICIONES BIOLOGICAS Y METODOS PARA INCREMENTAR EL CRECIMIENTO Y SALUD DE LAS PLANTAS Y PRODUCIR PLANTAS SUPRESORAS DE ENFERMEDADES

Inventado por: Joseph W. Kloepper, Rodrigo Rodriguez-Kabana, y Donald S. Kenney.

Anexo se encuentra:

Elementos de la Solicitud

2. Especificación de 34 Páginas incluyendo lo siguiente:
 - a. Título Descriptivo del Invento
 - b. Referencias a Solicitudes Relacionadas (si las hay)
 - e. Antecedentes del Invento
 - f. Breve Resumen del Invento
 - g. Breve Descripción de los Dibujos (si se presentan dibujos)
 - h. Descripción Detallada
 - i. Reivindicaciones según su Clasificación a continuación



126
125

j. Resumen de lo manifestado

4. Juramento o Declaración

- a. No ejecutada
- c. Con Poder Legal

13. Tarjeta de Reconocimiento

REIVINDICACIONES DE ACUERDO A SU PRESENTACION

Por	#Presentadas	#Permitidas	#Extra	Tasa	Derechos
Total Reivindicaciones	55	- 20 =	35	X \$9.00	\$315.00
Reivindicaciones Indep.	9	- 3 =	6	X \$39.00	\$234.00
Derecho Básico					\$380.00
TOTAL DERECHOS					\$929.00

EL comisionado está autorizado para cobrar y acreditar a la Cuenta de Depósito No. 13-3405 descrita a continuación.

Acreditar cualquier sobrepago.

(firmado) Gerard J. Weiser, 19.763

NOTARIA 16
CALLE E SAN FERNANDO DE BOGOTÁ D.C.
OT. - BARRIOS GALVIS
31 MAY 2000
ESTA FOTOCOPIA COINCIDE EXACTAMENTE
CON EL ORIGINAL QUE TUVE A LA VISTA
CECILIA GARCIA DE GONZALEZ
TRADUCTORA OFICIAL
Resolución 1443 Minjusticia

127
126

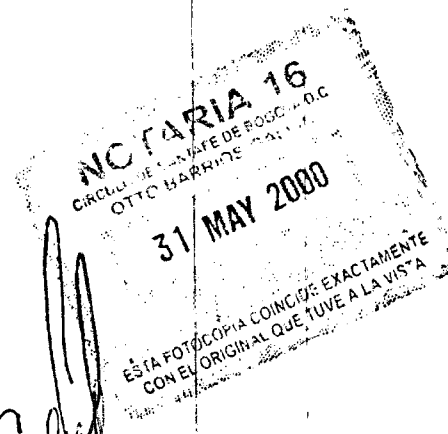
**SOLICITUD DE PATENTE
DE LAS CARTAS DE PATENTE DE LOS EE.UU.**

DE

**COMPOSICIONES BIOLOGICAS Y METODOS PARA INCREMENTAR EL
CRECIMIENTO Y SALUD DE LAS PLANTAS Y PRODUCIR PLANTAS
SUPRESORAS DE ENFERMEDADES**

Inventores: Joseph W. Kloepper
Rodrigo Rodríguez-Kabana
Donald S. Kenney

Preparado por: Schnader Harrison Segal & Lewis LLP
1600 Market Street, 36th Floor
Philadelphia, Pennsylvania 19103
(215) 751-2427



CECILIA GARCIA DE GONZALEZ
TRADUCTORA OFICIAL
Resolución 1443 Minjusticia

128
127

Composiciones Biológicas y Métodos para Incrementar el Crecimiento y Salud de las Plantas y Producir Plantas Supresoras de Enfermedades

REFERENCIA A SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud está basada en la solicitud provisional Serie No. 60/122,311, presentada el 1º de marzo de 1999, y la solicitud provisional Serie No. 60/139,850 presentada el 18 de junio de 1999, titulada: "Preparaciones Biológicas para Incrementar el Crecimiento y Salud de las Plantas", Archivo No. 922.63739PROV. Esta solicitud reivindica el beneficio de las fechas de presentación de las solicitudes provisionales arriba identificadas, las cuales se incorporan aquí en su totalidad como referencia.

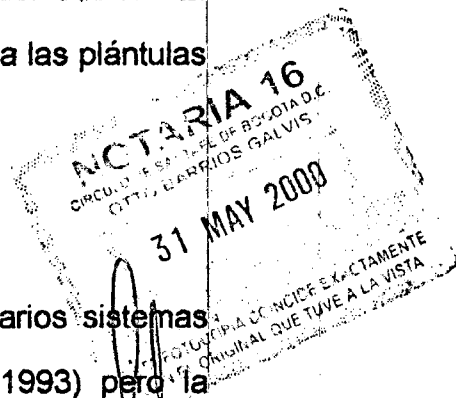
ANTECEDENTES DEL INVENTO

Campo del Invento

El invento se relaciona con el mejoramiento de las plantas. En particular, el invento se relaciona con composiciones biológicas mejoradas que son efectivas para aumentar el índice de crecimiento de plántulas, desarrollar una inmunidad a la enfermedad sistémica en plantas y controlar los nemátodos del suelo. El invento también se refiere a semillas tratadas con la composición y a las plántulas y plantas tratadas.

Modificaciones Orgánicas y Quitina

La represión natural de nemátodos ha sido reportada en varios sistemas agrícolas (Stirling y otros, 1979, Kerry, 1982, Kluepfel y otros, 1993) pero la



129
128

supresión también se puede inducir con la rotación de cultivos con plantas antagónicas como pastos de cambio (*Panicum virgatum*) Kokalis-Burelle y otros, 1995), y leguminosas (*Mucuna deeringiana*) (Vargas y otros, 1994) o modificaciones orgánicas incluyendo la corteza de pino (Kokalis-Burelle y otros, 1994), hemicelulosa (Culbreath y otros, 1985) y quitina (Mankau y Das, 1969, Spiegel y otros, 1986, Rodríguez-Kábana y Morgan-Jones, 1987). Un componente importante de la supresión de modificaciones de quitina se cree que sea biótico y varios informes confirman un mayor número de microorganismos antagónicos de nemátodos relacionados con suelos supresivos inducidos con quitina (Godoy y otros, 1983, Rodríguez-Kábana y otros, 1984). En los últimos años se han realizado extensos trabajos sobre los hongos relacionados con las modificaciones de quitina (Godoy y otros, 1983, Rodríguez-Kábana y otros, 1984), mientras hay menos información disponible sobre la estructura de la comunidad bacteriana y el papel de las bacterias en la supresión inducida con quitina.

La quitina, un polisacárido glucosamino, es el componente estructural de algunos hongos, insectos, varios crustáceos y huevos de nemátodo. En las cáscaras de huevos de los nemátodos tilencoidales la quitina está localizada entre la capa vitelina exterior y la capa interna de lípido y puede ocurrir en asociación con las proteínas (Bird y Bird, 1991). El análisis de este polímero por medio de quitinasas puede causar un rompimiento prematuro de la cáscara por lo cual resultan menos juveniles viables (Mercer y otros, 1992). En el suelo, las quitinasas son producidas por algunos actinomicetos (Mitchell y Alexander, 1962), hongos (Mian y otros, 1982) y bacterias (Ordentlich y otros, 1988, Inbar y Chet, 1991). Las quitinasas despolimerizan el polímero de la quitina en acetilglucosamina y quitobiosa. Una actividad microbiana posterior resulta en una

RECEIVED
SECRETARIA 16
ESTADO DE GUATEMALA
BOGOTA D.C.
31 MAY 2000
CONCIDE EXACTAMENTE
CON EL ORIGINAL QUE TUVE A LA VISTA

130
129

desaminación del azúcar y acumulación de iones de amonio y nitratos (Rodríguez-Kábana y otros, 1983). Las concentraciones de nemátodos de amonio en asociación con una microflora quitinolítica recién formada se cree causan la supresión de nemátodos (Mian y otros, 1982, Godoy y otros, 1983). Banhamou y otros (1994) han demostrado que el quitosan, derivado de acetilado de la quitina, induce la resistencia sistémica de la planta contra el *Fusarium oxysporum* f. sp. *Radicis-lycopersici* en el tomate cuando se aplica como tratamiento a la semilla o modificador del suelo. Esto sugiere que los mecanismos de defensa de la planta pueden contribuir a la supresión total del nemátodo.

Los cambios en un componente de la microflora en una comunidad conducen con frecuencia a otros cambios, y fue reportado recientemente que la modificación del suelo con quitina al 1% condujo a alteraciones en la estructura taxonómica de las comunidades bacterianas del suelo, rizósferas y *endorhiza* (Hallmann y otros, 1998). Varias especies bacterianas fueron encontradas en suelos modificados con quitina y en rizósferas del algodón que no fueron detectadas en suelos no modificados y en rizósferas. Adicionalmente, se determinó que los suelos modificados en forma selectiva con quitina influenciaron la estructura de la comunidad de bacterias endofíticas de las raíces del algodón. Por ejemplo, la *Phyllobacterium rubiacearum* no era una modificación endofítica común luego de la quitina, aunque sus poblaciones en el suelo fueron estimuladas con quitina. La *Burkholderia cepacia* fue la endofita dominante luego de la modificación con quitina pero rara vez se encontró entre la comunidad endofítica de las plantas no modificadas. Por tanto, las alteraciones en la estructura de la comunidad microbiana están asociadas con el control de los nemátodos que ocurre en un suelo modificado con quitina.

NOTARIA 16
MAY 2000

CECILIA GARCIA DE GONZALEZ
TRADUCTORA OFICIAL
Resolución 1443 Minjusticia

LA FOTOCOPIA COINCIDE EXACTAMENTE
CON EL ORIGINAL QUE TUVE A LA VISTA

131
130

Rizobacterias Promotoras del Crecimiento de la Planta (PGPR, sigla en inglés)

Los microorganismos asociados a la planta han sido ampliamente examinados para conocer sus papeles en la supresión natural e inducida de las enfermedades resultantes del suelo. Entre los muchos grupos de dichos organismos se encuentran bacterias asociadas a la raíz que generalmente representan un subgrupo de bacterias del suelo. Las rizobacterias son un subgrupo de bacterias rizósferas totales que tienen la capacidad, una vez reintroducidas en las semillas o partes vegetativas de la planta, (como en pedazos de la semilla de la papa) de colonizar el sistema de la raíz en desarrollo en presencia de microflora competidora en el suelo. La colonización de la raíz es típicamente examinada al cuantificar las poblaciones bacterianas sobre las superficies de la raíz; sin embargo, algunas rizobacterias también pueden penetrar las raíces y establecer como mínimo una fase endofítica limitada. Por ello, la colonización de la raíz puede ser vista como una continuidad de la rizósfera al rizoplasma y a los tejidos internos de las raíces.

Las rizobacterias que ejercen un efecto beneficioso sobre la planta en proceso de ser colonizada se denominan PGPR. Las PGPR pueden beneficiar al huésped promoviendo el crecimiento de la planta o el control de enfermedades biológicas. La misma cepa de PGPR puede promover tanto el crecimiento como el control biológico. Se han revisado los esfuerzos en la selección y aplicación de las PGPR para el control de hongos patógenos específicos del suelo (Kloepper, 1993; Glick y Bashan, 1997). Entre los patógenos del suelo afectados negativamente por las PGPR están *Aphanomyces* spp., *Fusarium oxysporum*, *Gaeumannomyces graminis*, *Phytophthora* spp., *Phytium* spp., *Rhizoctonia solani*,

RECEBIDA 16
CIRCULO DE CARTELES BOGOTÁ D.C.
OTTO HARRIS GALVIS
31 MAY 2000
ESTA COPIA NO DE EXACTAMENTE
QUE ORIGINAL QUE TUVE A LA VISTA

Scelerotium rolfii, *Thielaviopsis basicola*, y *Verticillium* spp. En la mayoría de los casos, los resultados del control biológico de la producción bacteriana de metabólicos que directamente inhiben el patógeno, tales como los antibióticos, hidrógeno de cianuro, sideróforos de quelato de hierro, y enzimas degradantes de las paredes de la célula. El crecimiento de la planta promovido por la PGPR puede también servir como mecanismo indirecto de control biológico, conduciendo a una reducción en la probabilidad de que la planta contraiga una enfermedad cuando al promover el crecimiento resulte una reducción del tiempo en que una planta esté en estado de susceptibilidad, a saber, en el caso en que las PGPR causen un incremento en el índice de excrecencia de la plántula, por lo tanto reduciendo el tiempo susceptible para una falta de humedecimiento previo a la excrecencia. Un mecanismo alternativo de control biológico por PGPR es la resistencia sistémica inducida.

Agentes de Biocontrol de Nemátodos

Muchos ejemplos recientemente publicados de biocontrol de nemátodos por antagonistas incluyen el uso de los patógenos no cultivables *Pasteuria penetrans* (revisado en Stirling, 1991b). Las poblaciones de patógenos aumentan con frecuencia ante una continuidad de cultivos susceptibles a los nemátodos y pueden contribuir en estos casos a la supresión de nemátodos en el suelo. *P. Penetrans* produce esporas en reposo que se adhieren a la cutícula de los nemátodos, donde producen un tubo de gérmenes, penetran el huésped y desarrollan una colonización y digestión extensas del nemátodo huésped. Desgraciadamente, los procedimientos para producir suficientes esporas para los estudios de biocontrol por inoculación son laboriosos, y no existen sistemas

NOTARIA 16
DIR. DE REG. DE BOGOTÁ D.C.
OTT. GARRIOS GALVIS

31 MAY 2000

ESTA FOTOCOPIA ES UNA COPIA EXACTAMENTE
CON EL ORIGINAL QUE TUVE A LA VISTA

CGL

CECILIA GARCIA DE GONZALEZ

TRADUCTORA OFICIAL

Resolución 1443 Minjusticia

prácticos de cultivo masivo (Ciancio, 1995). Los hongos que atrapan los nemátodos han permitido el control en condiciones de invernadero, sin embargo, no ha habido consistencia en lograr el control práctico en el campo. Este resultado posiblemente se presenta pues la capacidad de la mayor parte de especies para atrapar nemátodos no está relacionada con la densidad del nemátodo como se requeriría para un control económico (Stirling, 1991A). Se han publicado algunos informes de rizobacterias cultivables como agentes de control de los nemátodos (Becker y otros, 1988; Hallmann y otros, 1997; Kloepper y otros, 1992; Kluepfel y otros, 1993; Martínez-Ochoa y otros, 1997; Oka y otros, 1993; Sikora, 1998). Aunque se han reportado algunas reducciones en daños por nemátodos o en poblaciones ante la introducción de bacterias en estos sistemas del modelo, ninguno de los estudios presentan datos demostrando la eficacia en el campo a niveles que pudieran dar una protección económicamente práctica.

Resistencia Sistémica Inducida (ISR, sigla en inglés) con PGPR

La resistencia inducida, por lo cual las defensas naturales de la planta son disparadas por un agente físico, químico o biológico, ha sido revisada y estudiada ampliamente (Kuc, 1982; Ross, 1961; Ryals y otros, 1996; Sticher y otros 1997; van Loon, 1997). Los agentes biológicos que inducen la resistencia son de dos tipos generales; aquellos que inducen en la planta una lesión necrótica, indicando una interacción incompatible entre el patógeno y el huésped, y aquellos que colonizan la planta, generalmente las raíces, sin necrosis visibles. Se han visto algunas bacterias rizósferas colonizando las raíces de las plantas y resultando en un incremento en el crecimiento de la planta o un control biológico de las enfermedades de las plantas (revisado en van Loon y otros, 1998). Algunas cepas

NOTARIA 16
CIRCUITO DE SANTAFÉ DE BOGOTÁ D.C.
OTRO SAMPSON GALVIS
31 MAY 2000

CECILIA GARCIA DE GONZALEZ
TRADUCTORA OFICIAL
Resolución 1443 Minjusticia

de PGPR, como los agentes biológicos inductores de necrosis y los inductores químicos, disparan las defensas naturales de la planta como respuesta al ataque patógeno. No así los agentes biológicos inductores de necrosis y los inductores químicos que proveen un período de inducción a corto plazo, las PGPR colonizan las raíces de la planta, proveyendo así potencialmente un amplio periodo de inducción. La mayoría de los sistemas publicados utilizan seudomónadas fluorescentes, y el mecanismo parece ser distinto al de ISR inducido por patógenos o químicos en que las proteínas patógeno-relativas (PR) no son típicamente acumulables, y la protección sistémica típica no depende de la activación del ácido salicílico (Press y otros, 1998; revisado en van Loon y otros 1998).

La investigación de apoyo al presente invento ha estudiado el fenómeno de las PGPR de transmisión ISR, y los resultados muestran los siguientes aspectos. Las cepas seleccionadas de PGPR pertenecientes a géneros gramopositivos y gramonegativos (incluyendo *Pseudomonas*, *Serratia* y *Bacillus*), con el tratamiento a la semilla o el tratamiento empapando el suelo para llegar al sistema de las raíces de la planta, pueden reducir la incidencia de patógenos infecciosos a distancia. Se ha visto cómo las cepas sencillas de PGPR reducen la infección patógena y los síntomas de múltiples enfermedades en el cohombro y el tomate. Las enfermedades en el cohombro en estudios de campo y en invernadero incluían durante muchos años las enfermedades foliares (mancha angular en la hoja, causada por *Pseudomonas syringe* pv. *Lachrymans* [Liu y otros, 1991a & b] y antracnosis [Wei y otros, 1996], causada por *Colletotrichum orbiculare*, enfermedades sistémicas de marchitamiento (marchitamiento de la cucurbita, causado por *Erwinia tracheiphila* [Zender y otros, 1997 a & b] y el marchitamiento

NOTARIA 16
CIRCUITO DE SANTA FE DE BOGOTÁ D.C.
BARRIOS GALVIS
71 MAY 2000
ESTA COPIA HA CONCORDADO EXACTAMENTE
CON EL ORIGINAL QUE SE VE A LA VISTA

CECILIA GARCIA DE GONZALEZ
TRADUCTORA OFICIAL
Resolución 1443 Minjusticia

Fusarium, causado por *Fusarium oxysporum* f. sp. *Cucumerinum* [Liu y otros 1991c], y la enfermedad viral sistémica causada por el virus de mosaico del cohombro (CMV, sigla en inglés) (Raupack y otros, 1996; Yao y otros, 1997). En el caso del marchitamiento de la cucúrbita, el control de la enfermedad está ligado a la reducción de transmisión de PGPR en la preferencia de la planta por los insectos portadores, como los escarabajos rayados y manchados del cohombro. En estudios de campo e invernaderos, los tratamientos de PGPR condujeron a una importante reducción de la alimentación de los escarabajos (Zehnder y otros, 1997a), lo cual se asocia con la reducción transmisora de las PGPR en la cucúrbita C, un alimento de atracción. Con el tomate, la protección se ha notado en el invernadero o el campo contra el CMV, mancha bacteriana causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *Vesicatoria*; el geminivirus de la mancha del tomate, y el moteo bacteriano, causado por *P. Syringae* pv. *Tomato*

Compuestos de Aromáticas Botánicas

Otro enfoque para el control de los nemátodos que puede conducir al menos a una inducción limitada de la supresión a través de la actividad microbiana es el uso seleccionado de "compuestos de aromáticas botánicas". Las "Aromáticas Botánicas" son metabólicos volátiles de la planta, de bajo peso molecular, muchos de los cuales se encuentran en plantas de aceites esenciales. Al incorporarlas al suelo la naturaleza volátil de las aromáticas botánicas causa que los compuestos actúen como pesticida. Furfural (2-furfuraldehído) mezclado en el suelo en pruebas de invernadero sirvió de supresor en poblaciones iniciales del nemátodo de nudo en la raíz *Meloidogyne arenaria* y en la cantidad subsecuente de agallas en la calabaza. Se pudo observar una protección similar

NOTARIA 16
CIRCULO DE SANTAFE DE BOGOTÁ D.C.
OTTO BARRIOS GALVIS
31 MAY 2000

CECILIA GARCÍA DE GONZÁLEZ
TRADUCTORA OFICIAL
Resolución 1443 Minjusticia

136
135

contra *M. Incognita* (nemátodo de nudo en la raíz) y *Heterodera glycines* (nemátodo quiste) en la soja (Rodríguez-Kábana y otros, 1993). El furfural también redujo el daño de nudo en la raíz de la okra y aumentó el rendimiento en pruebas en un micro lote (Rodríguez-Kábana y otros, 1993). Canullo y otros (1992) demostraron que los tratamientos del suelo con furfural reducían el daño del hongo patógeno *Sclerotium rolfsii* de la lenteja, aunque aumentaron las poblaciones de *Trichoderma* spp. y los antagonistas bacterianos del *S. Rolfsii*.

En otro estudio con algodón, el uso de las aromáticas botánicas furfural, benzaldehído, y citral redujeron las poblaciones de *M. Incognita* juveniles en el suelo y en las raíces (Bauske y otros, 1994). Las mismas tres aromáticas botánicas (furfural, citral y benzaldehído) han demostrado tener un potencial de control tanto para hongos patógenos y nemátodos fitoparasitarios (revisado en Bauske y otros, 1997). Las aplicaciones de furfural y benzaldehído al suelo causan cambios cuantitativos como cualitativos en la composición de la comunidad bacteriana del suelo (revisado en Bauske y otros, 1997). Luego de reducirse en las primeras 24 horas después de su aplicación, las poblaciones bacterianas aumentaron en 1 semana después de la aplicación y permanecieron más altas que en suelos controlados sin tratamiento durante 7 semanas. Hubo el correspondiente aumento en la frecuencia de *Brukholderia cepacia* en los suelos tratados.

Soler-Serratosa y otros (1996) reportaron que las aplicaciones previas de timol al suelo antes de sembrar reducían las poblaciones iniciales y finales de *M. Incognita* y *H. Glycines* en la soja. Cuando el timol fue combinado con benzaldehído, ocurrió un efecto sinérgico sobre las poblaciones de nemátodos. Los efectos del timol en los nemátodos fueron relacionados con los cambios en la

NOTARIA 16
CIRCULO DE SANTA FE DE BOGOTÁ D.C.
TOBARRIOS GALVÍS

31 MAY 2000

ES UNA FOTOCOPIA QUE COINCIDE EXACTAMENTE
CON EL ORIGINAL QUE TUVE A LA VISTA

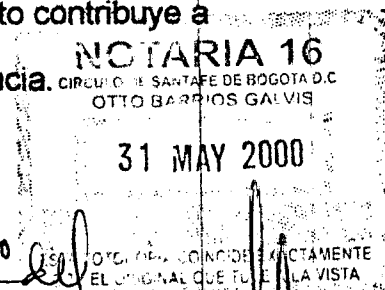
C. del
CECILIA GARCÍA DE GONZÁLEZ
TRADUCTORA OFICIAL
Resolución 1443 Minjusticia

microflora nativa del suelo luego del tratamiento, y específicamente a un aumento en las *Pseudomonas* spp. (Soler-Serratosa y otros, 1994).

Contribución del Invento

No obstante este extenso trabajo, una estrategia adecuada se ha desarrollado que provee composiciones satisfactorias apropiadas para el tratamiento de las plantas desde una etapa muy temprana (a saber, semillas o plántulas) para producir plantas de rápido crecimiento con una resistencia sistémica contra patógenos foliares y alterar la microflora del suelo para un efectivo control de los nemátodos. Se requieren alternativas posteriores de pesticidas químicos y fumigación del suelo con metilo bromuro para el control de enfermedades de las plantas. También es deseable reducir la presión y dependencia de soluciones de pesticidas químicos para el control de enfermedades de la planta.

Por lo tanto, hay una necesidad urgente, tanto ambiental como económica, de dichas composiciones y métodos de tratamiento libres de pesticidas y de elementos similares a éstos. Es evidente que otros expertos en la materia no han logrado anteriormente revelación o publicación previa a lo contemplado por este invento de lograr en lo posible promover el crecimiento sinérgico de la planta e inducir la resistencia sistémica según el presente invento de PGPR y una modificación orgánica produciendo así plantas con un índice incrementado de crecimiento y una inmunidad a la enfermedad sistémica. Este invento contribuye a solucionar esta necesidad y los problemas enfrentados por esta ciencia.



CECILIA GARCIA DE GONZALEZ
TRADUCTORA OFICIAL
Resolución 1443 Minjusticia

138
132

CIENCIA RELACIONADA

La bibliografía de publicaciones relacionadas aparece antes de la sección de las reivindicaciones de este documento.

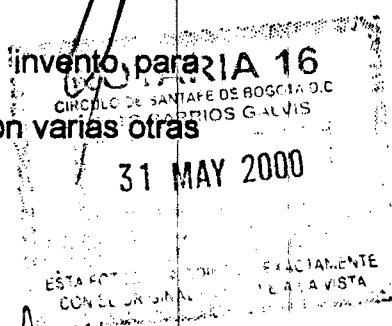
BREVE RESUMEN DEL INVENTO

El invento se relaciona en general con el campo del crecimiento y desarrollo de la planta, en particular de los métodos y composiciones para incrementar el crecimiento de la planta y la resistencia a la enfermedad. El invento está relacionado con el inicio y promoción del crecimiento de la planta utilizando una combinación de múltiples tácticas de control biológico en el suelo o en un medio sin tierra para el crecimiento de la planta con el fin de controlar nemátodos y patógenos foliares.

El invento también está relacionado con una composición nueva de un medio de crecimiento de la planta que comprende rizobacterias de quitina y no quitinolíticas promotoras del crecimiento (PGPR), las cuales crean una sinergia en el crecimiento de la planta y resistencia a las enfermedades. Además el invento se relaciona con un nuevo método sinérgico de utilizar ya sea el tratamiento de la semilla o la aplicación a la plántula en un medio sin tierra de un elemento quitinolítico y elementos bacterianos para la preparación y desarrollo de plantas y trasplantes.

El invento se relaciona con varios productos obtenidos del invento para A 16 plantas como el tomate y el cohombro. Este también se relaciona con varias otras composiciones y plantas descritas más adelante.

El invento suministra varias conformaciones de utilidad.



El invento suministra una composición que comprende al menos dos cepas bacterianas de PGPR y un compuesto quitinolítico o un compuesto de efecto equivalente. Las rizobacterias promotoras del crecimiento de la planta (PGPR) comprenden al menos una cepa bacteriana que puede inducir una resistencia sistémica de la planta a las enfermedades. La composición además comprende un compuesto quitinolítico que puede tener actividades de control de nemátodos. Al menos una cepa bacteriana PGPR en una conformación preferente no es quitinolítica. El compuesto quitinolítico es preferiblemente un compuesto orgánico animado o un polisacárido animado.

Otras composiciones del invento pueden incluir ingredientes adicionales como al menos un compuesto de aromáticas botánicas. Generalmente un compuesto de aromáticas botánicas para el actual invento tendrá un peso molecular bajo y será un metabólico volátil de la planta, como el citral, furfural o benzaldehído. Varios otros compuestos que no afectan negativamente la función del compuesto quitinolítico y de las PGPR pueden ser incluidos en la composición.

El invento provee además un método para exponer las semillas y los esquejes en crecimiento en el suelo o en un medio sin tierra, que incluye la composición biológica del invento. Luego las semillas y/o esquejes continúan siendo expuestos y/o en crecimiento, respectivamente, en el campo o en un ambiente con condiciones similares al de los invernaderos. Estas condiciones, como las de los invernaderos, pueden estar controlados ambientalmente en cuanto a temperatura, luz, humedad y demás. Estas condiciones en forma alternativa pueden estar libres de dichos controles ambientales. El desarrollo de las plantas continúa bajo estas condiciones hasta lograr un crecimiento y tamaño predeterminados. En adelante, la planta resultante es trasplantada a las

NOTARIA 16
BOGOTÁ D.C.
MAY 2000

ESTA FOTOCOPIA CONCORDA EXACTAMENTE
CON EL ORIGINAL QUE TUVE A LA VISTA

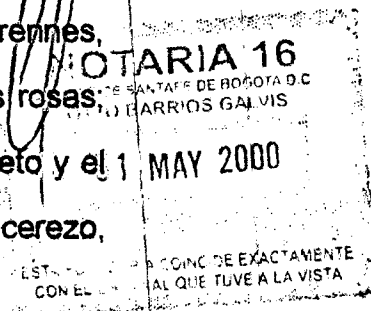
CECILIA GARCÍA DE GONZÁLEZ
TRADUCTORA OFICIAL
Resolución 1443 Minjusticia

condiciones del campo para continuar su crecimiento normal. Las plantas resultantes, ya sean de semillas o esquejes, han sido observadas para el desarrollo de una resistencia sistémica a las enfermedades, un mayor vigor en el crecimiento y otras propiedades deseables.

El método del invento provee medios diferentes para el tratamiento de una plántula trasplantada o semillas de una planta objetivo con la composición del invento. Uno de dichos medios es preferiblemente rociar la plántula objetivo con una composición acuosa del invento para promover la exposición y penetración de los componentes de la composición a la planta objetivo. Otro medio es exponer las plántulas o semillas de la planta objetivo a la composición del invento.

Otra conformación del invento se relaciona con las plantas mejoradas obtenidas por el invento, incluyendo plantas que tienen una resistencia sistémica a enfermedades infecciosas, ya sea que la infección esté en el sistema de la raíz, el follaje o en otras partes de las plantas.

Las plantas que pueden ser tratadas y logradas de acuerdo al invento son tanto monocotiledóneas como dicotiledóneas, de especies como la cebada, avena, arroz, trigo, soja, maíz; melones entre los cuales se encuentran el cohombro, el cantaloupe y la sandía; vegetales incluyendo judías, arveja, maní; cultivos de aceite incluidos la canola y soja; plantas solanáceas incluido el tabaco; tubérculos incluida la papa; vegetales incluidos el tomate, pimentón, cohombro, brócoli, repollo, coliflor, lechuga y rábano; frutas incluidas las fresas; cultivos de fibra incluido el algodón; otras plantas incluidas el café, plantas rastreras, perennes, ornamentales leñosas, céspedes y flores de corte incluidos el clavel y las rosas; caña de azúcar; cultivo de árboles en contenedores; perennes como el abeto y el pino; árboles caducos como el arce y el roble; y frutales incluidos el cerezo,



144
140

manzano, pero y naranjo. En general cualquier planta susceptible a una enfermedad y que no responda a la composición del invento puede ser tratado de acuerdo con el invento.

Otras conformaciones del invento se irán viendo de aquí en adelante.

DESCRIPCION DETALLADA DEL INVENTO

El invento está relacionado con varias combinaciones de tácticas de biocontrol aplicadas en conjunto al suelo o al medio de crecimiento de la planta utilizada para la producción de plantas o esquejes de trasplante. Las "tácticas" pueden incluir mezclas de dos o más cepas de PGPR donde una o más pueden inducir la resistencia de la planta. Estas "tácticas" pueden además incluir modificaciones orgánicas, que pueden tener actividad de control de nemátodos, y "compuestos selectores", tales como compuestos de aromáticas botánicas (incluyendo el timol, benzaldehído, citral, furfural, mentol y alfa-terpineol) que alteran la microflora del suelo para incrementar la actividad de microorganismos antagónicos nativos. El invento también puede constar del uso de dos de estas tres tácticas, a saber, mezclas de PGPR junto con modificaciones orgánicas, pero sin adicionar compuestos selectores. El invento provee otras conformaciones que se comentarán más adelante.

Según el invento, se ha descubierto una nueva sinergia de tácticas de biocontrol de una composición no identificada hasta ahora. La composición según el invento, inicia y promueve el crecimiento de la planta e induce en forma sinérgica una resistencia sistémica a enfermedades en las plantas. Las características de la composición son tanto nuevas como sinérgicas. El invento

ARIA 16
SANTAFE DE BOGOTA D.C.
BARRIOS GALVIS
31 MAY 2000
CON EXACTA VISTA

642
147

provee una composición que comprende componentes de quitina y no quitinolíticos para el crecimiento de las plantas y resistencia a las enfermedades. La composición resulta en una sinergia de las características del componente incluyendo la iniciación y promoción del crecimiento de la planta e induciendo una resistencia sistémica de la planta a las enfermedades.

La Composición del Invento

La composición comprende al menos una cepa de PGPR y una modificación orgánica. La mezcla biológica de PGPR comprende preferentemente preparaciones de esporas de la bacteria. Adicionalmente, en la mezcla PGPR, al menos una cepa de PGPR puede inducir la resistencia sistémica de la planta a las enfermedades. La presencia de la bacteria en la mezcla es generalmente del orden de 10^3 a 10^{10} bacterias por semilla o por litro de la mezcla sin tierra. Una conformación preferida del invento es donde la presencia de la bacteria es de aproximadamente 1×10^{10} bacterias por litro de mezcla sin tierra y 1×10^8 de bacterias por semilla.

Los ejemplos de dos cepas formuladas de PGPR incluyen pero no se limitan a la cepa GB03 de *Bacillus subtilis* (disponible de Gustafson LLC, Plano, Tejas como Kodiak™) y la cepa IN937a de *Bacillus amyloliquefaciens*. Entre otros tipos de bacterias no quitinolíticas apropiadas para la composición están: las bacterias colonizadoras de raíces incluyendo la familia BACILLIACEAE, la cual forma esporas y comprende el género *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Brevibacillus*, *Virgibacillus*, *Alicyclobacillus*, y *Aneurinibacillus*; lasseudomónadas fluorescentes los aislados de *Pseudomonas* spp., *Serratia* spp., *Cornynebacterium* spp., *Enterobacter* spp., *Arthrobacter* spp., y *Burkholderia* spp.; y los hongos

NOTARIA 16
ANTAFE DE BOGOTÁ D.C.
LITO BARRIOS GALVIS
MAY 2000

COINCIDE EXACTAMENTE
CON LO QUE TUVE A LA VISTA

CECILIA GARCÍA DE GONZÁLEZ
TRADUCTORA OFICIAL
Resolución 1443 Minjusticia

143
142

beneficiosos como los *Trichoderma* spp., *Gliocladium* spp., y otros; almidones y actinomicetos. Los ejemplos adicionales del grupo de bacilos y su género formador de esporas, incluyendo los *Bacillus*, aparecen enumerados en el "Catálogo de Bacterias ATCC", publicado por la Colección de Cultivos Tipo Americano (ATCC, sigla en inglés), los cuales se incorporan aquí por referencia.

La modificación orgánica también se conoce como un componente quitinolítico al mostrar actividad en el control de nemátodos. El componente quitinolítico en la composición se encuentra en una cantidad suficiente para causar un efecto quitinolítico. La cantidad de componente quitinolítico presente puede estar entre 0.1% y 10.0%. Una conformación preferente del invento es donde la composición comprende aproximadamente 2.5% del componente quitinolítico.

Los ejemplos del componente quitinolítico incluyen pero no se limitan a la quitina, escamas de quitina y quitosan. El componente quitinolítico se puede derivar también de sus precursores, los cuales ante la hidrólisis u otro análisis químico o bioquímico puede rendir el componente quitinolítico. La modificación orgánica es preferiblemente una glucosa polisacárida. Dichos precursores son compuestos naturales orgánicos como la corteza de pino, las conchas de almejas o cáscaras de camarón, la harina de soja, la harina de semilla de algodón y la caseína.

Una conformación posterior del invento es una composición que comprende al menos una de las cepas de PGPR, una modificación orgánica, y un compuesto opcional de aromáticas botánicas. La adición opcional de un compuesto de aromáticas botánicas, también conocido como compuesto selector, a la composición primaria introduce además un pesticida para alterar la microflora del suelo. La presencia del pesticida reduce los nemátodos parasitarios y aumenta

NOTARIA 16
SANTAFE DE BOGOTA D.C.
OTY BARRIOS GALVIS
MAY 2000
COPIA EXACTAMENTE
DE LA VISTA

144
143

los antagonistas. Un ejemplo de un compuesto de aromáticas botánicas incluye pero no se limita al benzaldehído. Entre otros tipos de compuestos de aromáticas botánicas apropiadas para la composición está el citral. Además, los componentes opcionales incluyen componentes que no afectan en forma negativa la función de los dos componentes principales de la composición, conocidos como ingredientes no esenciales.

Una composición posterior del invento comprende las dos cepas de PGPR, una modificación orgánica, y un compuesto opcional de aromáticas botánicas.

El Método del Invento

La conformación del invento es un método de promover el crecimiento de las plantas e inducir la resistencia sinérgica de las plantas a las enfermedades. El método comprende exponer la semilla a una nueva composición biológica o plántulas creciendo en un medio sin tierra en un semillero conteniendo la nueva composición biológica, por un período de tiempo suficiente para iniciar el crecimiento mejorado y las características de supresión de enfermedades. Se siembra una semilla en el suelo o en un medio sin tierra y crece en un invernadero bajo las condiciones previamente comentadas. Como ejemplo, la composición biológica puede ser incorporada en un medio sin tierra como en un piso de espuma para trasplante y luego se riega la semilla. Durante este período de crecimiento, si se desea, se pueden aplicar a las plantas tratamientos adicionales de la composición en cantidades y tiempos predeterminados. Luego, si se desea, cuando las plántulas tienen una edad aproximada de cuatro a seis semanas, o cuando están listas para ser trasplantadas, éstas son entonces trasplantadas a las condiciones de campo o de invernadero donde la planta ha sido observada para

COPIA 16
OFICINA DE SANTAFE DE BOGOTA D.C.
BARRIOS GALVIS
MAY 2000
COPIA EXACTAMENTE
DE LO QUE SE TUVE A LA VISTA

que continúe su crecimiento normal. Además, las plantas son entonces tratadas opcionalmente con la composición, y ésta puede estar en forma líquida o sólida. Este tratamiento es preferible hacerlo en forma de aspersión foliar, aplicación para empapar, aplicación por goteo o a través de irrigación, en los cuales se ha visto que las plantas logran una mayor resistencia a las enfermedades. Este tratamiento opcional se puede realizar también en cualquier momento durante el período de crecimiento. Además, las semillas no tratadas son recubiertas exponiéndolas a la composición, ya sea en forma líquida o sólida, preferible hacerlo en forma de aspersión foliar, aplicación para empapar, por goteo o a través de irrigación. Este es un tratamiento opcional, y se puede hacer adicionalmente en cualquier momento a semillas tratadas o sin tratar.

Este método en particular estimula y promueve el crecimiento de la planta en las primeras etapas de las plántulas, lo que se sabe es una etapa difícil en el crecimiento de la planta para ser estimulada sólo con PGPR. El método también induce la resistencia sistémica de las plantas a las enfermedades hasta un mayor grado al logrado anteriormente por la ciencia. El invento permite la sinergia de la estimulación y la promoción del crecimiento de las plantas en combinación con la protección sistémica de la planta contra las enfermedades al estar expuesta a la composición biológica.

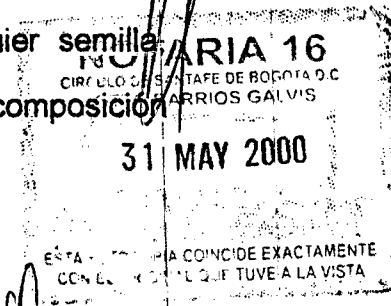
Las conformaciones posteriores del invento proveen los métodos para inhibir el crecimiento del agente de las enfermedades *Phytophthora infestans* (un agente causante de la última enfermedad de la roya), *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* (un agente causante de la enfermedad de mancha bacteriana), *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* (un agente causante de la enfermedad de mancha angular de la hoja), y *Fusarium* spp., al utilizar el método explicado

146
145

anteriormente y atacando la planta con un tratamiento del agente de la enfermedad. La plántula así atacada es luego evaluada y se mide la incidencia y severidad de la enfermedad. Se ha observado que las plantas que crecen bajo este invento y son atacadas con la enfermedad mostraron una capacidad significativamente mayor para resistir la enfermedad.

La Semilla, la Plántula y la Planta del Invento

Una conformación adicional del invento es una planta que habiendo sido expuesta a la composición muestre los efectos sinérgicos de un crecimiento mejorado en combinación con la protección sistémica a la enfermedad. Las semillas, plántulas y plantas que pueden ser tratadas y logradas de conformidad con el invento incluyen las monocotiledóneas y dicotiledóneas de especies como la cebada, avena, arroz, trigo, soja, maíz; melones entre los cuales se encuentran el cohombro, el cantaloupe y la sandía; vegetales incluyendo judías, arveja, maní; cultivos de aceite incluidos la canola y soja; plantas solanáceas incluido el tabaco; cultivos de tubérculos incluida la papa; vegetales incluidos el tomate, pimentón, cohombro, brócoli, repollo, coliflor, lechuga y rábano; frutas incluidas las fresas; cultivos de fibra incluido el algodón; otras plantas incluyendo el café, plantas rastreras, perennes, ornamentales leñosas, céspedes y flores de corte incluidos el clavel y las rosas; caña de azúcar; cultivo de árboles en contenedores; perennes como el abeto y el pino; árboles caducos como el arce y el roble; y frutales incluidos el cerezo, manzano, pero y naranjo. En general cualquier semilla, plántula o planta susceptible de una enfermedad y que responda a la composición del invento puede ser tratada de acuerdo al invento.



CECILIA GARCIA DE GONZALEZ
TRADUCTORA OFICIAL
Resolución 1443 Minjusticia

Las plantas resultantes del presente invento muestran un crecimiento mejorado en las primeras etapas de la plántula, lo cual se sabe es una etapa difícil del crecimiento de la planta para ser sólo estimulada con PGPR. La planta además muestra unas características físicas mensurables de una planta mejorada como son una mayor altura, peso, vigor, hojuelas y área de superficie de las mismas, en etapas más tempranas del crecimiento a aquellas plantas de control sin tratar. Igualmente, la planta muestra menos enfermedades que las plantas de control sin tratar.

Otras Conformaciones del Invento

Entre posteriores conformaciones del invento se encuentran varios medios de cultivo de plantas utilizando la composición, en particular el tomate, cohombro, y tipos previamente comentados, y partes del mismo que han sido desarrollados de conformidad con el invento.

Otras conformaciones del invento se harán aparentes en la posterior descripción en detalle de las conformaciones preferente y de otras conformaciones del invento.

El término "trasplante" es aquí utilizado como un término de la ciencia utilizado para designar una planta de cualquier edad o variedad que es trasladada de un lugar de crecimiento a otro.

El término "esqueje de trasplante" es aquí utilizado como una planta de cualquier edad puesta en un medio de crecimiento contenido en el cual la planta es preparada para ser trasplantada o transportada de un lugar a otro.

El término "medio sin tierra" es aquí utilizado como un medio de crecimiento que comprende productos con base de turba que pueden contener perlita,

NOTARIA 16
CIRCULO DE SANTANDER DE BOGOTÁ D.C.
OTTO BARRIOS GALVIS
2000
EXACTAMENTE
DE LA VISTA

248
147

vermicida, un componente fertilizante y otros ingredientes. Entre los ejemplos de un medio sin tierra están productos ya listos como "Pro-mix", "Redi-gro" y "Speedling Mix".

El término "plántula" es aquí utilizado como un término de la ciencia utilizado para designar una planta de una edad que va del día de la excrecencia hasta un año después de plantada o una edad en que se pueda trasplantar y no esté limitada a un solo tipo de planta. El término también incluye las "plántulas de bosque" que pueden tener un año.

El término "sinergia" es aquí utilizado para designar la acción resultante de dos o más sustancias para lograr un efecto del cual cada una individualmente no es capaz de lograr.

EJEMPLO 1

SINERGIA DE TACTICAS

A. Promover el Crecimiento del Tomate

Como primer ejemplo del invento, se hizo una preparación biológica con dos cepas de PGPR junto con quitina. Específicamente, la preparación biológica (llamada LS213), la cual se encuentra en el mercado, contenía cepa GB03 de *Bacillus subtilis*, y ha demostrado controlar algunas enfermedades al producir antibióticos iturinos, y la cepa IN937a de *Bacillus amyloliquefaciens* que fue seleccionada para la activación de resistencia inducida. Con ambas bacterias se prepararon fórmulas industriales de esporas y se mezclaron con escamas de quitina. La preparación biológica fue agregada en un recipiente con un medio sin tierra el cual fue utilizado para preparar los esquejes de trasplante de tomates.

NOTARIA 16
DE BOGOTÁ D.C.
OTIS GALVIS

Y 2000

ESTÁ... EXACTAMENTE
CON EL... A LA VISTA

149
148

Los tratamientos adicionales consistían en cada cepa bacteriana por sí sola con y sin quitina, sólo quitina, y un control sin tratamiento. Los esquejes de trasplante crecieron en bandejas de trasplante en el invernadero y se notaron los efectos en el crecimiento de las plántulas. Los resultados aparecen en la Tabla 1.

A lo largo de las tres mediciones (vigor, peso fresco del retoño, y área de superficie de las hojuelas), se presentó un mayor y significativo crecimiento con LS213 que con los diferentes componentes individuales. Esto indica una clara sinergia en la promoción del crecimiento de la planta con la combinación de quitina y las dos cepas de PGPR.

Tabla 1. Resultados del Ejemplo 1A – Promoviendo el crecimiento del tomate - Sinergia de tácticas

Tratamiento y componentes ¹	Vigor ²	Peso del Retoño Fresco (g) ³	Area de la superficie de la hojuela (cm ²) ⁴
Control: sin componentes	1.4 a	0.4113 a	3.22 a
LS213; quitina + GB03 + IN937a	4.9 e	1.6555 f	18.37 e
Sólo quitina	2.3 b	0.6088 bc	6.40 b
Quitina + GB03	2.9 c	0.7393 de	6.69 b
Quitina + IN937a	3.6 d	0.8255 e	8.29 c
GB03	2.4 bc	0.6393 bc	7.76 c
IN937a	2.1 b	0.6281 cd	7.74 c
GB03 + IN937a	2.1 b	0.5931 b	6.57 b
LSD (P = 0.05)	0.53	0.088	0.84

¹ Los tratamientos biológicos fueron incorporados a una mezcla sin tierra a 1:40 (v/v) colocados en un piso de espuma para trasplante, y luego esparcida la semilla de tomate cv. Solar Set. Se hicieron cuatro pisos por tratamiento. Las PGPR son cepas GB03 y IN937a

² El vigor de las plántulas fue calificado 3 semanas después de sembradas en una escala de 1 a 5. 1=malo, 2=promedio, 3=bueno, 4=muy bueno y 5=excelente. Promedio de las cuatro réplicas

³ Peso del retoño fresco de la plántula. Promedio de las 4 réplicas, 10 plántulas por réplica.

⁴ El área más grande de superficie de la hojuela (generalmente de la 4ª o 5ª hoja). Promedio de 31 réplicas, 10 hojuelas por réplica.

Promedios seguidos por diferentes letras son significativamente diferentes de conformidad con la prueba menor diferencia significativa (LSD, sigla en inglés) protegida a P = 0.05

NOTARIA 16
CIRCULO DE SANTAFE DE BOGOTA D.C.
OTTO BARRIOS GALVIS
31 MAY 2000
ESTA FOTOCOPIA COINCIDE EXACTAMENTE
CON EL ORIGINAL QUE TUVE A LA VISTA

B. Resistencia Inducida en el Tomate

Algunos de los esquejes de trasplante del experimento anterior, aquellos tratados con el control, sólo quitina y LS213, fueron trasplantados a recipientes más grandes inmediatamente después de llegar a las medidas de crecimiento que aparecen en la Tabla 1. Diez plantas de cada tipo de tratamiento fueron entonces atacadas con *Phytophthora infestans* (un agente causante de la última enfermedad de la roya), o *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* (un agente causante de la enfermedad de mancha bacteriana). Después de un tiempo predeterminado las plantas fueron evaluadas para resistencia a las enfermedades. Los resultados del desarrollo de las enfermedades aparecen en la Tabla 2.

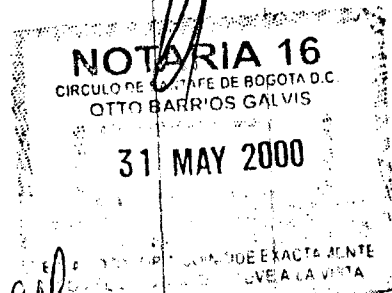
El grado más alto de protección contra las enfermedades de ambos patógenos se presentó con LS213. En la mancha bacteriana, la protección alcanzada con LS213 fue significativamente mayor tanto en el control sin tratar como en el tratamiento de sólo quitina. Esto muestra que la sinergia en la promoción del crecimiento de la planta anotada en la Tabla 1 se traduce en sinergia de protección a la enfermedad.

Tabla 2. Resultados del Ejemplo 1B - Resistencia Inducida en el Tomate - Sinergia de tácticas

<u>Tratamientos</u>	<u>% Ultima enfermedad de la roya/planta⁵</u>	<u>Lesiones mancha bacteriana/hojuela⁶</u>
Control	19.1 b	22.9 b
Quitina	16.5 a	22.35 b
LS213	7.7 a	11.87 a
LSD ($P = 0.05$)	9.98	2.42

⁵ Promedio de 10 réplicas, una planta por réplica.

⁶ Promedio de 10 réplicas, 6 hojuelas por planta.



151
150

EJEMPLO DOS

SINERGIA DE TACTICAS

A. Promoviendo el Crecimiento del Tomate y el Cohombro

Se realizó un experimento similar al descrito en el Ejemplo 1. Los componentes de quitina, GB03 y IN937a fueron probados en un medio sin tierra para el crecimiento de la planta para ver los efectos en el crecimiento de las plántulas utilizando tomate y cohombro. Las mediciones adicionales para el crecimiento de plantas fueron realizadas como aparece en las Tablas 3 y 4. Los resultados aparecen en las Tablas 3 y 4.

Los resultados tanto de tomate (Tabla 3) y de cohombro (Tabla 4) demuestran de nuevo que existe una clara sinergia de tácticas para promover el crecimiento. Por ejemplo con el tomate (Tabla 3): con sólo quitina se obtuvo algo de promoción de crecimiento con relación a las de control, causando aumentos importantes en altura, número de hojuelas, y área de superficie de la hojuela; pero no tuvo un gran aumento en vigor, peso, o contenido de clorofila. En comparación, el tratamiento con LS213 dio como resultado importantes incrementos en todos estos parámetros con relación a las de control. Algo similar se vio en el cohombro (Tabla 4), el LS213 causó importantes aumentos en todos los parámetros comparándolos tanto con los de control sin tratar y los de sólo quitina.

B. Resistencia Inducida

Luego de tomar las medidas de crecimiento arriba descritas, las plantas de tomate y cohombro de los tres tratamientos fueron trasplantadas a recipientes. Los tratamientos probados fueron las de control sin tratar, sólo quitina, y LS213.

NOTARIA 16

BOGOTÁ D.C.

LOS GALVIS

MAY 2000

152
151

Las plantas de tomate fueron inoculadas con el patógeno de la mancha del tomate (según se describe en el ejemplo 1B), y las plantas de cohombro fueron inoculadas con *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*, agente causante de la enfermedad de mancha angular de la hoja. Los resultados se encuentran en la Tabla 5.

Los resultados que aparecen en la Tabla 5 muestran que las plántulas preparadas con tratamientos de LS213 tenían resistencia inducida a la enfermedad. Es interesante ver que las plántulas preparadas con el tratamiento de sólo quitina, que causa unos aumentos significativos en el crecimiento de las plantas, no fueron resistentes. La falta de resistencia inducida con quitina cuando se sucede una promoción significativa en el crecimiento demuestra además que los beneficios del LS213 son sinérgicos.

CECILIA GARCIA DE GONZALEZ
TRADUCTORA OFICIAL
Resolución 1443 Minjusticia

NOTARIA 16
CIRCULO DE SANTA FE DE BOGOTÁ D.C.
OTTO BARRIOS GARCIA
31 MAY 2000
ESTO CONTESTA CONCIERDE EXACTAMENTE
CON EL ORIGINAL QUE TUVE A LA VISTA

1233

152

NOTARIO 16
CIRCULO DE SAJATE DE BOGOTÁ D.C.
OTTO RARRIOS C.M. VIS
31 MAY 2000

Tabla 3. Resultados del Ejemplo 2A – Promoviendo el crecimiento del tomate - Sinergia de tácticas

Tratamientos y componentes ¹	Vigor ²	Altura (cm) ³	Peso (g) ⁴	Número de hojuelas ⁵	Area de la superficie de la hojuela (cm ²) ⁶	Clorofila ⁷
Control: sin componentes	1.5 a	7.0 a	0.19 a	4.2 a	1.64 a	28.09 a
LS213; quitina + GB03 + IN937a	4.5 c	13.31 d	0.91 d	9.6 d	5.77 e	32.36 c
Quitina	2.3 a	10.7 c	0.71 a	8.9 cd	3.89 c	28.89 ab
Quitina + GB03	2.8 a	10.83 c	0.72 c	8.9 cd	4.09 c	32.54 c
Quitina + IN937a	2.8 b	11.003 c	0.74 c	8.9 cd	4.75 d	31.39 bc
GB03	1.8 a	7.40 a	0.23 a	4.6 a	1.80 a	28.64 ab
IN937a	2.8 b	8.80 b	0.36 b	5.8 b	2.68 b	28.17 a
GB03 + IN937a	1.5 a	7.33 a	0.25 a	4.7 a	1.78 a	30.58 abc
LSD (0.05)	0.86	0.71	0.07	0.70	0.56	2.86

¹ Los tratamientos biológicos fueron incorporados a una mezcla sin tierra a 1:40 (v/v) colocados en un piso de espuma para trasplante, y luego esparcida la semilla de tomate cv. Solar Set. Se hicieron cuatro réplicas de pisos por tratamiento.

² El vigor de las plántulas fue calificado 3 semanas después de sembradas en una escala de 1-5; 1=malo, 2=promedio, 3=bueno, 4=muy bueno y 5=excelente. Promedio de las cuatro réplicas.

³ La altura de las plántulas es desde el nivel del suelo a la punta. Promedio de 4 réplicas, 5 plántulas por réplica

⁴ Peso del retoño fresco de la plántula. Promedio de las 4 réplicas, 5 plántulas por réplica.

⁵ Número de hojuelas por planta. Promedio de las 4 réplicas, 5 plantas por réplica.

⁶ El área más grande de superficie de la hojuela (generalmente de la 4ª o 5ª hoja). Promedio de 4 réplicas, 10 hojuelas por réplica.

⁷ El contenido de clorofila de la hojuela más grande de la 4ª o 5ª hoja. Promedio de las 4 réplicas, 5 plantas por réplica

Los promedios seguidos de diferentes letras son significativamente diferentes según la prueba de menor diferencia significativa (LSD, sigla en inglés) protegida a $P = 0.05$

Tabla 4. Resultados del Ejemplo 2A – Promoviendo el crecimiento del cohombro - Sinergia de tácticas

Tratamientos y componentes ⁸	Vigor ⁹	Altura (cm) ¹⁰	Peso (g) ¹¹	Número de hojas ¹²	Area de la superficie de la hoja (cm ²) ¹³	Clorofila ¹⁴
Control: sin componentes	1.8 a	9.13 a	1.39 a	1.9 ab	13.99 a	22.99 a
LS213; quitina + GB03 + IN937a	4.8 c	16.28 e	2.97 e	2.8 d	27.68 d	29.72 c
Sólo Quitina	2.3 ab	14.65 d	2.23 d	2.1 c	24.62 c	25.22 bcd
Quitina + GB03	2.8 bc	12.33 c	1.93 bc	2.1 bc	20.89 b	26.49 cd
Quitina + IN937a	2.8 bc	13.05 c	2.12 cd	2.1 c	21.28 b	26.86 cd
GB03	1.5 a	8.80 a	1.40 a	1.9 ab	13.60 a	23.01 a
IN937a	3.5 c	12.88 a	1.97 bc	2.0 abc	18.47 b	24.07 ab
GB03 + IN937a	1.8 a	9.2 a	1.42 a	1.8 a	13.80 a	23.14 a
LSD (0.05)	0.86	1.23	0.25	0.21	2.81	1.67

⁸ Los tratamientos biológicos fueron incorporados a una mezcla sin tierra a 1:40 (v/v) colocados en un piso de espuma para trasplante, y luego esparcida la semilla de tomate cv. Solar Set. Se hicieron cuatro réplicas de pisos por tratamiento.

⁹ El vigor de las plántulas fue calificado 3 semanas después de sembradas en una escala de 1-5; 1=malo, 2=promedio, 3=bueno, 4=muy bueno y 5=excelente. Promedio de las cuatro réplicas.

¹⁰ La altura de las plántulas es desde el nivel del suelo a la punta. Promedio de 4 réplicas, 5 plántulas por réplica

¹¹ Peso del retoño fresco de la plántula. Promedio de las 4 réplicas, 5 plántulas por réplica.

¹² Número de hojuelas por planta. Promedio de las 4 réplicas, 5 plantas por réplica.

¹³ El área más grande de superficie de la hoja (generalmente desde la 4ª o 5ª hoja). Promedio de 4 réplicas, 5 plantas por réplica.

¹⁴ El contenido de clorofila de la hojuela más grande de la 4ª o 5ª hoja. Promedio de las 4 réplicas, 5 plantas por réplica

Promedios seguidos por diferentes letras son significativamente diferentes según la prueba de menor diferencia significativa (LSD, sigla en inglés) protegida a $P = 0.05$

Tabla 5. Resultados del Ejemplo 2B- Resistencia Inducida en el Tomate y Cohombro – Sinergia de tácticas

<u>Tratamiento</u> ¹⁵	Tomate/ <i>Xanthomonas</i> <i>Axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i> ¹⁶	Cohombro/ <i>Pseudomonas</i> <i>syringae</i> pv. <i>lachrymans</i> ¹⁷
Control	18.97 b	18.45 b
Quitina	17.63 b	17.90 b
LS213	7.87 a	10.80 a
LSD ($P = 0.05$)	3.04	3.23

¹⁵ Productos de biocontrol aplicados como modificaciones al suelo antes de sembrar

¹⁶ Valores para *X. Axonopodis* pv. *vesicatoria* representan el número promedio de lesiones por hojuela de cada plántula de tomate de las cuatro réplicas, 5 plantas por réplica y por tratamiento.

¹⁷ Valores para *P. syringae* pv. *lachrymans* representan el número promedio de los síntomas totales de la mancha de la hoja por hoja de las cuatro réplicas, 5 plantas por réplica y por tratamiento

154
154
NOTARIA 16
CIRCULO DE NOTARIOS DE BOGOTÁ D.C.
OTTO PARRIOS GALVIS
31 MAY 2000
DE SANTAMIENTE
E.A.G. VISTA

1251

155
NOTARIA 16
CIRCULO DE SANTO DOMINGO DE LOS RIOS
OTTO BARRIOS GALVIS
31 MAY 2000
FOLIO 155
FOLIO 155
FOLIO 155

EJEMPLO TRES SINERGIA DE TACTICAS CULTIVOS MULTIPLES, PROMOCION DE CRECIMIENTO

Se realizó un experimento para determinar si ocurrían en otros cultivos los efectos sinérgicos sobre el crecimiento de la plántula anotados en los ejemplos 1 y 2. En este experimento, se prepararon los tratamientos de control sin tratar, sólo quitina y LS213 en la forma descrita en el ejemplo 1 y utilizados para cultivar plántulas de tomate (cv. Solar Set), cohombro (cv. SMR 48), pimentón (cv. California Wonder), y tabaco (cv. TN90). El crecimiento de la plántula fue monitoreado con mediciones de acuerdo a los parámetros enumerados en la Tabla 6. Con el tomate y cohombro, los resultados obtenidos previamente se repitieron en que el tratamiento LS213 generalmente resultaba en una importante promoción del crecimiento comparado tanto con el control sin tratar y el tratamiento de sólo quitina (Tabla 6). Este mismo efecto sinérgico sobre el crecimiento fue visto con pimentón y tabaco.

EJEMPLO CUATRO DIFERENTES MEZCLAS DE PGPR CON QUITINA

Un experimento fue realizado para determinar si una de las cepas PGPR utilizadas en LS213 podrían ser reemplazadas con otra cepa.

Más específicamente, la cepa IN937a de LS213 de las PGPR fue reemplazada por 8 bacilos diferentes, cada uno de los cuales presentaba por sí mismo actividad de resistencia inducida. Las bacterias fueron mezcladas con cepa GB03 de PGPR y con quitina antes de incorporarlas a un medio de crecimiento sin tierra para las plantas. Los

156

efectos en el crecimiento de la plántula del tomate cereza (cv. RX 335) fueron probados en cuanto a resistencia inducida contra la mancha bacteriana. Los resultados que aparecen en la Tabla 7 muestran que LS213 causó una considerable promoción de crecimiento de la planta e inducción a la resistencia, comparado con el control de un tomate similar de cultivo de lo visto anteriormente en el tomate 'Solar Set'. Otras combinaciones de bacterias y quitina eran causa en general de importantes incrementos en el crecimiento comparado al de control; sin embargo, no todos estos dieron gran protección contra la mancha bacteriana. Los resultados generales muestran que los efectos beneficiosos del invento son dependientes de la cepa bacteriana, pero que se pueden utilizar mezclas de diferentes bacterias para obtener los mismos resultados.

156

NOTARIA 16
CIRCUITO DE SAN JUAN DE LOS RIOS
CIRCUITO BAP...
31 MAY 2000
ESTA FOTOCOPIA COINCIDE EXACTAMENTE
CON EL ORIGINAL QUE TUVE A LA VISTA

C. J. G.
CECILIA GARCIA DE GONZALEZ
TRADUCTORA OFICIAL
Resolución 1443 Minjusticia

158

157

NOTARIA 16
CIRCULO DE NOTARIES DE BOGOTÁ D.C.
OTTO BLANCO GARCÍA
31 MAY 2000
ESTÁ FOTOCOPIADA CON CUIDADO EXACTO
CON EL ORIGINAL QUE TUVE A LA VISTA

Tabla 6. Resultados del Ejemplo 3 – Sinergia de tácticas de múltiples cultivos

TOMATE

<u>Tratamientos</u> ¹⁸	<u>Apariencia</u> <u>Saludable</u> ¹⁹	<u>Vigor</u> ²⁰	<u>Altura</u> <u>(cm)</u> ²¹	<u>Número</u> <u>de hojas</u> ²²	<u>Peso retoño</u> <u>fresco (g)</u> ²³	<u>Area de la</u> <u>superficie de la</u> <u>hojuela (cm²)</u> ²⁴
Control	22.5 a	1.0 a	4.68 a	2.3 a	0.079 a	0.69 a
Quitina	22.0 a	2.3 b	6.98 b	7.1 b	0.266 b	1.65 b
LS213	23.0 a	3.3 c	9.03 c	8.5 c	0.539 c	3.03 c
LSD ($P = 0.05$)	2.73	0.51	0.719	0.77	0.103	0.45

COHOMBRO

<u>Tratamientos</u> ¹⁸	<u>Apariencia</u> <u>Saludable</u> ¹⁹	<u>Vigor</u> ²⁰	<u>Altura</u> <u>(cm)</u> ²¹	<u>Número</u> <u>de hojas</u> ²²	<u>Peso retoño</u> <u>fresco (g)</u> ²³	<u>Area de la</u> <u>superficie de la</u> <u>hojuela (cm²)</u> ²⁴
Control	22.3 a	1.0 a	4.35 a	2.0 a	0.709 a	5.56 a
Quitina	23.8 b	1.3 a	4.58 ab	2.1 a	0.927 a	7.49 b
LS213	23.3 a	2.5 b	6.40 c	2.2 a	1.351 b	14.20 c
LSD ($P = 0.05$)	1.22	0.49	0.704	0.29	0.304	2.89

Cecilia GARCIA DE GONZALEZ
TRADUCTORA OFICIAL
Resolución 1443 Minjusticia

Tabla 6. - continuación

PIMENTON

<u>Tratamientos</u> ¹⁸	<u>Apariencia</u> <u>Saludable</u> ¹⁹	<u>Vigor</u> ²⁰	<u>Altura</u> <u>(cm)</u> ²¹	<u>Número</u> <u>de hojas</u> ²²	<u>Peso retoño</u> <u>fresco (g)</u> ²³	<u>Area de la</u> <u>superficie de la</u> <u>hojuela (cm²)</u> ²⁴
Control	18.5 A	1.0 a	3.30 a	2.0 a	0.054 a	0.21 a
Quitina	20.0 A	1.8 b	3.78 b	4.2 b	0.163 b	1.43 b
LS213	20.0 A	3.3 c	4.83 c	4.4 b	0.299 c	2.64 c
LSD ($P = 0.05$)	3.48	0.69	0.39	0.41	0.052	0.364

TABACO

<u>Tratamientos</u> ¹⁸	<u>Apariencia</u> <u>Saludable</u> ¹⁹	<u>Vigor</u> ²⁰	<u>Altura</u> <u>(cm)</u> ²¹	<u>Número</u> <u>de hojas</u> ²²	<u>Peso retoño</u> <u>fresco (g)</u> ²³	<u>Area de la</u> <u>superficie de la</u> <u>hojuela (cm²)</u> ²⁴
Control	21.5 a	2.5 a	0.1 a	1.0 a	0.002 a	0.01 a
Quitina	17.0 a	2.0 a	0.98 b	3.1 b	0.079 b	1.37 b
LS213	21.5 a	4.0 b	1.8 c	4.0 c	0.169 c	3.22 c
LSD ($P = 0.05$)	4.96	0.8	0.32	0.45	0.047	0.736

¹⁸ Los tratamientos biológicos fueron incorporados a una mezcla sin tierra a 1:40 (v/v). Se hicieron cuatro réplicas de pisos por tratamiento.

¹⁹ La apariencia de las plántulas fue calificada 3 semanas después de sembradas. Los valores representan el promedio de 4 réplicas por tratamiento

²⁰ El vigor de las plántulas fue calificado 3 semanas después de sembradas en una escala de 1-5; 1=malo, 2=promedio, 3=bueno, 4=muy bueno y 5=excelente. Promedio de las cuatro réplicas.

²¹ La altura de las plántulas es desde el nivel del suelo a la punta. Promedio de 4 réplicas, 5 plántulas por réplica

²² Número de hojas por planta. Promedio de las 4 réplicas, 5 plantas por réplica.

²³ Peso del retoño fresco de la plántula. Promedio de las 4 réplicas, 5 plántulas por réplica.

²⁴ El área más grande de superficie de la hoja (generalmente desde la 4ª o 5ª hoja). Promedio de 4 réplicas, 5 plantas por réplica.

158

NOTARIA 16
CIRCULO DE SANTAFÉ DE BOGOTÁ D.C.
OTTO BARRIOS GALVIS
31 MAY 2000

Tabla 7. Resultados del Ejemplo 4 – Mezclas diferentes de PGPR con Quitina

Tratamientos, componentes ²⁵	Vigor ²⁶	Altura (cm) ²⁷	Número de hojas ²⁸	Diámetro tallo (mm) ²⁹	Peso retoño fresco (g) ³⁰	Area superficie hojuela (cm ²) ³¹	Resistencia Inducida; No. lesiones mancha bacteriana por hojuela
LS254; quitina + GB03 + SE34	2.5 a	9.64 c	19.1 bc	1.99 cd	0.709 cd	2.46 b	12.2 cd
LS255; quitina + GB03 + IN937b	3.5 bc	9.58 c	20.1 c	2.02 cd	0.651 bc	2.33 b	10.6 c
LS256; quitina + GB03 + INR7	4.0 bcd	11.89 de	21.5 c	2.14 cd	0.948 e	3.49 c	9.5 bc
LS257; quitina + GB03 + T4	3.5 bc	13.23 f	21.4 c	2.38 d	0.984 e	3.42 c	4.6 ab
LS258; quitina + GB03 + IPC11	2.5 ab	10.01 c	22.2 c	2.19 cd	0.884 dc	3.03 c	17.8 d
LS259; quitina + GB03 + IPN19	2.0 a	7.65 bc	16.9 b	1.64 b	0.502 bc	2.10 b	9.4 bc
LS260; quitina + GB03 + 3P114	2.5 ab	9.24 c	19.9 c	2.10 cd	0.721 cd	2.14 b	10.3 bc
LS261; quitina + GB03 + C1	4.5 cd	10.99 cd	20.9 c	2.28 d	0.869 de	3.52 c	3.3 a
LS213; quitina + GB03 + IN937a	5.0 d	12.43 ef	22.0 c	2.46 d	1.033 e	3.36 c	3.9 ab
Control sin tratar	1.5 a	4.13 a	5.9 a	1.10 a	0.085 a	0.36 a	12.7 cd
LSD (P = 0.05)	1.32	1.31	2.8	0.28	0.186	0.568	5.69

²⁵ Los tratamientos biológicos fueron incorporados a una mezcla sin tierra a 1:40 (v/v) y colocados en pisos de espuma para trasplantar y luego sembrados con semilla de tomate cv. Cherry RX 335. Se hicieron dos réplicas de pisos por tratamiento.

²⁶ El vigor de las plántulas fue calificado 4 semanas después de sembradas en una escala de 1-5; 1=malo, 2=promedio, 3=bueno, 4=muy bueno y 5=excelente. Promedio de las 2 réplicas.

²⁷ La altura de las plántulas es desde el nivel del suelo a la punta. Promedio de 2 réplicas, 10 plántulas por réplica

²⁸ Número de hojuelas por planta. Promedio de las 2 réplicas, 10 hojuelas por réplica.

²⁹ El diámetro del tallo es el promedio de 2 réplicas, 10 plántulas por réplica.

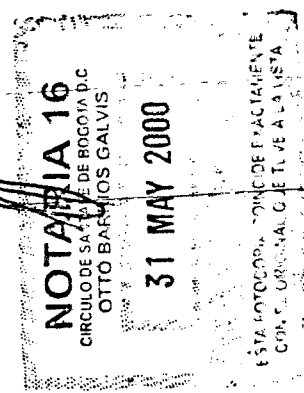
³⁰ Peso del retoño fresco de la plántula. Promedio de las 2 réplicas, 10 plántulas por réplica.

³¹ El área más grande de superficie de la hojuela (generalmente desde la 4ª o 5ª hoja). Promedio de 2 réplicas, 10 hojuelas por réplica.

Los promedios seguidos de diferentes letras son significativamente diferentes según la prueba de diferencia significativa mínima (LSD, siblea en inglés) en $P = 0.05$

147

160



EJEMPLO CINCO
PRUEBA DE CAMPO DEL TOMATE
Protección contra múltiples enfermedades

Dos de las preparaciones biológicas utilizadas en el Ejemplo 4 (LS213 y LS254) fueron ensayadas en pruebas de campo. Las plántulas del tomate (cv. "Solar Set") fueron preparadas según se describieron anteriormente sembrándolas en una mezcla sin tierra tratada con las preparaciones biológicas. También se preparó un grupo de control sin tratar. Los trasplantes fueron colocados al azar con un diseño completo en bloque, con 10 plantas por réplica y 5 réplicas de cada tratamiento. El experimento fue sembrado cuatro veces para la evaluación de 1) nemátodos de nudo en la raíz, 2) corona fusarium y pudrición de la raíz fumigando el suelo con metilbromuro, 3) corona fusarium y pudrición de la raíz sin fumigar el suelo, y 4) la mancha bacteriana. Los resultados aparecen en la Tabla 8 y demuestran que las preparaciones biológicas conducen a un desarrollo reducido de todas las enfermedades probadas en condiciones de campo.

EJEMPLO SEIS
PRUEBA DE CAMPO DEL TOMATE

Efecto de las diferentes mezclas bacterianas con y sin fumigación foliar

E. G.

ETHEL GARCIA DE GONZALEZ
TRADUCTORA OFICIAL
Resolución 1443 Minjusticia

162

161

NOTARIA 16
DE SANTA JERONIMA DC
CIRCUITO BARRIOS GALVIS
31 MAY 2000

Se realizaron dos pruebas de campo en el tomate para determinar si las diferentes formas de preparación biológica (diferenciadas en uno de los componentes bacterianos) protegían contra los nemátodos del nudo en la raíz y la mancha bacteriana como el tratamiento de LS213 del Ejemplo 5. Los resultados que aparecen en la Tabla 9, muestran que otras formas de preparación biológica sí condujeron a proteger las plantas contra los dos patógenos probados.

Uno de los objetivos fue determinar si los efectos beneficiosos del tratamiento biológico podrían ser incrementados al combinar el tratamiento estándar de siembra en el medio sin tierra con una fumigación foliar con los componentes bacterianos de la preparación biológica. Los resultados muestran que se ve una protección adicional al combinar el tratamiento estándar con la fumigación foliar. Por ejemplo, sin la fumigación foliar, el LS254 dio gran protección contra el nemátodo del nudo en la raíz pero no contra la mancha bacteriana, mientras con la fumigación foliar sí hubo protección contra ambos patógenos.

EJEMPLO SIETE PRUEBA DE CAMPO DEL COHOMBRO

Efecto de las diferentes mezclas bacterianas con y sin fumigación foliar

Similar al Ejemplo 6, se realizaron dos pruebas de campo en el cohombro para evaluar la actividad de control de las enfermedades de las diferentes formas de preparación biológica con y sin fumigaciones foliares. Las

CÉCILIA GARCÍA DE GONZÁLEZ
TRADUCTORA OFICIAL
Resolución 1443 Minjusticia

163

162

NOTARIA 16
CIRCUITO DE SANTO DOMINGO
CALLE 16
OTTO BARRIOS GALVIS
31 MAY 2000

enfermedades evaluadas fueron de ocurrencia natural – nemátodos de nudo en la raíz y antracnosis foliar por hongos. Los resultados presentados en la Tabla 10 demuestran que al cambiar la cepa IN937a de PGPR por diferentes PGPR puede causar una actividad de protección de las enfermedades en el campo. Los resultados también demuestran que los efectos beneficiosos de las preparaciones biológicas no están limitadas a un solo cultivo de cohombro, pues algunas reducciones en la incidencia tanto de nemátodos de nudo en la raíz y la antracnosis se presentaron en cada cultivo probado.

Una comparación de los resultados de campo de la Tabla 10, con y sin fumigación foliar, demostró que este tratamiento "de presión" de las mismas PGPR contenidas en la preparación biológica utilizadas en la mezcla sin tierra de las plántulas provee una eficiencia adicional de protección a las enfermedades. Esto se puede ver en las comparaciones de la frecuencia de reducción de enfermedades en un tratamiento con y sin fumigación foliar. Por ejemplo, con LS213, con fumigación foliar, 3 de 4 promedios de la incidencia de enfermedades se vieron significativamente reducidos comparados con el control, mientras sin fumigación foliar, 2 de los 4 promedios se redujeron significativamente. Con LS260, esta "frecuencia de significación" aumentó entre 2 de 4 sin fumigación foliar a 4 de 4 con fumigación foliar.

Se debe entender que puede haber muchas variaciones en los procedimientos descritos en la composición, los métodos y los productos de las plantas del presente invento mientras aún permaneciendo dentro de los límites y el espíritu del invento.

164

163

NOTA: 16
CIRCULO DE SANTA FE DE BOGOTÁ, D.C.
OTTO BARRIOS
31 MAY 2000
ESTA FOTOCOPIA COINCIDE EXACTAMENTE
CON EL ORIGINAL QUE TUVE A LA VISTA

Tabla 8 – Resultados del Ejemplo 5, prueba de campo del tomate

ACTIVIDAD DE CONTROL BIOLÓGICO CONTRA ^a

Tratamiento	Nemátodo de nudo en la raíz ^b		Corona fusarium pudrición ^b			Mancha bacteriana	
	No. plantas con síntomas graves ^c	Índice de Nudo en la Raíz ^d	Con MeBr ^e	Sin MeBr no. de plantas con síntomas	Índice FORL ^f	No. de frutos con síntomas ^g	No. promedio de manchas/hoja ^h
Control	4.2	8.0	1.5	8.0	1.3	11.3	58.5
LS213	2.6	7.2	0.9	0.6	0.6	4.0	25.1
LS254	0.8	4.4	1.0	0.8	0.8	5.7	20.2
LSD _{0.05}	1.6	1.4	0.4	0.7	0.7	2.6	9.4
LSD _{0.10}	1.4	1.2	0.3	0.6	0.6		

^a El experimento fue al azar en un bloque completo con 5 réplicas por cada tratamiento; 10 plantas por réplica

^b Los valores mostrados son promedios de 9 sistemas de raíz al momento de la cosecha.

^c Se determinaron síntomas graves con la presencia de grandes agallas unidas en la mayor parte del sistema de la raíz.

^d El índice de nudo en la raíz se basó en una escala de 0 (sin agallas) a 10 (completamente lleno de agallas con un mal sistema de raíz)

^e MeBr = metil bomuro

^f El índice de la corona fusarium y de la pudrición de la raíz fue determinado utilizando una escala de 0 (sin síntomas) a 3 (decoloración grave y extendida)

^g No. de frutos de tomate verde (de 20 cosechados por lote) con 2 o más lesiones.

^h Con base a 10 hojas recogidas por lote

CECILIA GARCÍA DE GONZÁLEZ

TRADUCTORA OFICIAL

Resolución 1443 Minjusticia

Tabla 9. Resultados del Ejemplo 6 – Prueba de campo del tomate; efecto de las diferentes mezclas bacterianas con y sin fumigación foliar

Tratamientos: componentes usados en mezcla de plántulas	Fumigación foliar adicional de PGPR (+ o -)	Gravedad del nemátodo de nudo en la raíz ³²	Gravedad de la mancha bacteriana por hoja ³³
LS254; quitina + GB03 + SE34	+	3.85 *	3.54 *
LS255; quitina + GB03 + IN937b	+	4.0 *	5.06 *
LS257; quitina + GB03 + T4	+	3.92 *	4.22 *
Control sin tratamiento	+	5.47	5.82
LS254; quitina + GB03 + SE34	-	2.77 *	4.03 *
LS255; quitina + GB03 + IN937b	-	3.38 *	3.61 *
LS257; quitina + GB03 + T4	-	3.36 *	3.43 *
Control sin tratamiento	-	4.60	4.54

³² Promedio de 3 réplicas, 3-5 plantas por réplica. Gravedad de nudo en la raíz fue medido en una escala de 0-10 para todo el sistema de raíz: 0 = sin agallas; 10=lleno de agallas.

³³ Promedio de 3 réplicas, 10-15 hojas por réplica. La mancha bacteriana fue evaluada en una escala de 0-10; 0 = sin lesiones; 10 = máximo de lesiones

* Muestra diferencia significativa del control correspondiente de $P = 0.05$

* Muestra diferencia significativa del control correspondiente de $P = 0.05$

166

165

NOTARÍA 16
CIRCUITO DE BOGOTÁ D.C.
OT. BARRIOS GALVIS
MAY 2000

NOTA FOTOCOPIADA CON FOLIO EXACTAMENTE
CON EL ORIGINAL QUE FUE A LA NOTARÍA

Tabla 10. Resultados del Ejemplo 7 – Prueba de campo del cohombro, efecto de las diferentes mezclas bacterianas con y sin fumigación foliar

Tratamientos: componentes usados en mezcla sin tierra	Sin fumigación foliar		Sin fumigación foliar	
	cv. Straight-8		cv. Fancypak	
	Nudo en la raíz ³⁴	% Antracnosis ³⁵	Nudo en la raíz ³⁴	% Antracnosis ³⁵
LS213; quitina + GB03 + IN937a	2.92 *	17	1.85 *	27
LS254; quitina + GB03 + SE34	2.77 *	20	1.46 *	27
LS255; quitina + GB03 + IN937b	2.21 *	13	0.82 *	20
LS258; quitina + GB03 + IPC11	3.79	20	0.92 *	37
LS260; quitina + GB03 + 3PI14	2.46 *	23	2.67 *	13*
Control	5.0	30	4.3	43

Tratamientos: componentes usados en mezcla sin tierra	Con fumigación foliar		Con fumigación foliar	
	cv. Straight-8		cv. Fancypak	
	Nudo en la raíz ³⁴	% Antracnosis ³⁵	Nudo en la raíz ³⁴	% Antracnosis ³⁵
LS213; quitina + GB03 + IN937a	4.79	17*	0.83 *	17*
LS254; quitina + GB03 + SE34	5.43	3*	1.00 *	27*
LS255; quitina + GB03 + IN937b	2.70*	13*	2.00 *	17*
LS258; quitina + GB03 + IPC11	3.80	20*	1.00 *	37*
LS260; quitina + GB03 + 3PI14	3.08*	17*	0.83 *	17*
Control	4.87	53	2.89	50

³⁴ Promedio de 3 réplicas, 3-5 plantas por réplica.

³⁵ Promedio de 3 réplicas, 3-5 plantas por réplica.

* Muestra diferencia significativa del control de $P = 0.05$

CECILIA GARCÍA DE GONZÁLEZ

TRADUCTORA OFICIAL

Resolución 1443 Minjusticia

167
166

BIBLIOGRAFIA

Todas las publicaciones identificadas en este documento se incorporan en su totalidad al mismo como referencia:

Bauske, E.M., Backman, P.A., Harper, K.M., Brannen, P.M., Rodríguez-Kábana, R., y Kloepper, J.W. 1997. Efectos de los compuestos de aromáticas botánicas y el pH de la superficie en semillas sobre el crecimiento y colonización de rizobacterias promotoras del crecimiento de la planta de algodón. *Biocontrol Science and Technology* 7. 415-421.

Bauske, E.M., Rodríguez-Kábana, R., Esaun, V., Kloepper, J.W., Robertson, D.G., Weaver, C.F., y King, P.S. 1994. Manejo de *Meloidogyne incognita* en el algodón con el uso de compuestos de aromáticas botánicas. *Nematropica* 24_143-150.

Becker, U.O., Zavaleta-Mejía, E., Colbert, S.F., Schroth, M.N., Weinhold, A.R., Hancock, J.G., y Van Gundy, S.D. 1988. Efectos de rizobacterias en los nemátodos de nudo en la raíz y formación de agallas. *Fitopatología* 78: 1466-1459.

Benhamou, N., Lafontaine, P.J. y Nicole, M. (1994) Inducción a la resistencia sistémica a la corona *Fusarium* y pudrición de raíces en plantas de tomate por tratamiento a la semilla con quitosan. *Fitopatología* 84, 1432-1444.

Bird, A.F. y Bird, J. (1991) *The Structure of Nematodes* (La Estructura de los Nemátodos) Imprenta Académica, San Diego.

Canullo, G.C., Rodríguez-Kábana, R., y Kloepper, J.W. 1992. Cambios en la microflora del suelo asociados con el control de *Sclerotium rolfsii* con furfuraldehído. *Biocontrol de la Ciencia y la Tecnología* 2:159-169.

CECILIA GARCIA DE GONZALEZ

TRADUCTORA OFICIAL

Resolución 1443 Minjusticia

NOTARIA 16
CIRCULO DE SANTA FE DE BOGOTÁ S.C.
OTTO BARRIOS CALVIS

31 MAY 2000

168
167

Ciancio, A. 1995. Parasitismo dependiente de la densidad de *Xiphinema diversicaudatum* por *Pasteuria penetrans* en un campo natural infestado. *Fitopatología* 85: 144-149.

Culbreath A.K., Rodríguez-Kábana, R., y Morgan-Jones, G. (1985) El uso de material de desperdicio hemicelulósico para la reducción de los efectos fitotóxicos de la quitina y el control de los nemátodos de nudo en la raíz. *Nematropica* 15, 49-75.

Glick, B.R. y Bashan, Y. 1997. Manipulación genética de las bacterias promotoras del crecimiento de la planta para incrementar el biocontrol de los fitopatógenos. *Biotechnology Advances* 15, 353-378.

Godoy, G., Rodríguez-Kábana, R., Shelby, R. A y Morgan-Jones, G. (1983) Modificaciones de la Quitina para el control de *Meloidogyne arenaria* en suelos infestados. II. Efectos sobre la población microbiana. *Nematropica* 13, 63-74.

Hallmann, J., Rodríguez-Kábana, R., y Kloepper, J.W. 1998. Cambios mediados con quitina en comunidades bacterianas del suelo, rizósferas y dentro de las raíces del algodón con respecto al control del nemátodo. *Soil Biology and Biochemistry*. En edición

Hallmann, J., Rodríguez-Kábana, R., y Kloepper, J.W. 1997. Interacciones de nemátodos con bacterias endofíticas. págs. 243-245 en: *Rizobacterias Promotoras del Crecimiento de la Planta – Estado Actual y Prospectos Futuros*. Eds. A. Ogoshi, K. Kobayashi, Y. Homma, F. Kodama, N. Kondo, y S. Akino. Publicaciones Nakanishi, Sapporo.

Inbar, J. Y Chet, I. (1991) Evidencia que la quitinasa producida por *Aeromonas caviae* está involucrada en el control biológico de patógenos de la

RECIBIDA 16
CIRCULO DE SANTAFE DE BUENOS AIRES
OTROS BARRIOS CAYMA
31 MAY 2000
CECILIA GARCIA DE GONZALEZ
TRADUCTORA OFICIAL
Resolución 1443 Minjusticia

169
168

planta propios del suelo causados por esta bacteria. *Soil Biology and Biochemistry*. 23, 973-978

Kerry, B.R. (1982) El declive de poblaciones de *Heterodera avenae*. Boletín de la Organización Europea de Protección a las Plantas 12, 491-496.

Kloepper, J.W. 1993. Rizobacterias promotoras del crecimiento de la planta como agentes de control biológico. En 'Ecología Microbiana del Suelo - Aplicaciones en Agricultura y Manejo Ambiental,' ed. F.B. Metting, Jr., págs. 255-274 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York).

Kloepper, J.W., Rodríguez-Kábana, R., McInroy, J.A. y Young, R.W. 1992. Bacterias rizósferas antagónicas al quiste de soja (*Heterodera glycines*) y nemátodos de nudo en la raíz (*Melodogyne incognita*): Identificación por análisis de ácidos grasos y frecuencia de la actividad de control biológico. Plantas y Suelos 139; 75-84.

Kluepfer, D.A., McInnis, T.M. y Zehr, E.I. (1993). Bacterias involucradas en la colonización de raíces en cultivos de durazno en suelos con supresión del nemátodo *Criconebella xenoplax*. *Fitopatología* 83, 1240-1245.

Kokalis-Burelle, N., Rodríguez-Kábana, R., Weaver, D.V. y King, P.S. (1994). Evaluación de la corteza polvosa de pino para el control de *Meloidogyne arenaria* y *Heterodera glycines* en la soja. *Plantas y Suelos* 162, 163-168.

Kokalis-Burelle, N., Rodríguez-Kábana, R., Robertson, D.G., Mahaffee, W.F., Kloepper, J.W. y Bowen, K.L. (1995) Efectos de rotaciones de pastos de forraje en ecología microbiana del suelo y poblaciones de nemátodos. *Fitopatología* 85, 1124.

Kuc, J. 1982. Inmunidad inducida a enfermedades de las plantas. *Biociencia* 32:854-60-

NOTARIA 13
CIRCULO DE SANTO DOMINGO
OTTO BARRIOS GARCIA
31 MAY 2000
ESTA FOTOCOPIA COINCIDE EN TODO CON EL ORIGINAL QUE TUVE A DISPOSICION

CECILIA GARCIA DE GONZALEZ
TRADUCTORA OFICIAL
Resolución 1443 Minjusticia

Liu, L., Kloepper, J.W., y Tuzun, S. 1995a. Inducción a la resistencia sistémica en el cohombro contra la mancha bacteriana de la hoja angular por rizobacterias promotoras del crecimiento de la planta. *Fitopatología* 85:843-847.

Liu, L., Kloepper, J.W., y Tuzun, S. 1995b. Inducción a la resistencia sistémica en el cohombro por rizobacterias promotoras del crecimiento de la planta; duración de la protección y efecto de la resistencia del huésped en protección y colonización de la raíz. *Fitopatología* 85:1064-1068.

Liu, L., Kloepper, J.W., y Tuzun, S. 1995c. Inducción a la resistencia sistémica en el cohombro contra el marchitamiento por *Fusarium* debido a rizobacterias promotoras del crecimiento de la planta. *Fitopatología* 85:695-698.

Mankau, R. Y Das, S. (1969) La influencia de las modificaciones de quitina en *Meloidogyne incognita*. *Diario de Nematología* 1, 15-16.

Martínez-Ochoa, N., Kloepper, J.W., Rodríguez-Kábana, R., y Ji, P. 1997. Resistencia inducida y características fenotípicas de varias PGPR comparadas a la actividad de biocontrol contra el nemátodo de nudo en la raíz *Meloidogyne incognita*, págs. 296-300 en: *Rizobacterias Promotoras del Crecimiento de las Plantas – Estado Actual y Prospectos Futuros*. Eds. A. Ogoshi, K. Kobayashi, Y. Homma, F. Kodama, N. Kondo, y S. Akino. Nakanishi Publishing, Sapporo.

Mercer, D.V., Greenwood, D.R. y Grant, J.L. (1992) Efecto de las quitinasas microbianas y de la planta en los huevos y juveniles de *Meloidogyne hapla* Chitwood. *Nematologica* 8, 227-236.

Mian, I.H., Godoy, G., Shelby, R.A., Rodríguez-Kábana, R. Y Morgan-Jones, G. (1982) Modificaciones con quitina para el control de *Meloidogyne arenaria* en suelos infestados. *Nematropica* 12, 71-84.

NOTARIA 16
CIRCULO DE SANTA FE DE BOGOTÁ
OTTO BARRIOS GALVIS
31 MAY 2000
ESTA FOTOCOPIA CUMPLE CON LA LEY
CON EL ORIGINAL QUE LA FUE

Cel

CECILIA GARCIA DE GONZALEZ

TRADUCTORA OFICIAL

Resolución 1443 Minjusticia

171
170

Mitchell, R. Y Alexander. M. (1962) Procesos microbiológicos asociados con el uso de la quitina para el control biológico. *Sociedad Americana de Ciencias del Suelo, Procedimientos* 26, 556-558.

Oka, Y., Chet, I., y Spiegel, Y. 1993. Control del nemátodo del nudo en la raíz *Meloidogyne javanica* por *Bacillus cereus*. *Ciencia y Tecnología de Biocontrol* 3:115-126.

Ordentlich, A., Elad, Y., y Chet, I. (1988) El papel de la quitinasa de *Serratia marcescens* en el biocontrol de *Sclerotium rolfsii*. *Fitopatología* 78, 84-88.

Press, C.M., Wilson, M., Tuzun, S., Kloepper, J.W. 1997. Acido salicílico producido por *Serratia marcescens* 90-166 no es el determinante primario de la resistencia sistémica inducida en el cohombro o tabaco. *Molec. Interacciones de Plantas-Microbios* 10:761-768.

Raupach, G.S., Liu, L., Murphy, J.F., Tuzun, S., y Kloepper, J.W. 1996. Resistencia sistémica inducida en el cohombro y tomate contra el cucumovirus mosaico del cohombro utilizando rizobacterias promotoras del crecimiento de la planta (PGPR). *Plant Dis.* 80:891-894.

Punja, Z.K. y Zhang, Y.Y. (1993) Quitinasas de la planta y su papel en la resistencia a las enfermedades fungosas. *Diario de Nematología* 25, 526-540.

Roberts. C.A., Marek, S.M., Niblack, T.L. y Karr, A.L. (1992) *Meloidogyne* parasitario y *Acremonium* mutualístico aumentan la quitinasa en pastos altos fescue. *Diario de Ecología Química* 18, 1107-1116.

Rodríguez-Kábana, R., Godoy, G., Morgan-Jones, G. y Shelby, R.A. (1983) La determinación de las actividades de quitinasa en el suelo: Condiciones para ensayos y estudios ecológicos. *Plantas y Suelos* 75, 95-106.

NOTARIA 16
CIRCULO DE SANTAFE DE ROSA D.C.
OTTO BARRIOSCA VIS

31 MAY 2000

CECILIA GARCÍA DE GONZÁLEZ

TRADUCTORA OFICIAL

Resolución 1443 Minjusticia

171
121

Rodríguez-Kábana, R., Kloepper, J.W., Weaver, D.F. y Robertson, D.G. (1993) Control de nemátodos parasitarios de las plantas con furfural – un pesticida de ocurrencia natural. *Nematropica* 23:63-73.

Rodríguez-Kábana, y Morgan-Jones, G. (1987) Control biológico de nemátodos: Modificaciones al suelo y antagonistas microbianos. *Plantas y Suelos* 100, 237-247.

Rodríguez-Kábana, R., Morgan-Jones, G. y Gintis, B.O. (1984) Efectos en el suelo de las modificaciones con quitina en *Heterodera glycines*, poblaciones microbianas, y colonización de quistes por hongos. *Nematropica* 14, 10-25.

Ross, A.F. 1961. Resistencia sistémica adquirida inducida por infección viral localizada en plantas. *Virología* 14:340-58.

Ryals, J. Neuenschwander, U.H., Willits, M.G., Molina, A., Steiner, H.Y., y otros 1996.. Resistencia sistémica adquirida. *Células de las Plantas* 8: 1809-19.

Sikora, R.A. 1988. Interrelación entre rizobacterias promotoras de la salud de la planta, los nemátodos parasitarios de la planta, y los microorganismos del suelo. *Fac. Med. Landouww. Rijksuniv. Gent* 53:867.878.

Soler-Serratosa, A., Kokalis-Burelle, Rodríguez-Kábana, R., Weaver, C.F. y King, P.S. 1996. Aleloquímicos para el control de nemátodos parasitarios de las plantas. 1. Eficacia en nemátodos *in vivo* del timol y combinaciones de timol/benzaldehído.

Soler-Serratosa, A., Rodríguez-Kábana, R., y Kloepper, J.W. 1994. Enriquecimiento selectivo de *Pseudomonas* spp en suelos tratados con timol para el control de nemátodos fitoparasitarios. En: M.H. Ryder, P.M. Stevens, y G.D. Bowen, eds. *Mejoramiento de la Productividad de la Planta con Rizobacterias*. CSIRO Press, Adelaida, Australia, pág. 198.

NOTARIA 16
CIRCULO DE SANTAFE DE BOGOTÁ D.C.
ARRIOS CALVIS
31 MAY 2000
ESTADO DE EXACTAMENTE
CECILIA GARCIA DE GONZALEZ
E. L. V. A. A. M. S. A.

Coel
CECILIA GARCIA DE GONZALEZ
TRADUCTORA OFICIAL
Resolución 1443 Minjusticia

173
122

Spiegel, Y., Cohn, E., y Chet, I. (1986) Uso de quitina para controlar nemátodos parasitarios de la planta. I. Efectos directos sobre la reproducción de nemátodos y desempeño de la planta. *Plantas y Suelos* 95, 87-95.

Sticher, L., Mauch-Mani, B., Métraux, J.P. 1997. Resistencia sistémica adquirida. *Rev. Anual Fitopatología* 35:235-70

Stirling, G.R. 1991a. Producción en masa y liberación de agentes biológicos de control. Capítulo 6 en: *Control Biológico de Nemátodos Parasitarios de la Planta-Progreso, Problemas y Prospectos*. CAB International, Wallingford, Oxon, Reino Unido.

Stirling, G.R. 1991b. Control biológico de ocurrencia natural. Capítulo 5 en: *Control Biológico de Nemátodos Parasitarios de la Planta-Progreso, Problemas y Prospectos*. CAB International, Wallingford, Oxon, UK.

Stirling, G.R., McKenry, M.V. y Mankau, R. (1979). Control Biológico de Nemátodos de Nudo en la Raíz (*Meloidogyne* spp) en el durazno. *Fitopatología* 69, 806-809.

Van Loon, L.C., 1997. Resistencia inducida en plantas y el papel de las proteínas relacionadas con la patogénesis. *Eur. J. Patología de las Plantas* 103:753-65.

Van Loon, L.C., Bakker, P.A.H.M., y Pieterse, C.M.J. 1998. Resistencia sistémica inducida por bacterias rizósferas. *Rev. Anual Fitopatología* 36:453-83.

Vargas, R., Rodríguez-Kábana, R. Y Kloepper, J.W. (1994) Estudio de ecología microbiana en un programa de rotación de cultivos con soja, frijol, y cultivos de invierno. *Fitopatología* 84, 1084.

Wei, G., Kloepper, J.W., y Tuzun, S. 1996. Resistencia sistémica inducida a enfermedades del cohombro e incremento del crecimiento de las plantas por

NOTARIA 16
CIRCULO DE SANTAFE DE ROSARIO
OTTO BARRIOS GALVIS
31 MAY 2000
ESTA FOTOCOPIA COINCIDE EXACTAMENTE
CON EL ORIGINAL QUE SE ENCUENTRA EN...

174
173

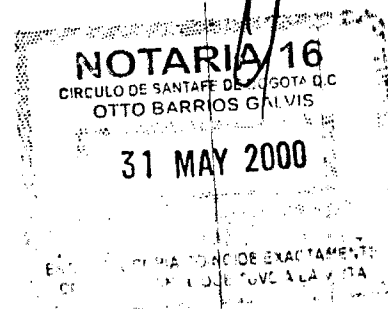
rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas bajo condiciones de campo. *Fitopatología* 86:221-224.

Yao, C.-B., Zehner, G.W., Sikora, E., Murphy, J., y Kloepper, J.W. 1997. Evaluación de la resistencia sistémica inducida y promoción de crecimiento de plantas de tomate con cepas seleccionadas PGPR. En 'Rizobacterias Promotoras del Crecimiento de la Planta – Estado Actual y Prospectos Futuros,' eds. A. Ogoshi, K. Kobayashi, Y. Homma, F. Kodama, N. Kondo, y S. Akino, págs. 285-288. (Nakanishi Printing, Sapporo).

Zehnder, G., Kloepper, J., Tuzun, S., Yao, C., Wei, G., Chambliss, O., y Shelby, R. 1997a. Alimentación de insectos del cohombro por mediación de resistencia de la planta inducida con rizobacterias. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 83:81-85.

Zehnder, G., Kloepper, J., Yao, C., y Wei, G. 1997b. Inducción a la resistencia sistémica en el cohombro contra escarabajos del cohombro (Coleópteros: Chrysomelidae) por medio de rizobacterias promotoras del crecimiento de la planta. *J. Econ. Entomol.* 90:391-396.


CECILIA GARCIA DE GONZALEZ
TRADUCTORA OFICIAL
Resolución 1443 Minjusticia



175
174

Se reivindica lo siguiente:

1. Una composición para afectar al menos uno de los siguientes crecimientos de la planta o impartir resistencia a las enfermedades que comprende al menos una rizobacteria promotora del crecimiento de la planta (PGPR) y una modificación orgánica efectiva y en cantidad suficiente para inducir la resistencia a las enfermedades de las plantas.
2. Una composición para afectar tanto el crecimiento de la planta e impartir resistencia a las enfermedades que comprende al menos una rizobacteria promotora del crecimiento de la planta (PGPR) y una modificación orgánica efectiva y en cantidad suficiente para inducir la resistencia a las enfermedades de las plantas.
3. Una composición para afectar al menos el crecimiento de la planta e impartir resistencia a las enfermedades que comprende al menos una rizobacteria promotora del crecimiento de la planta (PGPR) y una modificación orgánica efectiva y en cantidad suficiente para inducir la resistencia sistémica a las enfermedades de las plantas.
4. La composición de la reivindicación 3, en que las enfermedades de las plantas, causadas por patógenos de las plantas, comprenden al menos una de las siguientes enfermedades: bacteriana, fungosa, viral y por nemátodos.
5. La composición de la reivindicación 3, en que la modificación orgánica es un compuesto orgánico aminado natural o sintético.
6. La composición de la reivindicación 5, en que el compuesto aminado orgánico es seleccionado del grupo entre corteza de pino, harina de soja, harina de semilla de algodón, caseína, conchas de almeja, cáscara de camarón, quitina y quitosan.

NOTA 2000

ESTÁ FOTOCOPIADO EXACTAMENTE
CON EL ORIGINAL Y SE TIENE A LA VISTA

CECILIA GARCIA DE GONZALEZ
TRADUCTORA OFICIAL
Resolución 1443 Minjusticia

176
125

7. La composición de la reivindicación 3 en que al menos una de las PGPR no es quitinolítica.
8. La composición de la reclamación 7 donde al menos una de las PGPR es seleccionada de la familia de BACILLIACEAE.
9. La composición de la reivindicación 8, en que la BACILLIACEAE es seleccionada del género *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Brevibacillus*, *Virgibacillus*, *Alicyclobacillus* y *Aneurinibacillus*.
10. La composición de la reivindicación 9, en que las bacterias son seleccionadas entre: *Bacillus subtilis*, *Bacillus subtilis* cepa GB03, *Bacillus amyloliquefaciens* y *Bacillus amyloliquefaciens* cepa IN937a.
11. La composición de la reivindicación 8, en que la composición comprende al menos dos bacterias diferentes de la familia BACILLIACEAE.
12. La composición de la reivindicación 11, en que las bacterias son *Bacillus subtilis* cepa GB03 y *Bacillus amyloliquefaciens* cepa IN937a.
13. La composición de la reivindicación 7, en que al menos una de las PGPR comprende una seleccionada entre: bacterias colonizadoras de la raíz, hongos, almidones y actinomicetos.
14. La composición de la reivindicación 13, en que al menos una de las PGPR es una bacteria colonizadora de la raíz seleccionada de una suedomónada fluorescente y aislada de *Pseudomonas* spp., *Serratia* spp., *Corynebacterium* spp., *Enterobacter* spp., *Arthrobacter* spp., y *Burkholderia* spp.
15. La composición de la reivindicación 13, en que al menos una de las PGPR es un hongo seleccionado del *Trichoderma* spp. y *Glioladium* spp.
16. La composición de la reivindicación 3, en que al menos una de las PGPR es quitinolítica.

ESTADO DE GUATEMALA
CONSEJO DE EXACTAMENTE
QUE FUE A LA VISTA
MAY 2000

177
176

17. La composición de la reivindicación 3, en que al menos una de las PGPR es una bacteria formadora de esporas.
18. La composición de la reivindicación 3, en que al menos una de las PGPR es una bacteria que no forma esporas.
19. La composición de la reivindicación 3, en que además la composición comprende al menos un ingrediente no esencial, que no va en detrimento de la función de las PGPR o de la modificación orgánica.
20. La composición de la reivindicación 19, en que el ingrediente no esencial comprende al menos un compuesto de aromáticas botánicas.
21. La composición de la reivindicación 20, en que el compuesto de aromáticas botánicas es seleccionado del grupo de benzaldehído, citral, timol, furfural, mentol y alfa-terpineol.
22. La composición de la reivindicación 3, que es un líquido, polvo o sólido.
23. La composición de la reivindicación 3, que se encuentra en un medio sin tierra.
24. Un método para afectar al menos el crecimiento de la planta o que imparte a las plantas o semillas resistencia a las enfermedades y comprende los pasos de tratamiento de una semilla o plántula de una planta objetivo con una composición que comprende al menos una rizobacteria promotora del crecimiento de la planta (PGPR) y una modificación orgánica efectiva en una cantidad suficiente para inducir resistencia a las enfermedades de las plantas, y el cultivo de la semilla o plántula tratada.
25. Un método para afectar al menos el crecimiento de la planta e impartir a las plantas o semillas resistencia a las enfermedades y comprende los pasos de tratamiento de una semilla o plántula de una planta objetivo con una composición que comprende al menos una rizobacteria promotora del

NOTARIA
31 MAY 2000

178
127

crecimiento de la planta (PGPR) y una modificación orgánica efectiva en una cantidad suficiente para inducir resistencia a las enfermedades de las plantas, y el cultivo de la semilla o plántula tratada.

26. Un método para afectar al menos el crecimiento de la planta e impartir a las plantas o semillas resistencia a las enfermedades y comprende los pasos de tratamiento de una semilla o plántula de una planta objetivo con una composición que comprende al menos una rizobacteria promotora del crecimiento de la planta (PGPR) y una modificación orgánica efectiva en una cantidad suficiente para inducir resistencia sistémica a las enfermedades de las plantas, y el cultivo de la semilla o plántula tratada.
27. El método de la reivindicación 26, en que el método comprende además la recolección de una semilla o plántula tratada.
28. El método de la reivindicación 26, en que el método comprende además el trasplante de una semilla o plántula tratada al menos una vez.
29. El método de la reivindicación 26, en que el método comprende además plantar en tierra una semilla o plántula tratada.
30. El método de la reivindicación 26, en que la composición se encuentra en un contenedor recolectable.
31. El método de la reivindicación 26, en que el tratamiento consiste en exponer la semilla o plántula tratada a la composición por medio de fumigación foliar, tratamiento por empape, goteo o irrigación.
32. El método de la reivindicación 31, en que el método comprende la repetición de la exposición.

CECILIA GARCIA DE GONZALEZ
TRADUCTORA OFICIAL
Resolución 1443 Minjusticia

179
178

33. El método de la reivindicación 26, en que el tratamiento consiste en exponer la semilla o plántula no tratada a la composición por medio de fumigación foliar, tratamiento por empape, goteo o irrigación.
34. El método de la reivindicación 26, en que el tratamiento consiste además en recubrir la semilla no tratada con la composición que comprende al menos una rizobacteria promotora del crecimiento de la planta (PGPR) y una modificación orgánica efectiva y en cantidad suficiente para inducir resistencia a las enfermedades de las plantas, exponiendo la semilla no tratada a la composición.
35. Una semilla, plántula o planta tratada con una composición, afectando al menos uno de los siguientes: el crecimiento de las plantas o impartir resistencia a las enfermedades de plantas o semillas, que comprende al menos una rizobacteria promotora del crecimiento de las plantas (PGPR) y una modificación orgánica efectiva y en cantidad suficiente para inducir resistencia de la planta a las enfermedades.
36. Una semilla, plántula o planta tratada con una composición, afectando tanto el crecimiento de las plantas e impartiendo resistencia a las enfermedades de plantas o semillas, que comprende al menos una rizobacteria promotora del crecimiento de las plantas (PGPR) y una modificación orgánica efectiva y en cantidad suficiente para inducir resistencia de la planta a las enfermedades.
37. Una semilla, plántula o planta tratada con una composición, afectando al menos el crecimiento de las plantas e impartiendo resistencia a las enfermedades de plantas o semillas, que comprende al menos una rizobacteria promotora del crecimiento de las plantas (PGPR) y una modificación orgánica

SECRETARIA
CIRCULO DE SECRETARIA DE BUREAU
OTTO GARCIA GONZALEZ
31 MAY 2003

ESTADO DE COPIAS
DE EXACTAMENTE
E FUE A LA VISTA
FOLIO 179

180
179

efectiva y en cantidad suficiente para inducir resistencia sistémica de la planta a las enfermedades.

38. La semilla, plántula o plantas de la reivindicación 37 en que las enfermedades de las plantas, causadas por patógenos de plantas, comprende al menos una de las siguientes: enfermedades bacterianas, fungosas, virales o por nemátodos.
39. La plántula o planta tratada de la reivindicación 37, tratada con la composición por inmersión, fumigación, empolvada, empape, goteo o irrigación.
40. La semilla, plántula o planta de la reivindicación 37, en que la semilla, plántula y planta son seleccionadas del grupo de especies de plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas.
41. La semilla, plántula o planta de la reivindicación 37, en que la modificación orgánica consta de un compuesto orgánico aminado natural o sintético.
42. La semilla, plántula o planta de la reivindicación 41, en que el compuesto orgánico aminado es seleccionado entre el grupo de corteza de pino, harina de soja, harina de semilla de algodón, caseína, conchas de almejas, cáscaras de camarones, quitina y quitosan.
43. La semilla, plántula o planta de la reivindicación 41, en que el compuesto comprende un orgánico aminado sintético.
44. La semilla, plántula o planta de la reivindicación 37, en que el compuesto comprende además al menos un ingrediente no esencial, el cual no va en detrimento de la función de las PGPR o la modificación orgánica.
45. La semilla, plántula o planta de la reivindicación 44, en que el ingrediente no esencial comprende al menos un compuesto de aromáticas botánicas.

NOTARIA 15
EL AGOSTO 2
NOS GALVIS
31 MAY 2000
ESTIMADO COINCIDE EXACTAMENTE
CON EL ORIGINAL QUE TUVE A LA VISTA


CECILIA GARCIA DE GONZALEZ
TRADUCTORA OFICIAL
Resolución 1443 Minjusticia

181
180

46. La semilla, plántula o planta de la reivindicación 45, en que el compuesto de aromáticas botánicas es seleccionado entre el grupo de benzaldehidos, citral, timol, furfural, mentol y alfa-terpineol.
47. La semilla recubierta de la reivindicación 37.
48. La semilla recubierta de la reivindicación 47, en que las enfermedades de la planta son causadas por patógenos de plantas, comprendiendo al menos una de las siguientes: enfermedades bacterianas, fungosas, virales y por nemátodos.
49. La semilla recubierta de la reivindicación 47, en que la semilla es seleccionada del grupo de especies de plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas.
50. La semilla recubierta de la reivindicación 47, en que la modificación orgánica es un compuesto orgánico aminado natural o sintético.
51. La semilla recubierta de la reivindicación 47, en que la composición comprende además al menos un ingrediente no esencial, que no va en detrimento de la función de las PGPR o de la modificación orgánica.
52. La semilla recubierta de la reivindicación 51, en que el ingrediente no esencial comprende al menos un compuesto de aromáticas botánicas.
53. La semilla recubierta de la reivindicación 52, en que el compuesto de aromáticas botánicas es seleccionado entre: benzaldehidos, citral, timol, furfural, mentol y alfa-terpineol.
54. La semilla recubierta de la reivindicación 47, sembrada en la tierra.
55. La semilla tratada de la reivindicación 37, tratada con la composición por inmersión, fumigación, empolvada, empape, goteo o irrigación de una semilla no tratada.

SECRETARIA 16
C. GARCIA DE GONZALEZ
51 MAY 2000
ESTADO DE GUAYMAS
SECRETARIA DE JUSTICIA
C. GARCIA DE GONZALEZ

182
131

RESUMEN

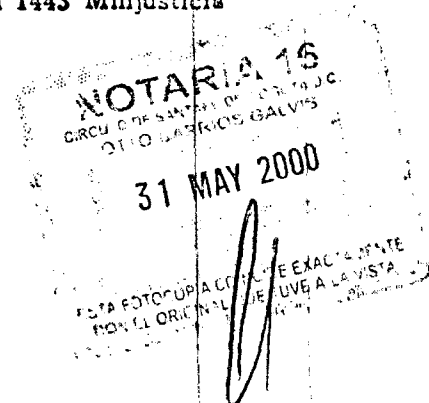
El invento acelera el crecimiento de todo tipo de plantas, a saber, tomate, cohombro, pimentón, tabaco, productos de horticultura, y otros, e incrementa la salud de la planta. El invento está diseñado para incrementar el índice de crecimiento de las plántulas en el suelo o en invernadero; y produce semillas con un recubrimiento que imparte resistencia a las enfermedades, por lo tanto reduciendo el tiempo requerido para producir trasplantes en plántulas de invernaderos antes de ser trasplantadas a los campos de agricultura; y desarrollar esquejes de trasplantes "supresores de enfermedades" que son protegidos por un tiempo de múltiples enfermedades a través de mecanismos combinados de defensa estimulada a la planta y actividad incrementada de microorganismos antagónicos nativos en las raíces de las plantas. Se proveen las composiciones y los métodos para su uso.

Cel

CECILIA GARCIA DE GONZALEZ

TRADUCTORA OFICIAL

Resolución 1443 Minjusticia



183
17.

**DECLARACION DE SOLICITUD DE PATENTE
PARA UTILIDAD O DISEÑO
(37 CFR 1.63)**

Declaración enviada con Presentación Inicial

Número de Registro del Abogado: 922.6739P

Inventor Nombrado Primero: Joseph W. Kloepper

Como el inventor nombrado primero, declaro lo siguiente.

Mi residencia, dirección postal y ciudadanía aparecen a continuación de mi nombre.

Soy el inventor original, primero y único (si sólo aparece un nombre a continuación) o un inventor conjunto primero y original (si es un número plural los nombres aparecen a continuación) de la materia en cuestión y para la cual se solicita una patente del invento intitulado:

**COMPOSICIONES BIOLOGICAS Y METODOS PARA INCREMENTAR EL
CRECIMIENTO Y LA SALUD DE LAS PLANTAS Y PRODUCIR PLANTAS
SUPRESORAS DE ENFERMEDADES.**

Las especificaciones de lo cual se encuentran aquí anexas.

Reivindico el beneficio bajo el Código 35 de los EE.UU. de cualquier solicitud provisional abajo enumerada:

Número de Solicitud: 60/139.850 Presentada el 18 de junio, 1999
60/122.311 Presentada el 1º de marzo, 1999

31 MAY 2000

CECILIA GARCIA DE GONZALEZ
TRADUCTORA OFICIAL
Resolución 1443 Minjusticia

157
133

Como inventor nombrado, por el presente nombro al siguiente profesional para proseguir con esta solicitud y transar todos los negocios ante la Oficina de Marcas Registradas y Patentes de los EE.UU.:

Número del Cliente: 22469

Dirigir toda correspondencia a: Número del Cliente o Código de la Barra: 22469

Nombre del Unico o Primer Inventor:

Nombre completo: Joseph W. Kloepper

Ciudad de Residencia: Auburn

Estado: Alabama

País: Estados Unidos

Ciudadanía: Estadounidense

Dirección Postal: 2608 Orchard Circle, Auburn, AL 36832, USA

Los inventores conjuntos adicionales aparecen en la hoja anexa PTO/SB/02A

Nombre del Inventor Conjunto Adicional:

Nombre completo: Rodrigo Rodríguez-Kábana

Ciudad de Residencia: Auburn

Estado: Alabama

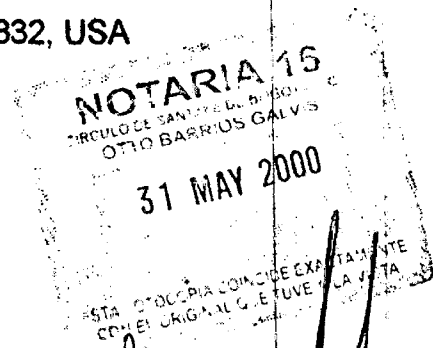
País: Estados Unidos

Dirección Postal: P.O. Box 334, Auburn, AL 36832, USA

Nombre del Inventor Conjunto Adicional:

Nombre completo: Donald S. Kenney

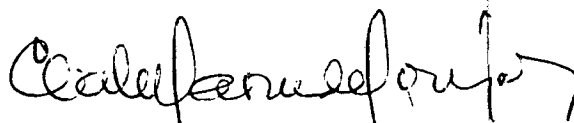
Ciudad de Residencia: Denton



185
184

Estado: Texas
País: Estados Unidos
Ciudadanía: Estadounidense
Dirección Postal: 3801 Lariat Road, Denton, TX 76207, USA

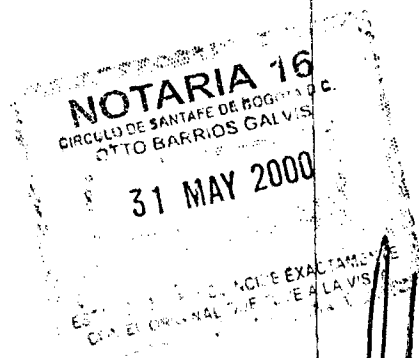
Esta traducción del inglés al español ha sido preparada por Cecilia García de González, traductora oficial, Resolución No. 1443 de fecha 14 de abril de 1983, expedida por el Ministerio de Justicia.



CÉCILIA GARCÍA DE GONZÁLEZ

TRADUCTORA OFICIAL

Resolución 1443 Minjusticia



14 ABR 1983

Por la cual se expide una licencia para ejercer funciones de traductor e intérprete oficial.

EL MINISTRO DE JUSTICIA,
En ejercicio de la atribución que le confiere el
Decreto 576 de 1974 y 382, 2257 de 1951, y

CONSIDERANDO:

Se CECILIA GARCIA DE GONZALEZ, identificada con la cédula de ciudadanía No. 20-334.135 de Bogotá, solicita a este Ministerio Licencia para ejercer funciones de traductor e intérprete oficial, de acuerdo a los decretos 382, 2257 de 1951;

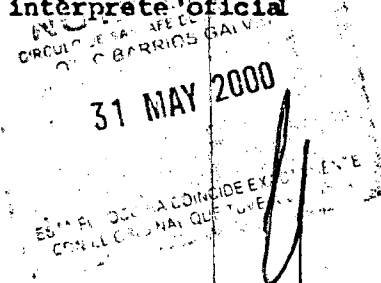
Que para comprobar el cumplimiento de los requisitos exigidos, la peticionaria adjunta los siguientes documentos:

- a) Certificado expedido por el Jefe de la División de Negocios Generales del Ministerio de Educación Nacional, acreditando su idoneidad como traductora e intérprete Oficial de los idiomas INGLES-ESPAÑOL ESPAÑOL-INGLES;
- b) Certificado judicial registrado bajo el T.D.2422804, expedido por el Departamento Administrativo de Seguridad, en donde consta no tener antecedentes penales ni de policía;
- c) Registro Civil de nacimiento, expedido por el Notario 3º del Círculo Notarial de Barranquilla, en donde se acredita la mayoría de edad;
- d) Tres declaraciones extrajudicio rendidas ante el Juez 1º Civil Municipal de Suba, con anuencia del Ministerio Público, sobre idoneidad y buena conducta;

Que acreditados los anteriores requisitos y de conformidad a los Decretos 382 y 2257 de 1951 y 576 de 1974, corresponde al Ministerio de Justicia expedir a la peticionaria licencia habilitándola para desempeñar el cargo de traductora e intérprete oficial en los idiomas Inglés-Español Español-Inglés,

RESUELVE:

ARTICULO PRIMERO.- Expídase licencia a CECILIA GARCIA DE GONZALEZ, para desempeñar



1443

Por la cual se expide una licencia para ejercer funciones de traductor e intérprete oficial.

En cargo de traductora e intérprete oficial en los idiomas ESPAÑOL-INGLES, INGLES-ESPAÑOL, previa inscripción de su nombre ante el Tribunal Superior del Distrito Judicial correspondiente al territorio donde vaya a actuar.

ARTICULO SEGUNDO.- Comuníquese el texto de la presente resolución a la Subsecretaría de Asuntos Administrativos del Ministerio de Relaciones Exteriores.

ARTICULO TERCERO.- La presente resolución rige a partir de la fecha de su expedición.

COMUNIQUESE Y CUMPLASE
Dada en Bogotá, D.E., a

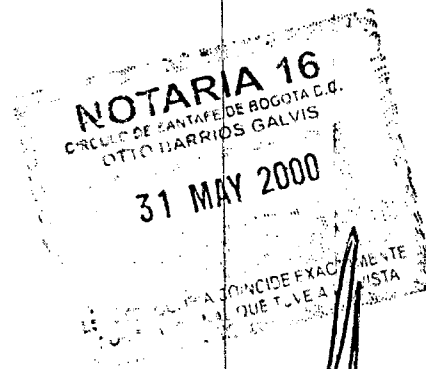
14 ABR 1983

(Original) Bernardo Gaitan Mahecha
Firmado Ministro de Justicia

BERNARDO GAITAN MAHECHA

EL SECRETARIO GENERAL,

Fidelia Villamizar de Perez
FIDELIA VILLAMIZAR DE PEREZ





AA- 8596140

707
188
137

EL SUSCRITO SECRETARIO DEL H. TRIBUNAL SUPERIOR DEL DISTRITO JUDICIAL DE BOGOTA, D. E. COMPULSA A CONTINUACION LA SIGUIENTE COPIA:

" ACUERDO Nº 193 DE 26 DE ABRIL DE M 1983.-

DILIGENCIA DE POSESION DE LA SEÑORA CECILIA GARCIA DE GONZALEZ, COMO TRADUCTORA E INTERPRETE OFICIAL DE LOS IDIOMAS INGLES-ESPAÑOL; ESPAÑOL-INGLES.- en Bogotá, a los 26 días del mes de Abril de 1983 se presentó ante el H. Tribunal Superior de este Despacho la Señora CECILIA GARCIA DE GONZALEZ portadora de la cédula de ciudadanía número 20.334.135 de Bogotá, con el fin de tomar posesión del cargo de Traductora e Interprete Oficial, para lo cual fué admitida en Resolución Nº 1443 del 14 de Abril de 1983, expedida por el Ministerio de Justicia.- Para tal efecto, el Señor Presidente del H. Tribunal Superior de este Distrito Dr. RAFAEL SUAREZ POVEDA le recibió el juramento de rigor, por el cual prometió cumplir a cabalidad los deberes que le impone su cargo.- Para constancia se firma por quienes en la diligencia intervinieron haciendo constar que la copia que se expide al interesado le acredita su calidad de Traductor e Interprete Oficial.- El Presidente, (Fdp.) Firma Ilegible. Hay selló.- El Posesionado, (Fdo.) Firma Ilegible.- El Secretario, (Fdo.) Firma Ilegible. (Hay sello "")-

ES FIEL COPIA.-

BOGOTA, D. E. Junio 15 DE 1987.-

P./ El Secretario,

NOTARIA 18
C. GILBERTO SANTO
OTTO BARRON

31 MAY 2006

ARGO ANTONIO CARDEZO ESPINEL

189
188

REGISTRARIA NACIONAL
Radicación: 00014742
Fecha: 2000-05-15 10:03:54
Título: 002 PATENTES D 1 REGISTRO/ 457 SOLICITUD
Dependencia: 2320 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

Señores
Superintendencia de Industria y Comercio
División de Nuevas Creaciones
E. S. D.

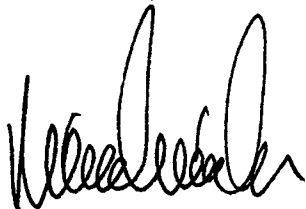
Ref: Expediente No. 000-14.742

**Solicitud de Patente de Invención denominada
"Compuestos Biológicos y Métodos para Mejorar el
Crecimiento y Salud de las Plantas y para Producir
Plantas que Supriman las Enfermedades"**

**Solicitantes: 1. Auburn University
2. Gustafson, LLC.**

Darío Cárdenas Navas, identificado como aparece al pie de mi firma, en mi condición de apoderado de las sociedades **Auburn University** y **Gustafson, LLC**, solicitantes de la Patente en referencia, me permito solicitar *prórroga* del término concedido mediante Auto No. 0597 notificado por estado el 4 de Mayo de 2.000. Para tal efecto adjunto el recibo oficial de caja No. 7,761 por valor de \$50.000.00 por concepto de gastos administrativos de la prórroga.

Atentamente,



Darío Cárdenas Navas
C.C. 17.066.629 de Bogotá
T. P. 1.250 de Minjusticia



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

1402
189

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 00017004

Designación : 0001-742 00000002

Fecha (AMD) : 2000-03-16 15:05:54

Folios: 2

Trámite : 001 PATENTES 2 1 REGISTRO/ 467 SOLICITUD

Dependencia: 0000 DIVISION DE MARCAS COMERCIALES

RECIBO OFICIAL DE PAGA : 7,761
FECHA : FEBRERO 2 DE 2000

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	Nº. PAGO	VAL. PAGO	
CARDENAS L. CARDENAS ABOGADO	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	BOGOTA	050-00024-9	514812	2,632,000.00

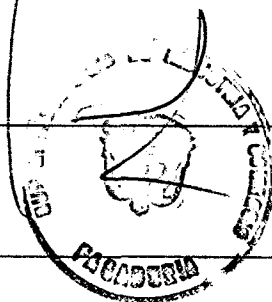
***** CONCEPTO *****

CANT.	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-08 PRORROGA DE TERMINOS	50,000.00
31	PRORROGA DE TERMINOS	50,000.00
TOTAL :		\$ 50,000.00

SON: CINCUENTA MIL PESOS

RECIBIÓ EN :

RECIBO DE PAGA APLICADO AL EXPEDIENTE No.



000-14.742

Carrera 13 No. 27-00 Pisos 5 y 10
Conmutador: 334 12 21
Fax: 281 31 25
Santa Fe de Bogotá, D.C., Colombia