SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 12-144300- -00000-0000
Fecha: 2012-08-24 16:34:38 Dep: 2020 DIR.NUEVASCR
Tra: 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act: 411 PRESENTACION Folios: 4

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL
DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES

SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCIÓN

TITULO: CEPA BACTERIANA AISLADA DEL GÉNERO BURKHOLDERIA Y METABOLITOS PESTICIDAS DEL MISMO.

SOLICITANTE: MARRONE BIO INNOVATIONS, INC.

DIRECCIÓN: 2121 Second Street Suite 107b, Davis, CA 95618, Estados Unidos de América.

APODERADO: CARLOS R. OLARTE

BOGOTÁ 24 de Agosto de 2012

P2012/000106

OLARTEMOURE

OLARTE MOURE & ASO

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 12-144300- -00000-0000
Fecha: 2012-08-24 16:34:38 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve. 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 4

PETITORIO - FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD
PATENTE PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL **P2012/000106**

SOLICITUD DE:

(1)

[X] Patente de Invención. [ ] Patente de Modelo de Utilidad.

[X] Capítulo I. [ ] Capítulo II.

(2)

SOLICITANTE (71)

Nombre: **MARRONE BIO INNOVATIONS, INC.**

Dirección: 2121 Second Street Suite 107B, Davis, CA 95618, Estados Unidos de América.

Nacionalidad o Domicilio: Estadounidense
Lugar de Constitución: Estados Unidos de América.

Teléfono: _____ **Fax:** _____
E-mail: _____

IDENTIFICACIÓN
C.C. [ ] **NIT** [ ]
C.E. [ ] **Otro** [ ]
Cual _____
Número _____

REPRESENTANTE O APODERADO

Nombre: CARLOS R. OLARTE

Dirección: Carrera 5 No. 34-03 Bogotá

Teléfono: 601-7700 **Fax:** 601-7799
E-mail: office@olartemoure.com

IDENTIFICACIÓN
C.C. [x] **NIT** [ ]
C.E. [ ] **Otro** [ ]
Cual _____
Número 79.782.747Bta
TP 74.295

INVENTOR (ES) (72)

Nombre: VER PAGINA ADJUNTA.

Dirección: VER PAGINA ADJUNTA

Nacionalidad o Domicilio: VER PAGINA ADJUNTA.

(5) **PCT (86)**

Solicitud Internacional No. PCT/US2011/026016 Fecha Febrero 24, 2011

Publicación Internacional No. WO 2011/106491 Fecha Septiembre 1, 2011

(6) **Título (54)** **CEPA BACTERIANA AISLADA DEL GÉNERO BURKHOLDERIA Y METABOLITOS PESTICIDAS DEL MISMO.**

Clasificación Internacional (51) C12N 1/20; A01N 63/02; A01N 43/74; A01N 43/14; A01P 7/00.

Prioridad **SI** [X] **NO** [ ]

(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
US	Febrero 25, 2010	61/308,287
US	Octubre 25, 2010	61/406,541

(9) **Comprobante de pago No.** 12- _____ **Fecha** _____

(10) **ANEXOS**

- [x] Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- [x] Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- [x] Poderes, si fuere el caso.
- [ ] Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- [ ] Declaraciones. Declaración bajo la Regla 4.17 (ii) del PCT.
- [x] Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).
- [x] Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).
- [ ] Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).
- [ ] Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.
- [ ] De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- [ ] De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- [ ] De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- [ ] Arte final 12 x 12.
- [ ] De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- [ ] De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- [x] Otros. Búsqueda Internacional

(11) **FIGURA CARACTERÍSTICA:**

(12) Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: CARLOS R. OLARTE FIRMA:

C.C. 79.782.747 Btá T.P. 74.295

LISTA DE INVENTORES

PCT/US2011/026016

Ratnakar ASOLKAR
4005 Cowell Blvd.,
Davis CA 95618,
Estados Unidos de América
Nacionalidad: India

Marja KOIVUNEN
1236 Evans Court
Davis CA 95618,
Estados Unidos de América
Nacionalidad: Finlandesa

Pamela MARRONE
3333 Victoria Place
Davis CA 95616,
Estados Unidos de América
Nacionalidad: Estadounidense

Huazhang HUANG
2674 Briscoe Place
Woodland CA 95776,
Estados Unidos de América
Nacionalidad: China

Ana Lucia CORDOVA-KREYLOS
18 Simmons Way,
Davis CA 95616,
Estados Unidos de América
Nacionalidad: Mexicana

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 12 - 0083972

Bogotá D.C., Agosto 15 de 2012 - 16:23:28

RECIBIDO DE : OLARTE MOURE & ASOCIADOS NI 830.122.870

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR.PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	493223360	15/08/2012	4.250.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCION	590.000.00	590.000.00
				$590.000.00

SON: **QUINIENTOS NOVENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____
****

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 12-144300- -00000-0000
Fecha: 2012-08-24 16:34:38 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 4

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 12-144300- -00000-0000
Fecha: 2012-08-24 16:34:38 Dep: 2020 DIR.NUEVASCR
Tra: 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act: 411 PRESENTACION Folios: 4

PATENTE DE INVENCIÓN ☐ MODELO DE

- ☐ Indicación que se solicita una patente.
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Descripción de la invención
- ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)

Completa ☐ Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCIÓN PCT ☑ MODELO DE UTILIDAD PCT ☐ Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

- ☑ Indicación que se solicita una PCT
- ☑ Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
- ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)

Completa ☐ Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐ (Art. 119 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita Diseño industrial
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐ Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐ (Art. 92 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita un esquema de trazado
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Representación gráfica de un esquema de trazado
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐ Incompleta ☐

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

PLANILLA DE RADICACIÓN - DIGITALIZACIÓN DIARIA
RELACIÓN DE ANEXOS

Dependencia:	Fecha: _____/ _____/ _____/ AAAA MM DD	Recorrido:

Tipo de Radicación: Entrada: ☐ Salida: ☐ Traslado: ☐ Convenio: ☐

Radicador:	Planilla:

ID	*No. Radicación*	*Consecutivo*	*Item*
1	12-144300-0		
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11			
12			
13			
14			
15			
16			
17			

Item	*Unidad de Conservación*
1	Bolsa
2	Caja
3	Libro
4	Sobre
5	Tomo
6	Otro
Item	*Soporte Documental*
7	CD
8	Disquete
9	DVD
10	Folleto
11	Foto
12	Periódico
13	Plano
14	Publicación Periódica
15	USB
10	Otro

Observaciones:

Anexan CD

CECBA - LEY404 GCBA
LEGALIZACION
120202 0560087
02/02/2012 12:22:32

CECBA - LEY404 GCBA
APOSTILLE
120202 1241128
02/02/2012 12:22:32

96.718

COLEGIO DE ESCRIBANOS · CIUDAD DE BUENOS AIRES · CAPITAL FEDERAL · REPUBLICA ARGENTINA

ACTUACION NOTARIAL
LEY 404

ISABEL MARTINEZ DIEGO
MATRICULA 4452
ESCRIBANA

N 014634245

FOLIO 41. PRIMERA COPIA. SUSTITUCION DE MANDATO.- DAGMAR MESSERER POR "MARRONE BIO INNOVATIONS, INC." A CARLOS REINALDO OLARTE Y OTRO.- ESCRITURA NUMERO DIECISIETE. En la Ciudad de Buenos Aires, Capital de la República Argentina, a dos de febrero del año dos mil doce, ante mi, escribana autorizante, comparece doña Dagmar MESSERER, soltera, mayor de edad, con documento nacional de identidad nº 20.383.892, vecina de esta Ciudad y de mi conocimiento, doy fe, así como que dice: Que SUSTITUYE a favor de los señores CARLOS REINALDO OLARTE y/o JUAN GUILLERMO MOURE PEREZ, para que lo ejerzan conjunta, separada e indistintamente, el mandato otorgado por "MARRONE BIO INNOVATIONS, INC." domiciliada en 2121 Second St. Suite 107B, Davis, CA 95618, Estados Unidos de América, transcripto por escritura nº 15 de fecha 1 de febrero de 2012, ante mi, al folio 35 de este mismo Registro, que en primera copia tengo a la vista, doy fe, y copiada dice: "FOLIO 35. PRIMERA COPIA. TRANSCRIPCION DE MANDATO.- "MARRONE BIO INNOVATIONS, INC." A GERARDO MESSERER Y OTROS. ESCRITURA QUINCE. En la Ciudad de Buenos Aires, Capital de la República Argentina, a primero de febrero del año dos mil doce, ante mi, escribana autorizante, comparece doña Dagmar MESSERER, soltera, mayor de edad, con documento nacional de identidad nº 20.383.892, vecina de esta Ciudad y de mi conocimiento, doy fe, así como que dice: Que para su TRANSCRIPCION en el protocolo de este Registro, me entrega un poder otorgado por MARRONE BIO INNOVATIONS, INC. do-

miciliada en 2121 Second St. Suite 107B, Davis, CA 95618, Estados Unidos de América, el que en su original con su correspondiente traducción y legalización, tengo a la vista, doy fe, y copiado dice: "PODER. Los abajo firmante/s Marrone Bio Innovations, Inc. domiciliados en 2121 Second St. Suite 107B, Davis, CA 95618, Estados Unidos de América, declaran por el presente otorgar a Gerardo MESSERER y/o Dagmar MESSERER y/o Karen MESSERER y/o MOELLER & CO. S.A. indistintamente poder general amplio y suficiente para recabar de las autoridades argentinas, sud y centroamericanas así como mexicanas que correspondan, la obtención de patentes de invención, el registro y la renovación de marcas y modelos y/o derechos de propiedad intelectual y/o nombres de dominio, a cuyo efecto los faculta/n para llevar a cabo ante dichas autoridades todas las gestiones necesarias al objeto indicado, presentar solicitudes, formular descripciones, oposiciones, protestos, declaraciones, apelaciones y reclamos, oblar impuestos, justificar explotaciones, solicitar testimonios, aceptar transferencias, recibir documentos y valores, percibir y hacer cuanto fuere necesario ante las autoridades administrativas de cualquier orden. Por otra parte, les confieren mandato para que en su nombre y representación puedan iniciar y proseguir cualquier juicio que actualmente los que suscriben tengan o en el futuro tuvieran en la República Argentina, en Sudamerica, Centroamérica y México, con motivo de su nombre, marcas de fábrica o de comercio, pa-

ISABEL MARTINEZ DIEGO
MATRICULA 4052
ESCRIBANA

N 014634246

tentes de invención y modelos y/o de sus derechos de propiedad intelectual que actualmente posean o adquieran en lo sucesivo, promover juicios de cualquier jurisdicción, criminales, correccionales, civiles o comerciales contra los falsificadores, usurpadores o imitadores y contra los tenedores de artículos que infrinjan su nombre, marcas o patentes de invención, seguir los juicios por oposición u otros en que fueran parte como actores o demandados, defender el nombre, las marcas, patentes y modelos y/o derechos de propiedad intelectual y/o nombres de dominio, haciendo las protestas del caso o diciendo de nulidad. Al efecto, podrán presentarse con escritos, querellas, pedidos, y lo que fuere necesario ante cualquier autoridad judicial, presentar testigos, documentos y demás justificativos, rendir pruebas de cualquier especie, pedir nombramientos de peritos, pedir y absolver posiciones, asistir a juicios verbales, declinar y prorrogar de jurisdicción, tachar, recusar, apelar, transar, someter a arbitraje o mediación, hacer renuncias, exigir y dar cauciones, pedir embargos preventivos, definitivos o inhibiciones y su levantamiento, pedir la venta de los bienes de los deudores, solicitar y obtener el cumplimiento de sentencias, prestar juramentos, decir de nulidad, desistir, percibir, otorgar recibos y en general practicar todos los actos y diligencias que sean precisos al desempeño de este mandato. Podrán asimismo sustituir el presente poder en todo o en parte. En relación a Brasil, este po-

der incluye recibir citaciones, intimaciones, notificaciones en dicho país conforme el articulo 217 de la Ley Brasilera 9279/96 y/o hacer substituciones a otros abogados / agentes brasileros con facultad para recibir dichas citaciones, intimaciones, notificaciones. Dado y firmado en Davis, CA on 16th day of November, 2011. Sigue una firma ilegible, Pamela Marrone, CEO and Founder, Marrone Bio Innovations, Inc." "TRADUCCIÓN PUBLICA. Consta PODER de Marrone Bio Innovations, Inc con dirección en 2121 Second St. Suite 107B, Davis, CA 95618, Estados Unidos de América. Pamela Marrone, Gerente General y fundadora, Marrone Bio Innovations, Inc. Firma ilegible. DOCUMENTO ADJUNTO. ESTADO DE CALIFORNIA. SECRETARIA DE ESTADO. APOSTILLA. (Convención de la Haya del 5 de Octubre 1961). 1. País. ESTADOS UNIDOS DE AMERICA. Este documento público: 2.- ha sido firmado por Laura Christensen. 3. en su carácter de Notario Público, Estado de California. 4. lleva el sello de Laura Christensen, Notario Publico, Estado de California. Certificado en: 5. Sacramento, California. 6. el 15 de Diciembre 2011. 7. por Secretario de Estado. Estado de California. 8. Nro. 33296. 9.- Sello. Hay un sello que lee El gran sello del Estado de California. 10.- Firma: Hay una firma ilegible. Esta Apostilla solo certifica la autenticidad de la firma y el cargo del funcionario público que ha firmado el documento público y, en caso de que corresponda, la identidad del sello o estampa que lleva el documento público. Esta Apostilla no certifica

N 014634247

la autenticidad del documento subyacente para el cual fue emitido. Esta Apostilla no es válida para uso en cualquier lugar de Estados Unidos de América, sus territorios o posesiones. Para verificar la emisión de esta Apostilla, remitirse a www.sos.ca.gov/business/notary/apostille-search/ DOCUMENTO ADJUNTO. ADMISIÓN. Estado De California. Condado de (en manuscrito) Yolo. El (en manuscrito) 16 de Noviembre 2011, ante mí, (en manuscrito) Laura Christensen, Notario Público. Compareció personalmente PAMELA MARRONE (en manuscrito), quien ha probado satisfactoriamente ante mí ser la persona cuyo nombre se suscribe con la pertinente evidencia y confirmó haber firmado en su capacidad autorizada y que a través de su firma en el instrumento la persona o la entidad en representación de quién ha actuado, ejecuto el documento. Certifico bajo pena de falso testimonio bajo las leyes del Estado de California que lo que antecede es verdadero y correcto. FIRMO Y ESTAMPO SELLO OFICIAL. Sello que lee Laura Christensen. Matricula 1880375, Notario Público, Condado de Yolo, Matricula vence 15 Marzo 2014. Firma ilegible. OCIONAL. Descripción del documento adjunto: PODER. Fecha del documento. 16 de Noviembre 2011. Número de páginas 1. Otros firmantes del mencionado arriba: Capacidad del firmante. Nombre del firmante Pamela Marrone. Gerente General. ES TRADUCCION FIEL DEL DOCUMENTO ADJUNTO QUE HE TENIDO ANTE MI, DEL IDIOMA INGLES AL CASTELLANO, Y AL CUAL ME REMITO A LOS 15 DIAS DEL MES DE DICIEMBRE DE DOS MIL ONCE. Sigue una

N 014634247

firma ilegible. Hay un sello que dice: PAOLA A. CORIGLIANO TRADUCTORA PUBLICA INGLES Mat. T° XV - F° 144 Cap. Fed. Inscrip. C.T.P.C.B.A. N° 5326. Sigue la legalización de la firma de la Traductora Paola Andrea Corigliano realizada por el Colegio de Traductores Públicos de la Ciudad de Buenos Aires. ES COPIA FIEL, doy fe. LEIDA que le es, así la otorga y firma ante mi, doy fe. Dagmar Messerer.- Hay un sello. Ante mí: I.Martinez Diego. Concuerda con su escritura matriz que pasó ante mi al folio 35 del Registro 2011 a mi cargo, doy fe. Para los apoderados expido la presente primera copia en tres sellos de actuación notarial números N 014634242 correlativos al presente, los que firmo y sello en el lugar y fecha de su otorgamiento. Está mi firma y sello." ES COPIA FIEL, doy fe, LEIDA que le es, así la otorga y firma ante mi, doy fe. DAGMAR MESSERER.- Hay un sello. Ante mí: I.MARTINEZ DIEGO. CONCUERDA con su escritura matriz que pasó ante mi al folio 41 del Registro 2011 a mi cargo, doy fe. PARA LOS APODERADOS expido la presente PRIMERA COPIA en tres sellos de actuación notarial números N 014634245 correlativos al presente, los que firmo y sello en el lugar y fecha de su otorgamiento. Sobre raspado: dos - Vale -

ISABEL MARTINEZ DIEGO
MATRICULA 4452
ESCRIBANA

COLEGIO DE ESCRIBANOS
CIUDAD DE BUENOS AIRES
CAPITAL FEDERAL - REPUBLICA ARGENTINA

LEGALIZACION
LEY 404

L 010629434

EL COLEGIO DE ESCRIBANOS de la Ciudad de Buenos Aires, Capital Federal de la República Argentina, en virtud de las facultades que le confiere la ley orgánica vigente, LEGALIZA la firma y sello del escribano ISABEL MARTINEZ DIEGO

obrantes en el documento anexo, presentado en el día de la fecha bajo el N° 120202056087/1 **La presente legalización no juzga sobre el contenido y forma del documento.**

COLEGIO DE ESCRIBANOS
LEGALIZACION
CIUDAD DE BUENOS AIRES
CAPITAL FEDERAL - REPUBLICA ARGENTINA

Buenos Aires, Jueves 2 de Febrero de 2012

ESC. LUZBELIA BILLORDO
COLEGIO DE ESCRIBANOS
CONSEJERA

SERIE A 0064617

CFNA

REPÚBLICA ARGENTINA

MINISTERIO *de* RELACIONES EXTERIORES COMERCIO INTERNACIONAL Y CULTO

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. País: REPÚBLICA ARGENTINA
   El presente documento público DE LEGALIZACIÓN
2. Ha sido firmado por LUZBELIA BILLORDO
3. Quien actúa en calidad de CONSEJERA
4. Lleva el sello/timbre del COLEGIO DE ESCRIBANOS DE LA CIUDAD DE BUENOS AIRES.
5. En LA CIUDAD DE BUENOS AIRES 6. El día 02/02/2012
7. Por EL COLEGIO DE ESCRIBANOS DE LA CIUDAD DE BUENOS AIRES MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES, COMERCIO INTERNACIONAL Y CULTO (Convenio 02/09/2003).
8. Bajo el Número: 120202124128
9. Sello/Timbre:

COLEGIO DE ESCRIBANOS - CAPITAL FEDERAL - REPÚBLICA ARGENTINA - APOSTILLA

10. Firma

Esc. NATALIA R. IAPALUCCI
COLEGIO DE ESCRIBANOS
CONSEJERA

CANCILLERIA ARGENTINA

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
1 September 2011 (01.09.2011)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2011/106491 A2

(51) International Patent Classification:
C12N 1/20 (2006.01) *A01N 43/14* (2006.01)
A01N 63/02 (2006.01) *A01P 7/00* (2006.01)
A01N 43/74 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/US2011/026016

(22) International Filing Date:
24 February 2011 (24.02.2011)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
61/308,287 25 February 2010 (25.02.2010) US
61/406,541 25 October 2010 (25.10.2010) US

(71) Applicant *(for all designated States except US)*: **MARRONE BIO INNOVATIONS, INC.** [US/US]; 2121 Second Street, Suite 107B, Davis, CA 95618 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants *(for US only)*: **ASOLKAR, Ratnakar** [IN/US]; 4005 Cowell Blvd, Davis, CA 95618 (US). **KOIVUNEN, Marja** [FI/US]; 1236 Evans Court, Davis, CA 95618 (US). **MARRONE, Pamela** [US/US]; 3333 Victoria Place, Davis, CA 95616 (US). **HUANG, Huazhang** [CN/US]; 2674 Briscoe Place, Woodland, CA 95776 (US). **CORDOVA-KREYLOS, Ana Lucia** [MX/US]; 18 Simmons Way, Davis, CA 95616 (US).

(74) Agent: **AGRIS, Cheryl, H.**; The Law Offices Of Cheryl H. Agris, Phd, PC, P.O. Box 8495, Pelham, NY 10803 (US).

(81) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of national protection available)*: AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

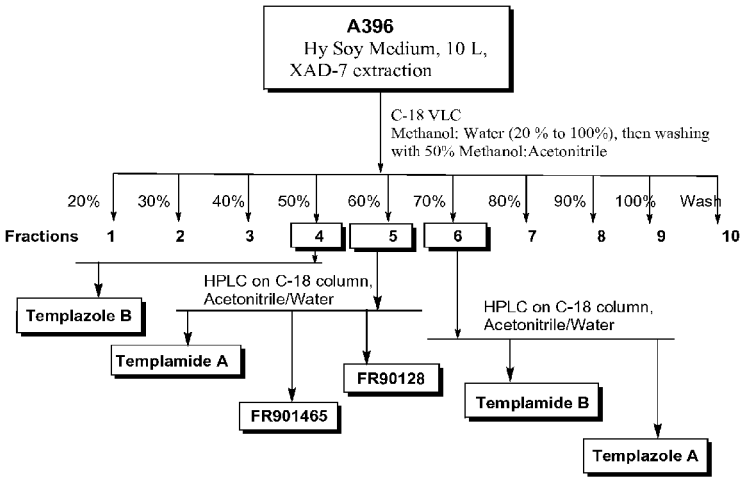
Declarations under Rule 4.17:

— *as to applicant's entitlement to apply for and be granted a patent (Rule 4.17(ii))*

[Continued on next page]

(54) Title: ISOLATED BACTERIAL STRAIN OF THE GENUS BURKHOLDERIA AND PESTICIDAL METABOLITES THEREFROM

Figure 7



(57) Abstract: A species of *Burkholderia sp* with no known pathogenicity to vertebrates but with pesticidal activity (e.g., plants, insects, fungi, weeds and nematodes) is provided. Also provided are natural products derived from a culture of said species and methods of controlling pests using said natural products.

WO 2011/106491 A2

— *as to the applicant's entitlement to claim the priority of the earlier application (Rule 4.17(iii))*

— *with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))*

Published:

— *without international search report and to be republished upon receipt of that report (Rule 48.2(g))*

ISOLATED BACTERIAL STRAIN OF THE GENUS *BURKHOLDERIA* AND PESTICIDAL METABOLITES THEREFROM

TECHNICAL FIELD

Provided herein is a species of *Burkholderia sp* with no known pathogenicity to vertebrates, such as mammals, fish and birds but pesticidal activity against plants, insects, fungi and nematodes. Also provided are natural products derived from a culture of said species and methods of controlling germination and growth of dicotyledenous, monocotyledonous and sedge weeds, modulating growth of fungi and controlling pests such as insects and nematodes using said natural products.

BACKGROUND

Natural products are substances produced by microbes, plants, and other organisms. Microbial natural products offer an abundant source of chemical diversity, and there is a long history of utilizing natural products for pharmaceutical purposes. One such compound is FR901228 isolated from *Chromobacterium* and has been found to be useful as an antibacterial agent and antitumor agent (see, for example, Ueda et al., US Patent No. 7,396,665).

However, secondary metabolites produced by microbes have also been successfully found to have uses for weed and pest control in agricultural applications (see, for example, Nakajima et al. 1991; Duke et al., 2000; Lydon & Duke, 1999; Gerwick et al., US Patent No. 7,393,812). Microbial natural products have been also successfully developed into agricultural insecticides (see, for example, Salama et al. 1981; Thompson et al., 2000; Krieg et al. 1983). Sometimes, such natural products have been combined with chemical pesticides (see, for example, Gottlieb, US Patent No. 4,808,207).

Burkholderia

The Burkholderia genus, β-subdivision of the proteobacteria, comprises more than 40 species that inhabit diverse ecological niches (Compant et al., 2008). The bacterial species in the genus *Burkholderia* are ubiquitous organisms in soil and rhizosphere (Coenye and Vandamme, 2003; Parke and Gurian-Sherman, 2001). Traditionally, they have been known as plant pathogens, *B. cepacia* being the first one discovered and identified as the pathogen causing disease in onions (Burkholder, 1950). Several *Burkholderia* species have developed beneficial interactions with their plant hosts (see, for example, Cabballero-Mellado et al., 2004, Chen et al., 2007). Some *Burkholderia* species have also been found to be opportunistic human pathogens (see, for example, Cheng and Currie, 2005 and Nierman et al., 2004). Additionally, some *Burkholderia* species have been found to have

potential as biocontrol products (see for example, Burkhead et al., 1994; Knudsen et al., 1987; Jansiewicz et al., 1988; Gouge et al., US Patent Application No. 2003/0082147; Parke et al., US Patent No. 6,077,505; Casida et al., US Patent No. 6,689,357; Jeddeloh et al., WO2001055398; Zhang et al., US Patent No. 7,141,407). Some species of in this genus have been effective in bioremediation to decontaminate polluted soil or groundwater (see, for example, Leahy et al. 1996). Further, some *Burkholderia* species have been found to secrete a variety of extracellular enzymes with proteolytic, lipolytic and hemolytic activities, as well as toxins, antibiotics, and siderophores (see, for example, Ludovic et al., 2007; Nagamatsu, 2001).

Oxazoles, Thiazoles and Indoles

Oxazoles, thiazoles and indoles are widely distributed in plants, algae, sponges, and microorganisms. A large number of natural products contain one or more of the five-membered oxazole, thiazole and indole nucleus/moieties. These natural products exhibit a broad spectrum of biological activity of demonstrable therapeutic value. For example, bleomycin A (Tomohisa et al.), a widely prescribed anticancer drug, effects the oxidative degradation of DNA and uses a bithiazole moiety to bind its target DNA sequences (Vanderwall et al., 1997). Bacitracin (Ming et al., 2002), a thiazoline-containing peptide antibiotic, interdicts bacterial cell wall new biosynthesis by complexation with C55-bactoprenolpyrophosphate. Thiangazole (Kunze et al., 1993) contains a tandem array of one oxazole and three thiazolines and exhibits antiviral activity (Jansen et al., 1992). Yet other oxazole/thiazole-containing natural products such as thiostrepton (Anderson et al., 1970) and GE2270A (Selva et al., 1997) inhibit translation steps in bacterial protein synthesis. More than 1000 alkaloids with the indole skeleton have been reported from microorganisms. One-third of these compounds are peptides with masses beyond 500 Da where the indole is tryptophan derived. The structural variety of the remaining two-thirds is higher, and their biological activity seems to cover a broader range, including antimicrobial, antiviral, cytotoxic, insecticidal, antithrombotic, or enzyme inhibitory activity.

BRIEF SUMMARY

Provided herein is an isolated strain of a non-*Burkholderia cepacia,* non-*Burkholderia plantari*, non-*Burkholderia gladioli*, *Burkholderia sp.* which has the following characteristics:

a. Has a 16S rRNA gene sequence comprising a forward sequences having at least 99.0% identity to the sequences set forth in SEQ ID NO:8, 11 and 12 and a

reverse sequence having at least 99.0% identity to SEQ ID NO:9, 10, 13-15;

b. Has pesticidal, in particular, herbicidal, insecticidal, fungicidal and nematicidal activity;

c. Produces at least one of the compounds selected from the group consisting of:

(i) a compound having the following properties: (a) a molecular weight of about 525-555 as determined by Liquid Chromatography/Mass Spectroscopy (LC/MS); (b) ^{1}H NMR values of 6.22, 5.81, 5.69, 5.66, 5.65, 4.64, 4.31, 3.93, 3.22, 3.21, 3.15, 3.10, 2.69, 2.62, 2.26, 2.23. 1.74, 1.15, 1.12, 1.05, 1.02; (c) has ^{13}C NMR values of 172.99, 172.93, 169.57, 169.23, 167.59, 130.74, 130.12, 129.93, 128.32, 73.49, 62.95, 59.42, 57.73, 38.39, 38.00, 35.49, 30.90, 30.36, 29.26, 18.59, 18.38, 18.09, 17.93, 12.51 and (c) an High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) retention time of about 10-15 minutes, on a reversed phase C-18 HPLC column using a water:acetonitrile (CH_3CN) gradient;

(ii) a compound having an oxazolyl-indole structure comprising at least one indole moiety, at least one oxazole moiety, at least one substituted alkyl group and at least one carboxylic ester group; at least 17 carbons and at least 3 oxygen and 2 nitrogens;

(iii) a compound having an oxazolyl-benzyl structure comprising at least one benzyl moiety, at least one oxazole moiety, at least one substituted alkyl group and at least one amide group; at least 15 carbons and at least 2 oxygen and 2 nitrogens;

(iv) a compound having at least one ester, at least one amide, at least three methylene groups, at least one tetrahydropyranose moiety and at least three olefinic double bonds, at least six methyl groups, at least three hydroxyl groups, at least twenty five carbons and at least eight oxygen and one nitrogen and

d. is non-pathogenic (non-infectious) to vertebrate animals, such as mammals, birds and fish;

e. is susceptible to kanamycin, chloramphenicol, ciprofloxacin, piperacillin , imipenem, and a combination of sulphamethoxazole and trimethoprim and

f. contains the fatty acids 16:0, cyclo 17:0, 16:0 3- OH, 14:0, cyclo 19:0 ω8*c*, 18:0.

In a particular embodiment, the strain has the identifying characteristics of a *Burkholderia* A396 strain (NRRL Accession No. B-50319).

Disclosed herein are isolated compounds which are optionally obtainable or derived from *Burkholderia* species, or alternatively, organisms capable of producing these compounds that can be used to control various pests, particularly plant phytopathogenic pests, examples of which include but are not limited to insects, nematodes, bacteria, fungi. These compounds may also be used as herbicides.

In particular, the isolated pesticidal compounds may include but are not limited to:

(A) a compound having the following properties: (i) a molecular weight of about

525-555 as determined by Liquid Chromatography/Mass Spectroscopy (LC/MS); (ii) ^{1}H NMR δ values of 6.22, 5.81, 5.69, 5.66, 5.65, 4.64, 4.31, 3.93, 3.22, 3.21, 3.15, 3.10, 2.69, 2.62, 2.26, 2.23. 1.74, 1.15, 1.12, 1.05, 1.02; (iii) has ^{13}C NMR δ values of 172.99, 172.93, 169.57, 169.23, 167.59, 130.74, 130.12, 129.93, 128.32, 73.49, 62.95, 59.42, 57.73, 38.39, 38.00, 35.49, 30.90, 30.36, 29.26, 18.59, 18.38, 18.09, 17.93, 12.51 and (iv) an High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) retention time of about 10-15 minutes, on a reversed phase C-18 HPLC column using a water:acetonitrile (CH_3CN) gradient;

(B) a compound having an oxazolyl-indole structure comprising at least one indole moiety, at least one oxazole moiety, at least one substituted alkyl group and at least one carboxylic ester group; at least 17 carbons and at least 3 oxygen and 2 nitrogens;

(C) a compound having an oxazolyl-benzyl structure comprising at least one benzyl moiety, at least one oxazole moiety, at least one substituted alkyl group and at least one amide group; at least 15 carbons and at least 2 oxygen and 2 nitrogens;

(D) a compound having at least one ester, at least one amide, at least three methylene groups, at least one tetrahydropyranose moiety and at least three olefinic double bonds, at least six methyl groups, at least three hydroxyl groups, at least twenty five carbons and at least eight oxygen and one nitrogen and

(E) a compound having at least one ester, at least one amide, an epoxide methylene group, at least one tetrahydropyranose moiety, at least three olefinic double bonds, at least six methyl groups, at least three hydroxyl groups, at least 25 carbons, at least 8 oxygens and at least 1 nitrogen.

In a particular embodiment, the isolated compounds may include but are not limited to:

(A) a compound having an oxazolyl-indole structure comprising at least one indole moiety, at least one oxazole moiety, at least one substituted alkyl group, at least one carboxylic ester group, at least 17 carbons, at least 3 oxygens and at least 2 nitrogens; and which has at least one of the following: (i) a molecular weight of about 275-435; (ii) ^{1}H NMR δ values at 8.44, 8.74, 8.19, 7.47, 7.31, 3.98, 2.82, 2.33, 1.08; (iii) ^{13}C NMR δ values of δ 163.7, 161.2, 154.8, 136.1, 129.4, 125.4, 123.5, 123.3, 121.8, 121.5, 111.8, 104.7, 52.2, 37.3, 28.1, 22.7, 22.7; (iv) an High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) retention time of about 10-20 minutes on a reversed phase C-18 HPLC column using a water:acetonitrile (CH_3CN) with a gradient solvent system and UV detection of 210 nm; (v) UV absorption bands at about 226, 275, 327 nm.;

(B) a compound having an oxazolyl-benzyl structure comprising at least one benzyl moiety, at least one oxazole moiety, at least one substituted alkyl group and at least one amide group; at least 15 carbons and at least 2 oxygens, at least 2 nitrogens; and at least one of the following characteristics: (i) a molecular weight of about 240-290 as determined by Liquid Chromatography/Mass Spectroscopy (LC/MS); (ii) ^{1}H NMR δ values at about 7.08, 7.06, 6.75, 3.75, 2.56, 2.15, 0.93, 0.93; (iii) ^{13}C NMR δ values of 158.2, 156.3, 155.5, 132.6, 129.5, 129.5, 127.3, 121.8, 115.2, 115.2, 41.2, 35.3, 26.7, 21.5, 21.5; (iv) a High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) retention time of about 6-15 minutes, on a reversed phase C-18 HPLC column using a water:acetonitrile (CH_3CN) gradient and (v) UV absorption bands at about 230, 285, 323 nm;

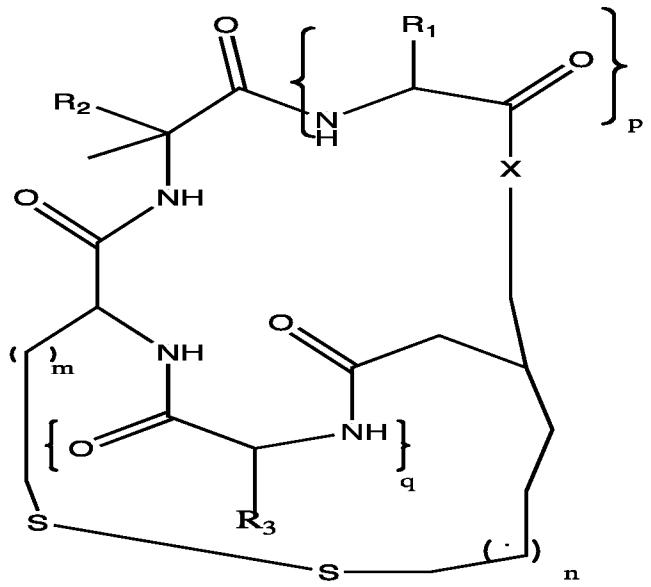
(C) a non-epoxide compound comprising at least one ester, at least one amide, at least three methylene groups, at least one tetrahydropyranose moiety and at least three olefinic double bonds, at least six methyl groups, at least three hydroxyl groups, at least twenty five carbons, at least eight oxygens and one nitrogen and at least one of the following characteristics: (i) a molecular weight of about 530-580 as determined by Liquid Chromatography/Mass Spectroscopy (LC/MS); (ii) ^{1}H NMR δ values of 6.40, 6.39, 6.00, 5.97, 5.67, 5.54, 4.33, 3.77, 3.73, 3.70, 3.59, 3.47, 3.41, 2.44, 2.35, 2.26, 1.97, 1.81, 1.76, 1.42, 1.37, 1.16, 1.12, 1.04; (iii) ^{13}C NMR δ values of 173.92, 166.06, 145.06, 138.76, 135.71, 129.99, 126.20, 123.35, 99.75, 82.20, 78.22, 76.69, 71.23, 70.79, 70.48, 69.84, 60.98, 48.84, 36.89, 33.09, 30.63, 28.55, 25.88, 20.37, 18.11, 14.90, 12.81, 9.41; (iv) a High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) retention time of about 7-12 minutes, on a reversed phase C-18 HPLC column using a water:acetonitrile (CH_3CN) with a gradient solvent system and UV detection of 210 nm; (v) a molecular formula of $C_{28}H_{45}NO_{10}$ which was determined by interpretation of the ESIMS and NMR data analysis; (vi) UV absorption bands between about 210-450 nm;

(D) a compound comprising (i) at least one ester, at least one amide, an epoxide methylene group, at least one tetrahydropyranose moiety and at least three olefinic double bonds, at least six methyl groups, at least three hydroxyl groups, at least 25 carbons, at least 8 oxygens and at least 1 nitrogen, (ii) ^{13}C NMR δ values of 174.03, 166.12, 143.63, 137.50, 134.39, 128.70, 126.68, 124.41, 98.09, 80.75, 76.84, 75.23, 69.87, 69.08, 68.69, 68.60, 48.83, 41.07, 35.45, 31.67, 29.19, 27.12, 24.55, 19.20, 18.95, 13.48, 11.39, 8.04, (iii) a molecular formula of $C_{28}H_{43}NO_9$ and at least one of: (i) ^{1}H NMR δ values at about 6.41, 6.40, 6.01, 5.97, 5.67, 5.55, 4.33, 3.77, 3.75, 3.72, 3.64, 3.59, 3.54, 3.52, 2.44, 2.34, 2.25, 1.96, 1.81, 1.76, 1.42, 1.38, 1.17, 1.12, 1.04; (ii) an High Pressure Liquid Chromatography

(HPLC) retention time of about 6-15 minutes, on a reversed phase C-18 HPLC column using a water:acetonitrile (CH_3CN) gradient; (iii) UV absorption band between about 210-450 nm and most particularly at about 234 nm.

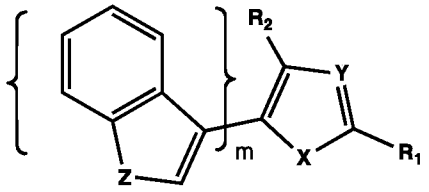
In a more particular embodiment, provided are compounds including but not limited to:

(A) a compound having the structure ##STR001##



or a pesticidally acceptable salt or steriosomers thereof, wherein M is 1, 2, 3 or 4; n is 0, 1, 2, or 3; p and q are independently 1 or 2; X is O, NH or NR; R1, R2 and R3 are the same or different and independently an amino acid side-chain moiety or an amino acid side-chain derivative and R is a lower chain alkyl, aryl or arylalkyl moiety;

(B) a compound having the structure ##STR002##

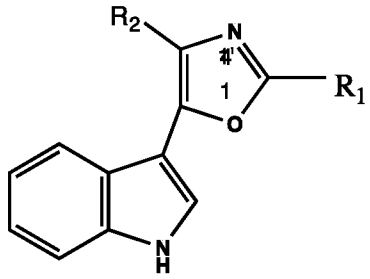


##STR002##

wherein X, Y and Z are each independently --O, --NR_1, or --S, wherein R_1 is --H or C_1-C_{10} alkyl; R_1, R_2 and m are each independently --H, alkyl, substituted alkyl, alkenyl, substituted alkenyl, alkynyl, substituted alkynyl, aryl, substituted aryl, heteroaryl, substituted heteroaryl, heterocyclic, substituted heterocyclic, cycloalkyl, substituted cycloalkyl, alkoxy, substituted alkoxy, thioalkyl, substituted thioalkyl, hydroxy, halogen, amino, amido,

carboxyl, --C(O)H, acyl, oxyacyl, carbamate, sulfonyl, sulfonamide, or sulfuryl and "m" may be located anywhere on the oxazole ring;

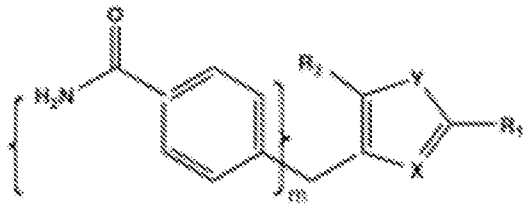
(C) a compound having the structure ##STR002a##



##STR002a##

wherein R_1 is --H or C_1-C_{10} alkyl; R_2 is an alkyl ester;

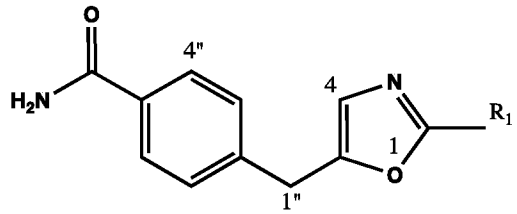
(D) a compound having the structure ##STR003##



##STR003##

wherein: X and Y are each independently --OH, --NR_1, or --S, wherein R_1 is --H or C_1-C_{10} alkyl; R_1, R_2 and m, a substituent on the oxazole ring, are each independently --H, alkyl, substituted alkyl, alkenyl, substituted alkenyl, alkynyl, substituted alkynyl, aryl, substituted aryl, heteroaryl, substituted heteroaryl, heterocyclic, substituted heterocyclic, cycloalkyl, substituted cycloalkyl, alkoxy, substituted alkoxy, thioalkyl, substituted thioalkyl, hydroxy, halogen, amino, amido, carboxyl, --C(O)H, acyl, oxyacyl, carbamate, sulfonyl, sulfonamide, or sulfuryl;

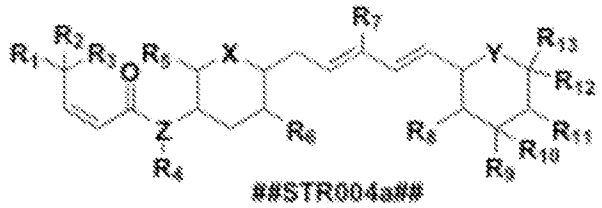
(E) a compound having the structure ##STR003a##



##STR003a##

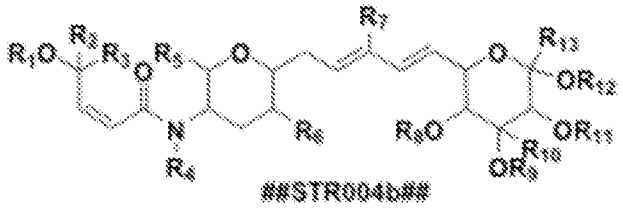
wherein R_1 is --H or C_1-C_{10} alkyl;

(F) a compound having the structure ##STR004a##



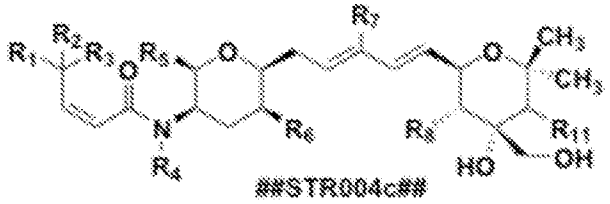
Wherein X, Y and Z are each independently -O, -NR, or -S, wherein R is H or C_1-C_{10} alkyl; R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8, R_9, R_{10}, R_{11}, R_{12}, and R_{13} are each independently H, alkyl, substituted alkyl, alkenyl, substituted alkenyl, alkynyl, substituted alkynyl, aryl, substituted aryl, heteroaryl, substituted heteroaryl, heterocyclic, substituted heterocyclic, cycloalkyl, substituted cycloalkyl, alkoxy, substituted alkoxy, thioalkyl, substituted thioalkyl, hydroxy, halogen, amino, amido, carboxyl, -C(O)H, acyl, oxyacyl, carbamate, sulfonyl, sulfonamide, or sulfuryl.

(G) a compound having the structure ##STR004b##



wherein R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8, R_9, R_{10}, R_{11}, R_{12}, and R_{13} are each independently H, alkyl, substituted alkyl, alkenyl, substituted alkenyl, alkynyl, substituted alkynyl, aryl, substituted aryl, heteroaryl, substituted heteroaryl, heterocyclic, substituted heterocyclic, cycloalkyl, substituted cycloalkyl, alkoxy, substituted alkoxy, thioalkyl, substituted thioalkyl, hydroxy, halogen, amino, amido, carboxyl, -C(O)H, acyl, oxyacyl, carbamate, sulfonyl, sulfonamide, or sulfuryl;

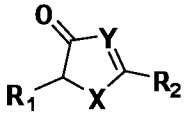
(H) a compound having the structure ##STR004c##



wherein R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8, R_{11}, are each independently H, alkyl, substituted alkyl, alkenyl, substituted alkenyl, alkynyl, substituted alkynyl, aryl, substituted aryl, heteroaryl, substituted heteroaryl, heterocyclic, substituted heterocyclic, cycloalkyl, substituted cycloalkyl, alkoxy, substituted alkoxy, thioalkyl, substituted thioalkyl, hydroxy,

halogen, amino, amido, carboxyl, -C(O)H, acyl, oxyacyl, carbamate, sulfonyl, sulfonamide, or sulfuryl;

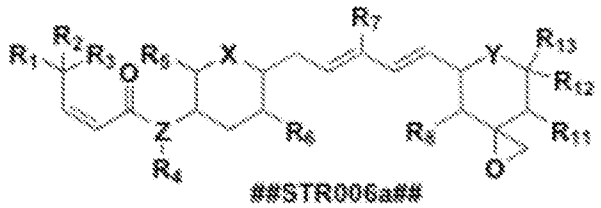
(I) a compound having the structure ##STR005##



##STR005##

wherein X and Y are each independently --OH, --NR_1, or --S, wherein R_1, R_2 are each independently --H, alkyl (e.g., C_1-C_{10} alkyl), substituted alkyl, alkenyl, substituted alkenyl, alkynyl, substituted alkynyl, aryl, substituted aryl, heteroaryl, substituted heteroaryl, heterocyclic, substituted heterocyclic, cycloalkyl, substituted cycloalkyl, alkoxy, substituted alkoxy, thioalkyl, substituted thioalkyl, hydroxy, halogen, amino, amido, carboxyl, --C(O)H, acyl, oxyacyl, carbamate, sulfonyl, sulfonamide, or sulfuryl;

(J) a compound having the structure ##STR006a##



##STR006a##

Wherein X, Y and Z are each independently -O, -NR, or -S, wherein R is H or C_1-C_{10} alkyl; R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8, R_{11}, R_{12}, and R_{13} are each independently H, alkyl, substituted alkyl, alkenyl, substituted alkenyl, alkynyl, substituted alkynyl, aryl, substituted aryl, heteroaryl, substituted heteroaryl, heterocyclic, substituted heterocyclic, cycloalkyl, substituted cycloalkyl, alkoxy, substituted alkoxy, thioalkyl, substituted thioalkyl, hydroxy, halogen, amino, amido, carboxyl, -C(O)H, acyl, oxyacyl, carbamate, sulfonyl, sulfonamide, or sulfuryl.

In a most particular embodiment, the compounds may include but are not limited to

(i) templazole A;

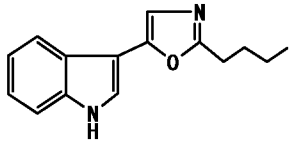
(ii) templazole B;

(iii) templamide A;

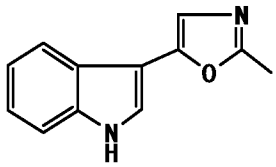
(iv) templamide B;

(v) FR90128;

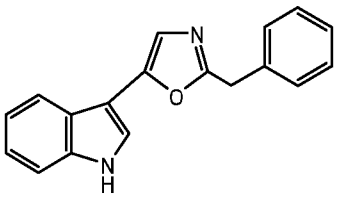
(vi)



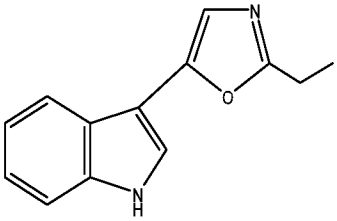
(vii)



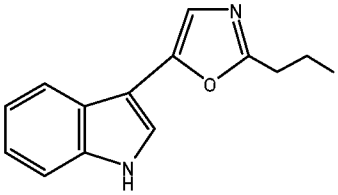
(viii)



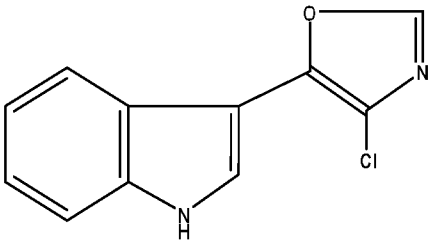
(ix)



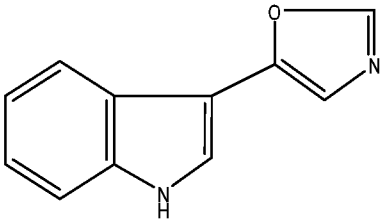
(x)



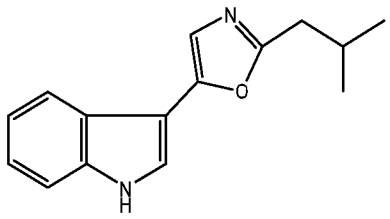
(xi)



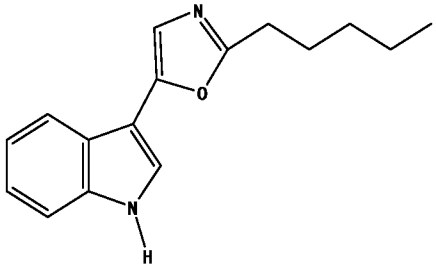
(xii)



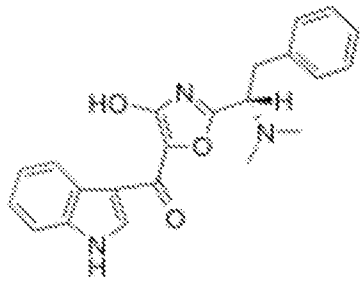
(xiii)



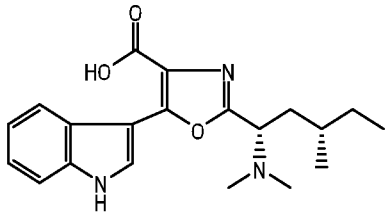
(xiv)



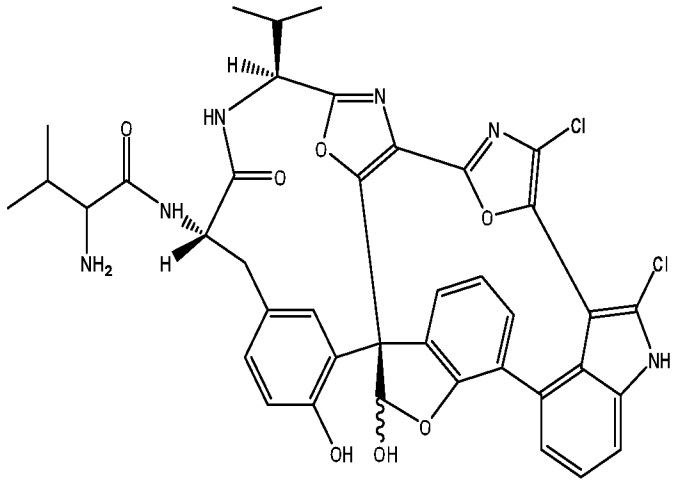
(xv)



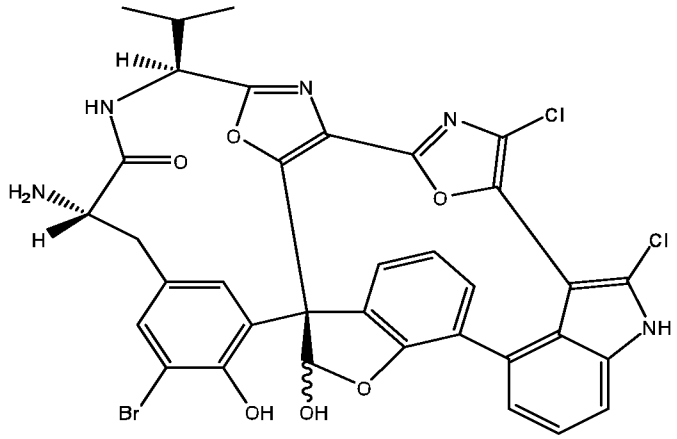
(xvi)



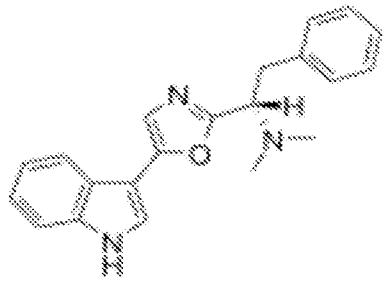
(xvii)



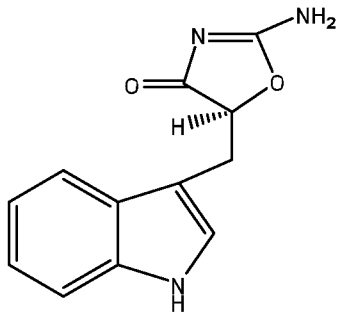
(xviii)



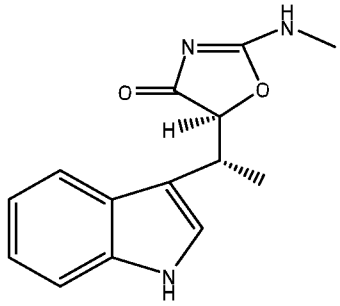
(xix)



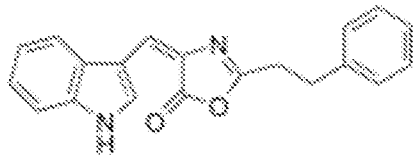
(xx)



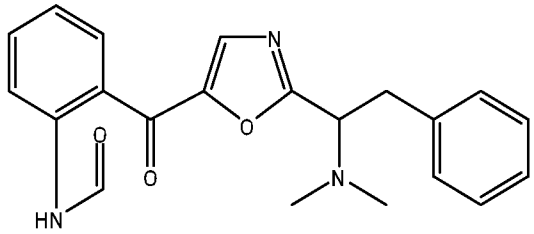
(xxi)



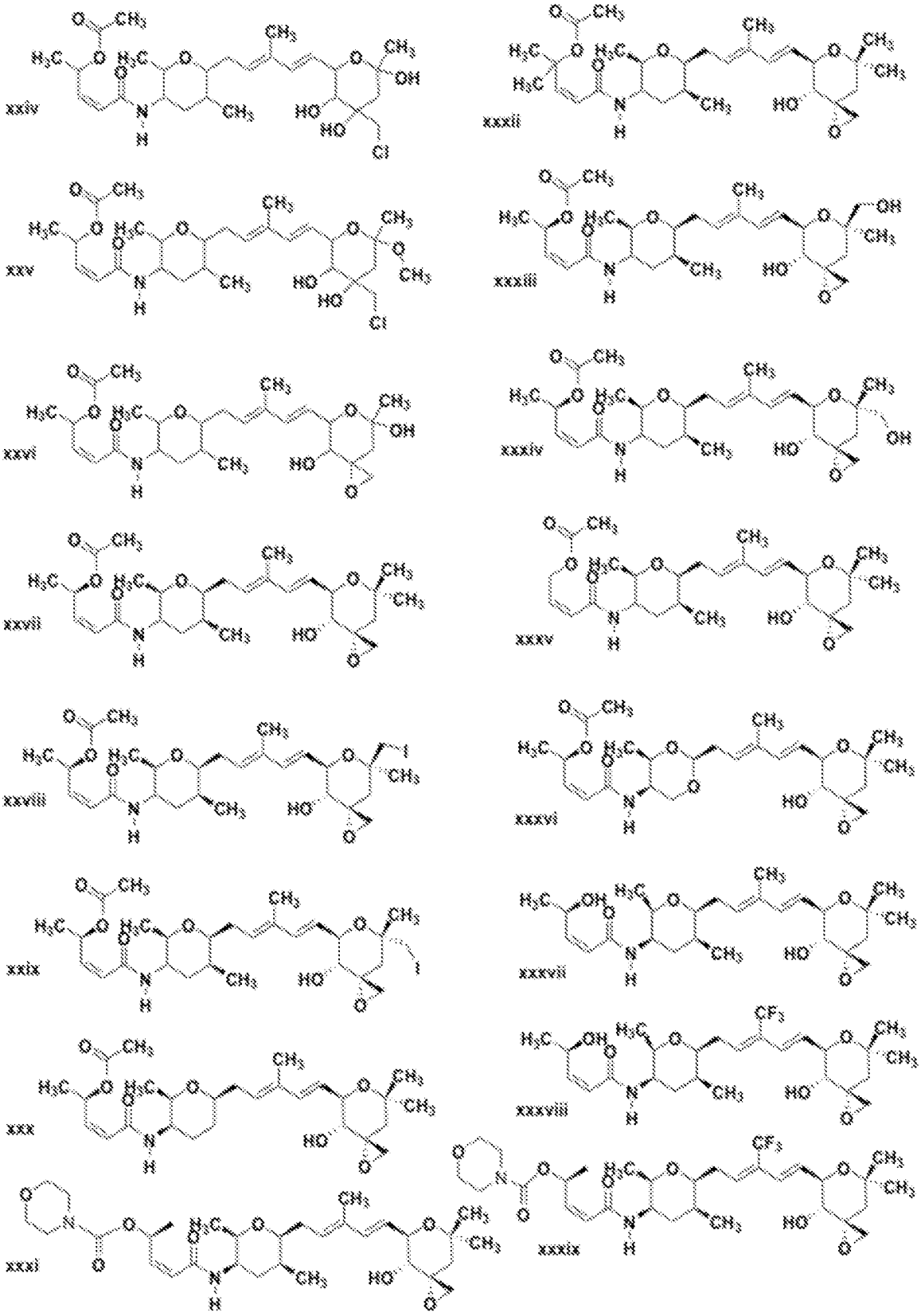
(xxii)



(xxiii)



5


xxiv
xxxii
xxv
xxxiii
xxvi
xxxiv
xxvii
xxxv
xxviii
xxxvi
xxix
xxxvii
xxx
xxxviii
xxxi
xxxix

(XL) FR901465

Also provided are methods of obtaining the compounds set forth above. In particular, the method comprises culturing the *Burkholderia* strain disclosed herein and producing the compound. Further provided is a method for isolating these compounds by isolating the compound(s) produced by a *Burkholderia* strain comprising isolating compounds produced from a supernatant of a culture of said *Burkholderia* strain.

Further provided is a combination comprising (a) a first substance selected from the group consisting of (i) a pure culture, cell fraction or supernatant derived from the *Burkholderia* strain set forth above or extract thereof for use optionally as a pesticide; (ii) one or more of the compounds set forth above (b) optionally a second substance, wherein said second substance is a chemical or biological pesticide and (c) optionally at least one of a carrier, diluent, surfactant, adjuvant, or pesticide. In a particular embodiment, the combination is a composition. In a related aspect, provided herein is a seed coated with said composition.

In a related aspect, disclosed is a method for modulating pest infestation in a plant comprising applying to the plant and/or seeds thereof and/or substrate used for growing said plant and/or a method for modulating emergence and/or growth of monocotyledonous, sedge or dicotyledonous weeds comprising applying to said weed or soil an amount of

(I) (a) the isolated compounds set forth above and (b) optionally another substance, wherein said substance is a pesticide (e.g. nematocide, herbicide, fungicide, insecticide) or

(II) the composition or combination set forth above

in an amount effective to modulate pest infestation and/or emergence or growth of monocotyledonous, sedge or dicotyledonous weeds.

In another related aspect, provided is the use of the strains, cultures, extracts, supernatants, combinations, compounds set forth above for modulating pest infestation in a plant comprising applying to the plant and/or seeds thereof and/or substrate used for growing said plant and/or a method for modulating emergence and/or growth of monocotyledonous, sedge or dicotyledonous weeds.

BRIEF DESCRIPTION OF THE FIGURES

Figure 1 shows the comparison of the growth rate of *Burkholderia* A396 *to Burkholderia multivorans* ATCC 17616.

Figure 2 shows the effect of *Burkholderia* A396 extract on bindweed.

Figure 3 shows the effect of *Burkholderia* A396 extract on pigweed.

Figure 4 shows the effect of *Burkholderia* A396 extract on Cabbage looper (*Tricoplusia ni*).

Figure 5 shows the effect of *Burkholderia* A396 culture broth on Beet armyworm

(*Spodoptera exigua*).

Figure 6 shows the effect of *Burkholderia* A396 culture broth on the motility of juvenile root-knot nematodes (*Meloidogyne incognita*).

Figure 7 is a schematic representation of purification scheme for obtaining the templazole and templamide compounds.

Figure 8 shows results of an *in vitro* assay to test the fungicidal effect of FR90128 on *Botrytis cinerea* (left) and *Phytophtora* sp. (right).

Figure 9 shows the effect of *Burkholderia* A396 culture broth on the average gall index (% control) of cucumber roots cv. Toschka inoculated with 3000 eggs of *Meloidogyne sp.* 14 days after inoculation and application.

Figure 10 Effect of *Burkholderia* A396 culture broth on the average gall index of cucumber roots cv. Toschka inoculated with 3000 eggs of *Meloidogyne sp.* 14 days after inoculation and application.

DETAILED DESCRIPTION OF EMBODIMENTS

While the compositions and methods heretofore are susceptible to various modifications and alternative forms, exemplary embodiments will herein be described in detail. It should be understood, however, that there is no intent to limit the invention to the particular forms disclosed, but on the contrary, the intention is to cover all modifications, equivalents, and alternatives falling within the spirit and scope of the invention as defined by the appended claims.

Where a range of values is provided, it is understood that each intervening value, to the tenth of the unit of the lower limit unless the context clearly dictates otherwise, between the upper and lower limit of that range and any other stated or intervening value in that stated range, is included therein. Smaller ranges are also included. The upper and lower limits of these smaller ranges are also included therein, subject to any specifically excluded limit in the stated range.

Unless defined otherwise, all technical and scientific terms used herein have the same meaning as commonly understood by one of ordinary skill in the art to which this invention belongs. Although any methods and materials similar or equivalent to those described herein can also be used in the practice or testing of the present invention, the preferred methods and materials are now described.

It must be noted that as used herein and in the appended claims, the singular forms "a," "and" and "the" include plural references unless the context clearly dictates otherwise.

As defined herein, “derived from” means directly isolated or obtained from a particular source or alternatively having identifying characteristics of a substance or organism isolated or obtained from a particular source.

As defined herein, an "isolated compound" is essentially free of other compounds or substances, e.g., at least about 20% pure, preferably at least about 40% pure, more preferably about 60% pure, even more preferably about 80% pure, most preferably about 90% pure, and even most preferably about 95% pure, as determined by analytical methods, including but not limited to chromatographic methods, electrophoretic methods.

As used herein, the term "alkyl" refers to a monovalent straight or branched chain hydrocarbon group having from one to about 12 carbon atoms, including methyl, ethyl, n-propyl, isopropyl, n-butyl, isobutyl, tert-butyl, n-hexyl, and the like.

As used herein, "substituted alkyl" refers to alkyl groups further bearing one or more substituents selected from hydroxy, alkoxy, mercapto, cycloalkyl, substituted cycloalkyl, heterocyclic, substituted heterocyclic, aryl, substituted aryl, heteroaryl, substituted heteroaryl, aryloxy, substituted aryloxy, halogen, cyano, nitro, amino, amido, --C(O)H, acyl, oxyacyl, carboxyl, sulfonyl, sulfonamide, sulfuryl, and the like.

As used herein, "alkenyl" refers to straight or branched chain hydrocarbyl groups having one or more carbon-carbon double bonds, and having in the range of about 2 up to 12 carbon atoms, and "substituted alkenyl" refers to alkenyl groups further bearing one or more substituents as set forth above.

As used herein, "alkynyl" refers to straight or branched chain hydrocarbyl groups having at least one carbon-carbon triple bond, and having in the range of about 2 up to 12 carbon atoms, and "substituted alkynyl" refers to alkynyl groups further bearing one or more substituents as set forth above.

As used herein, "aryl" refers to aromatic groups having in the range of 6 up to 14 carbon atoms and "substituted aryl" refers to aryl groups further bearing one or more substituents as set forth above.

As used herein, "heteroaryl" refers to aromatic rings containing one or more heteroatoms (e.g., N, O, S, or the like) as part of the ring structure, and having in the range of 3 up to 14 carbon atoms and "substituted heteroaryl" refers toheteroaryl groups further bearing one or more substituents as set forth above.

As used herein, "alkoxy" refers to the moiety --O-alkyl-, wherein alkyl is as defined above, and "substituted alkoxy" refers to alkoxyl groups further bearing one or more substituents as set forth above.

As used herein, "thioalkyl" refers to the moiety --S-alkyl-, wherein alkyl is as defined above, and "substituted thioalkyl" refers to thioalkyl groups further bearing one or more substituents as set forth above.

As used herein, "cycloalkyl" refers to ring-containing alkyl groups containing in the range of about 3 up to 8 carbon atoms, and "substituted cycloalkyl" refers to cycloalkyl groups further bearing one or more substituents as set forth above.

As used herein, "heterocyclic", refers to cyclic (i.e., ring-containing) groups containing one or more heteroatoms (e.g., N, O, S, or the like) as part of the ring structure, and having in the range of 3 up to 14 carbon atoms and "substituted heterocyclic" refers to heterocyclic groups further bearing one or more substituent's as set forth above.

The Burkholderia Strain

The *Burkholderia* strain set forth herein is a non-*Burkholderia cepacia* complex, non-*Burkholderia plantari,* non-*Burkholderia gladioli*, *Burkholderia sp* and non-pathogenic to vertebrates, such as birds, mammals and fish. This strain may be isolated from a soil sample using procedures known in the art and described by Lorch et al., 1995. The *Burkholderia* strain may be isolated from many different types of soil or growth medium. The sample is then plated on potato dextrose agar (PDA). The bacteria are gram negative, and it forms round, opaque cream-colored colonies that change to pink and pinkish-brown in color and mucoid or slimy over time.

Colonies are isolated from the potato dextrose agar plates and screened for those that have biological, genetic, biochemical and/or enzymatic characteristics of the *Burkholderia* strain of the present invention set forth in the Examples below. In particular, the *Burkholderia* strain has a 16S rRNA gene comprising a forward sequence that is at least about 99.0%, preferably about 99.5%, more preferably about 99.9% and most preferably about 100% identical to the sequence set forth in SEQ ID NO: 8, 11 and 12 and a forward sequence that is at least about 99.0%, preferably about 99.5%, more preferably about 99.9% and most preferably about 100% identical to the sequence set forth in SEQ ID NO: 9, 10, 13, 14 and 15 as determined by clustal analysis. Furthermore, as set forth below, this *Burkholderia* strain may, as set forth below, have pesticidal activity, particularly, virucidal, herbicidal, germicidal, fungicidal, nematicidal, bactericidal and insecticidal and more particularly, herbicidal, insecticidal, fungicidal and nematicidal activity. It is not pathogenic to vertebrate animals, such as mammals, birds, and fish.

Additionally, the *Burkholderia* strain produces at least the pesticidal compounds set forth in the instant disclosure.

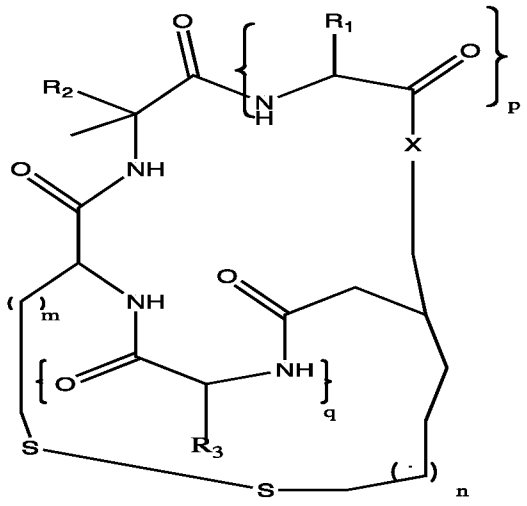
The *Burkholderia* strain is susceptible to kanamycin, chloramphenicol, ciprofloxacin, piperacillin , imipenem, and a combination of sulphamethoxazole and trimethoprim and contains the fatty acids 16:0, cyclo 17:0, 16:0 3- OH, 14:0, cyclo 19:0, 18:0.

This *Burkholderia* strain may be obtained by culturing a microorganism having the

identifying characteristics of *Burkholderia* A396 (NRRL Accession No. B-50319) on Potato Dextrose Agar (PDA) or in a fermentation medium containing defined carbon sources such as glucose, maltose, fructose, galactose, and undefined nitrogen sources such as peptone, tryptone, soytone, and NZ amine.

Pesticidal Compounds

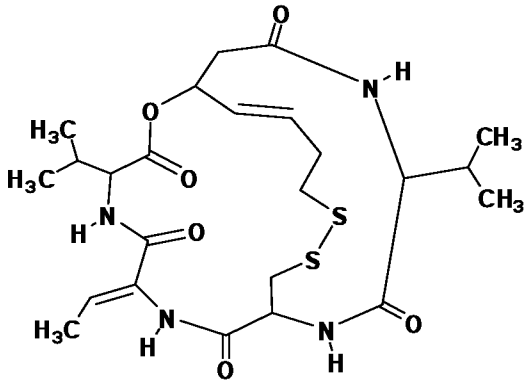
The pesticidal compound disclosed herein may have the following properties: (a) is obtainable from a novel *Burkholderia* species, e.g., A396; (b) is, in particular, toxic to most common agricultural insect pests; (c) has a molecular weight of about 525-555 and more particularly, 540 as determined by Liquid Chromatography/Mass Spectroscopy (LC/MS); (d) has ^{1}H NMR values of 6.22, 5.81, 5.69, 5.66, 5.65, 4.64, 4.31, 3.93, 3.22, 3.21, 3.15, 3.10, 2.69, 2.62, 2.26, 2.23. 1.74, 1.15, 1.12, 1.05, 1.02; (d) has ^{13}C NMR values of 172.99, 172.93, 169.57, 169.23, 167.59, 130.74, 130.12, 129.93, 128.32, 73.49, 62.95, 59.42, 57.73, 38.39, 38.00, 35.49, 30.90, 30.36, 29.26, 18.59, 18.38, 18.09, 17.93, 12.51 (e) has an High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) retention time of about 10-15 minutes, more specifically about 12 minutes and even more specifically about 12.14 min on a reversed phase C-18 HPLC (Phenomenex, Luna 5μ C18 (2) 100A, 100 x 4.60 mm) column using a water:acetonitrile (CH_3CN) with a gradient solvent system (0-20 min 90 - 0 % aqueous CH_3CN, 20-24 min 100% CH_3CN, 24-27 min, 0-90 % aqueous CH_3CN, 27-30 min 90% aqueous CH_3CN) at 0.5 mL/min flow rate and UV detection of 210 nm (f) has a molecular formula, $C_{24}H_{36}N_4O_6S_2$, which is determined by interpretation of ^{1}H, ^{13}C NMR and LC/MS data (g) a ^{13}C NMR spectrum with signals for all 24 carbons, including 5 methyl, 4 methylene, 9 methine, and 6 quaternary carbons and (g) ^{1}H NMR spectrum displaying characteristics of a typical depsipeptide, illustrating three -amino protons [4.63, 4.31, 3.93], and one ester carbinol proton [5.69]. In a particular embodiment, the compound has the structure ##STR001##:



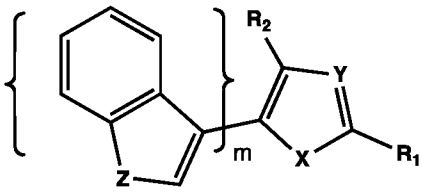
Or a pesticidally acceptable salt or stereoisomers thereof, wherein M is 1, 2, 3 or 4; n is 0, 1, 2, or 3; p and q are independently 1 or 2; X is O, NH or NR; R1, R2 and R3 are the same or

different and independently an amino acid side-chain moiety or an amino acid side-chain derivative and R is a lower chain alkyl, aryl or arylalkyl moiety.

In an even more particular embodiment, the compound has the structure of FR90128:



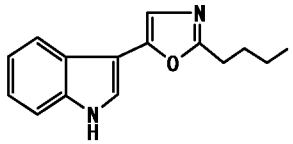
Provided herewith are compounds set forth in ##STR002##:



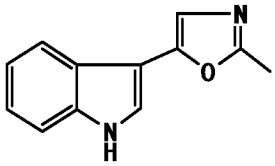
##STR002##

wherein: X, Y and Z are each independently --O, --NR_1, or --S, wherein R_1 is --H or C_1-C_{10} alkyl; R_1, R_2 and m are each independently --H, alkyl, substituted alkyl, alkenyl, substituted alkenyl, alkynyl, substituted alkynyl, aryl, substituted aryl, heteroaryl, substituted heteroaryl, heterocyclic, substituted heterocyclic, cycloalkyl, substituted cycloalkyl, alkoxy, substituted alkoxy, thioalkyl, substituted thioalkyl, hydroxy, halogen, amino, amido, carboxyl, --C(O)H, acyl, oxyacyl, carbamate, sulfonyl, sulfonamide, or sulfuryl.

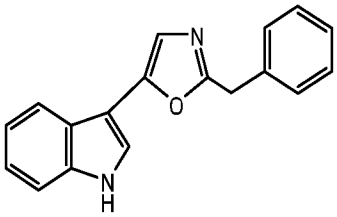
In an even another particular embodiment, Family ##STR002## compounds may be the compounds set forth in **(vi)-(xix)**.



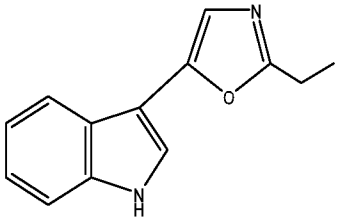
(vii)



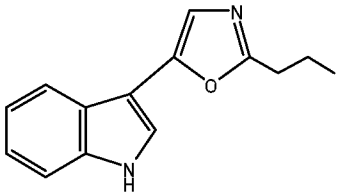
(viii)



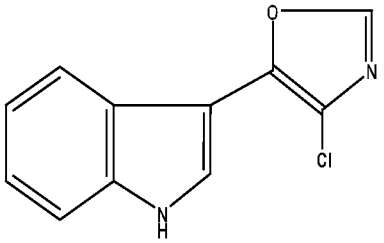
(ix)



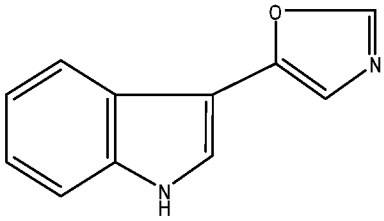
(x)



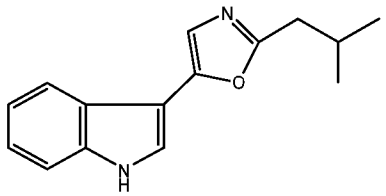
(xi)



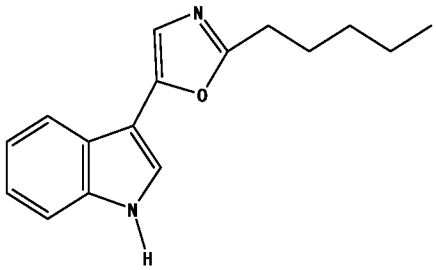
(xii)



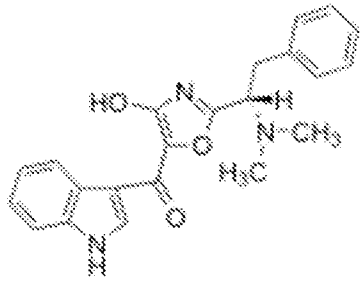
(xiii)



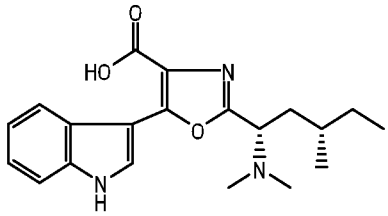
(xiv)



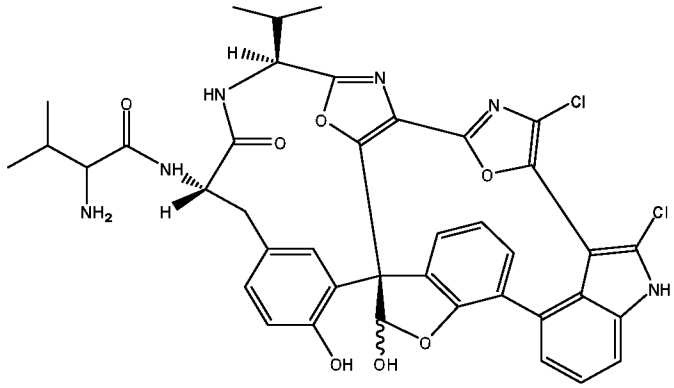
(xv)



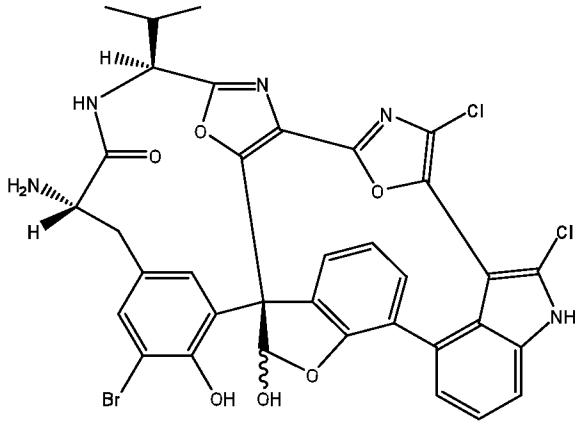
(xvi)



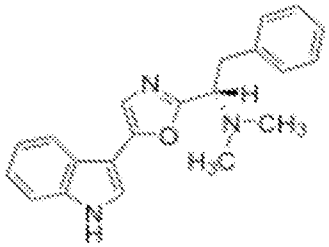
(xvii)



(xviii)

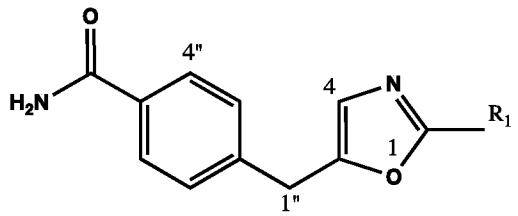


(xix)



These are from either natural materials or compounds obtained from commercial sources or by chemical synthesis. Natural sources of Family ##STR002## compounds include, but are not limited to, microorganisms, alga, and sponges. In a more particular embodiment, microorganisms which include the Family ##STR002## compounds include but are not limited to, or alternatively, Family ##STR002## compounds may be derived from species such as *Streptoverticillium waksmanii* (compound **vi**) (Umehara, et al., 1984), *Streptomyces pimprina* (compound vii) (Naiket al., 2001), *Streptoverticillium olivoreticuli* (compounds **viii, ix, x**) (Koyama Y., et al., 1981), *Streptomyces* sp (compounds **xi, xii**) (Watabe et al., 1988), *Pseudomonas syringae* (compounds **xiii, xiv**) (Pettit et al., 2002). Family ##STR002## compounds may also be derived from algae including but not limited to red alga (compound **xv**) (N'Diaye, et al., 1996), red alga *Martensia fragilis* (compound **xvi**) (Takahashi S. et al., 1998), *Diazona chinensis* (compounds **xvii & xviii**) (Lindquist N. et al., 1991), *Rhodophycota haraldiophyllum* sp (compound **xix**) (Guella et al., 1994).

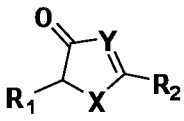
Also provided is ##STR003##:



wherein: X and Y are each independently --OH, --NR_1, or --S, wherein R_1 is --H or C_1-C_{10} alkyl; R_1, R_2 and m, a substituent on the oxazole ring, are each independently --H, alkyl, substituted alkyl, alkenyl, substituted alkenyl, alkynyl, substituted alkynyl, aryl, substituted

aryl, heteroaryl, substituted heteroaryl, heterocyclic, substituted heterocyclic, cycloalkyl, substituted cycloalkyl, alkoxy, substituted alkoxy, thioalkyl, substituted thioalkyl, hydroxy, halogen, amino, amido, carboxyl, --C(O)H, acyl, oxyacyl, carbamate, sulfonyl, sulfonamide, or sulfuryl.

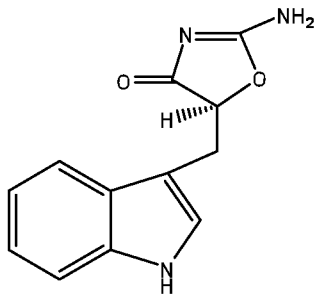
Further provided is ##STR005##:



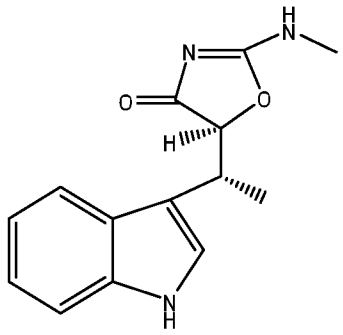
wherein X and Y are each independently --OH, --NR_1, or --S, wherein R_1, R_2 are each independently --H, alkyl (e.g., C_1-C_{10} alkyl), substituted alkyl, alkenyl, substituted alkenyl, alkynyl, substituted alkynyl, aryl, substituted aryl, heteroaryl, substituted heteroaryl, heterocyclic, substituted heterocyclic, cycloalkyl, substituted cycloalkyl, alkoxy, substituted alkoxy, thioalkyl, substituted thioalkyl, hydroxy, halogen, amino, amido, carboxyl, --C(O)H, acyl, oxyacyl, carbamate, sulfonyl, sulfonamide, or sulfuryl.

In a particular embodiment, Family ##STR005## compounds such as compounds from **xx-xxiii** set forth below may be derived from natural or commercial sources or by chemical synthesis:

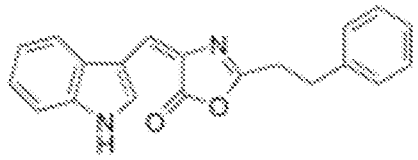
(xx)



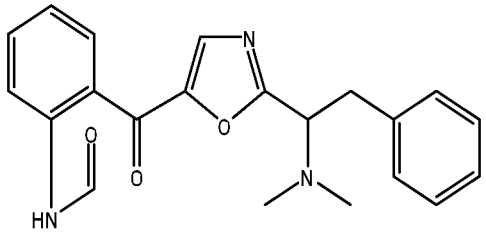
(xxi)



(xxii)



(xxiii)



Natural sources of Family ##STR005## compounds include, but are not limited to plants, corals, microorganisms, and sponges. The microorganisms include, but are not limited to *Streptomyces griseus* (compound **xx**) (Hirota et al., 1978), *Streptomyces albus* (compound **xxi**) (Werner et al., 1980). Family STR004 compounds may also be derived from algae including but not limited to *Haraldiophyllum sp* (compound **xxii** (Guella et al., 2006), and red algae (compound **xxiii**) (N'Diaye et al., 1994).

In one embodiment, the compound may be derived from or is obtainable from a microorganism, and in particular from *Burkholderia* species and characterized as having a structure comprising at least one ester, at least one amide, at least three methylene groups, at least one tetrahydropyranose moiety and at least three olefinic double bonds, at least six methyl groups, at least three hydroxyl groups, at least twenty five carbons and at least eight oxygen and one nitrogen. The compound further comprises at least one of the following characteristics:

(a) pesticidal properties and in particular, nematicidal, fungicidal, insecticidal and herbicidal properties;

(b) a molecular weight of about 530-580 and more particularly, 555 as determined by Liquid Chromatography/Mass Spectroscopy (LC/MS);

(c) ^{1}H NMR values of δ 6.40, 6.39, 6.00, 5.97, 5.67, 5.54, 4.33, 3.77, 3.73, 3.70, 3.59, 3.47, 3.41, 2.44, 2.35, 2.26, 1.97, 1.81, 1.76, 1.42, 1.37, 1.16, 1.12, 1.04;

(d) ^{13}C NMR values of δ 173.92, 166.06, 145.06, 138.76, 135.71, 129.99, 126.20, 123.35, 99.75, 82.20, 78.22, 76.69, 71.23, 70.79, 70.48, 69.84, 60.98, 48.84, 36.89, 33.09, 30.63, 28.55, 25.88, 20.37, 18.11, 14.90, 12.81, 9.41;

(e) an High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) retention time of about 7-12 minutes, more specifically about 10 minutes and even more specifically about 10.98 min on a reversed phase C-18 HPLC (Phenomenex, Luna 5μ C18(2) 100 A, 100 x 4.60 mm) column using a water:acetonitrile (CH_3CN) with a gradient solvent system (0-20 min; 90 - 0

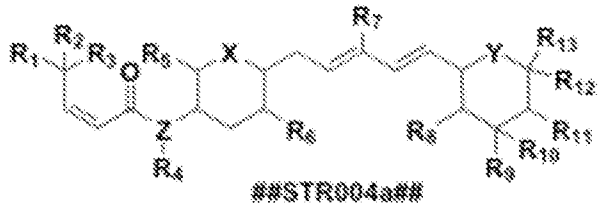
% aqueous CH_3CN, 20-24 min; 100% CH_3CN, 24-27 min; 0 - 90 % aqueous CH_3CN, 27-30 min; 90% aqueous CH_3CN) at 0.5 mL/min flow rate and UV detection of 210 nm;

(f) ^{13}C NMR spectrum which exhibits 28 discrete carbon signals which may be attributed to six methyls, four methylene carbons, and thirteen methines including five sp^2, four quaternary carbons;

(g) a molecular formula of $C_{28}H_{45}NO_{10}$ which was determined by interpretation of the ESIMS and NMR data analysis;

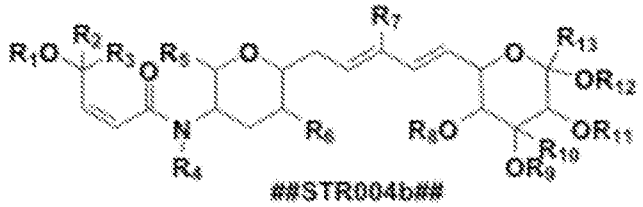
(h) UV absorption bands between about 210-450 nm and most particularly at about 234 nm.

Also provided are compounds having the structure ##STR004a##:



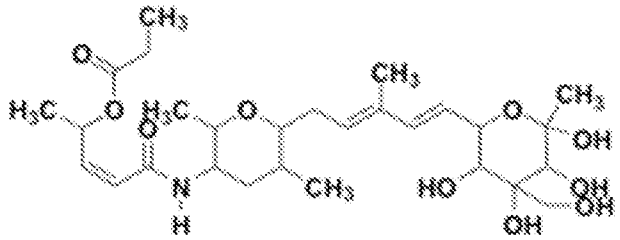
Wherein X, Y and Z are each independently -O, -NR, or -S, wherein R is H or C_1-C_{10} alkyl; R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8, R_9, R_{10}, R_{11}, R_{12}, and R_{13} are each independently H, alkyl, substituted alkyl, alkenyl, substituted alkenyl, alkynyl, substituted alkynyl, aryl, substituted aryl, heteroaryl, substituted heteroaryl, heterocyclic, substituted heterocyclic, cycloalkyl, substituted cycloalkyl, alkoxy, substituted alkoxy, thioalkyl, substituted thioalkyl, hydroxy, halogen, amino, amido, carboxyl, -C(O)H, acyl, oxyacyl, carbamate, sulfonyl, sulfonamide, or sulfuryl.

In a particular embodiment, the compound has the structure set forth in ##STR004b##:



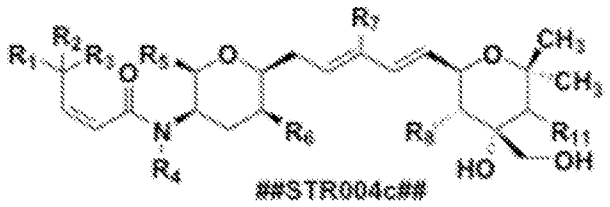
wherein R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8, R_9, R_{10}, R_{11}, R_{12}, and R_{13} are as previously defined for ##STR004a##.

In a more particular embodiment, the compound is Templamide A with the following structure:



Templamide A

In another embodiment, provided is a compound having formula ##STR004c##:



##STR004c##

Wherein R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8, and R_{11} are as previously defined for ##STR004a##.

In another embodiment, provided is a compound which may be derived from *Burkholderia* species and characterized as having a structure comprising at least one ester, at least one amide, an epoxide methylene group, at least one tetrahydropyranose moiety and at least three olefinic double bonds, at least six methyl groups, at least three hydroxyl groups, at least 25 carbons and at least 8 oxygen and 1 nitrogen, and pesticide activity. The compound further comprises at least one of the following characteristics:

(a) pesticidal properties and in particular, insecticidal, fungicidal, nematocidal and herbicidal properties;

(b) a molecular weight of about 520-560 and particularly 537 as determined by Liquid Chromatography/Mass Spectroscopy (LC/MS);

(c) ^{1}H NMR δ values at about 6.41, 6.40, 6.01, 5.97, 5.67, 5.55, 4.33, 3.77, 3.75, 3.72, 3.64, 3.59, 3.54, 3.52, 2.44, 2.34, 2.25, 1.96, 1.81, 1.76, 1.42, 1.38, 1.17, 1.12, 1.04;

(d) ^{13}C NMR values of δ 174.03, 166.12, 143.63, 137.50, 134.39, 128.70, 126.68, 124.41, 98.09, 80.75, 76.84, 75.23, 69.87, 69.08, 68.69, 68.60, 48.83, 41.07, 35.45, 31.67, 29.19, 27.12, 24.55, 19.20, 18.95, 13.48, 11.39, 8.04;

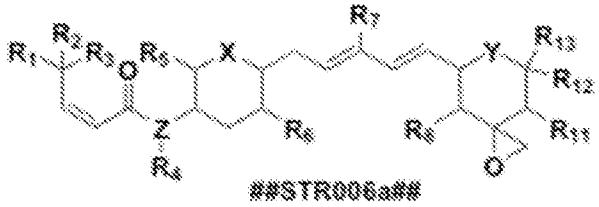
(e) High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) retention time of about 6-15 minutes, more specifically about 8 minutes on a reversed phase C-18 HPLC column using a water:acetonitrile (CH_3CN) gradient, particularly, an High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) retention time of about 8-15 minutes, more specifically about 11 minutes and even more specifically about 11.73 min on a reversed phase C-18 HPLC (Phenomenex, Luna 5μ C18(2) 100 A, 100 x 4.60 mm) column using a water:acetonitrile (CH_3CN) with a gradient solvent system (0-20 min; 90 - 0 % aqueous CH_3CN, 20-24 min; 100% CH_3CN, 24-27 min;

0 - 90 % aqueous CH_3CN, 27-30 min; 90% aqueous CH_3CN) at 0.5 mL/min flow rate and UV detection of 210 nm;

(f) a molecular formula of $C_{28}H_{43}NO_9$ which was determined by interpretation of the ESIMS and NMR data analysis;

(g) UV absorption bands at about 210-450 nm and most particularly at about 234 nm.

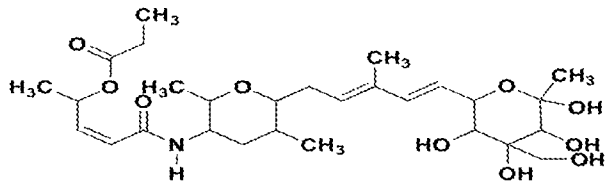
In a particular embodiment, the compound has the structure ##STR006a##:



##STR006a##

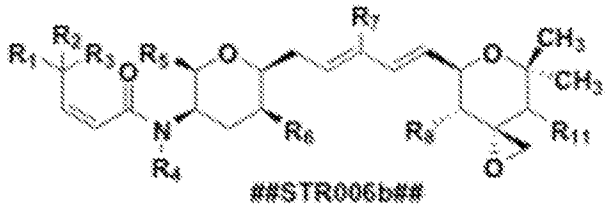
Wherein X, Y and Z are each independently -O, -NR, or -S, wherein R is H or C_1-C_{10} alkyl; R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8, R_{11}, R_{12}, and R_{13} are each independently H, alkyl, substituted alkyl, alkenyl, substituted alkenyl, alkynyl, substituted alkynyl, aryl, substituted aryl, heteroaryl, substituted heteroaryl, heterocyclic, substituted heterocyclic, cycloalkyl, substituted cycloalkyl, alkoxy, substituted alkoxy, thioalkyl, substituted thioalkyl, hydroxy, halogen, amino, amido, carboxyl, -C(O)H, acyl, oxyacyl, carbamate, sulfonyl, sulfonamide, or sulfuryl.

In a particular embodiment, the compound has the structure:



Templamide A

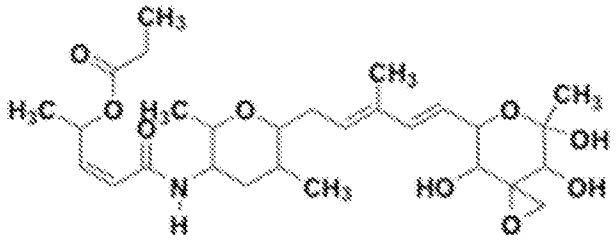
In another embodiment, provided is a compound having formula ##STR006b##:



##STR006b##

Wherein R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8, and R_{11} are as previously defined for ##STR006a##.

In a more particular embodiment, the compound is Templamide B with the following structure:



Templamide B

In yet another particular embodiment, the compound may be derived from *Burkholderia* species and characterized as having a structure comprising at least one ester, at least one amide, an epoxide methylene group, at least one tetrahydropyranose moiety and at least three olefinic double bonds, at least six methyl groups, at least three hydroxyl groups, at least 25 carbons and at least 8 oxygens and at least 1 nitrogen. The compound further comprises at least one of the following characteristics:

(a) pesticidal properties and in particular, insecticidal, fungicidal, nematicidal and herbicidal properties;

(b) a molecular weight of about 510-550 and particularly about 523 as determined by Liquid Chromatography/Mass Spectroscopy (LC/MS);

(c) ^{1}H NMR δ values at about 6.41, 6.40, 6.01, 5.98, 5.68, 5.56, 4.33, 3.77, 3.75, 3.72, 3.65, 3.59, 3.55, 3.50, 2.44, 2.26, 2.04, 1.96, 1.81, 1.75, 1.37, 1.17, 1.04;

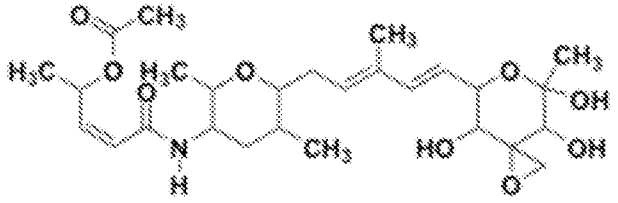
(d) ^{13}C NMR δ values of 172.22, 167.55, 144.98, 138.94, 135.84, 130.14, 125.85, 123.37, 99.54, 82.19, 78.28, 76.69, 71.31, 70.13, 69.68, 48.83, 42.52, 36.89, 33.11, 30.63, 25.99, 21.20, 20.38, 18.14, 14.93, 12.84;

(e) an High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) retention time of about 6-15 minutes, more specifically about 8 minutes on a reversed phase C-18 HPLC column using a water:acetonitrile (CH_3CN) gradient, particularly, an High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) retention time of about 8-15 minutes, more specifically about 10 minutes and even more specifically about 10.98 min on a reversed phase C-18 HPLC (Phenomenex, Luna 5μ C18(2) 100 A, 100 x 4.60 mm) column using a water:acetonitrile (CH_3CN) with a gradient solvent system (0-20 min; 90 - 0 % aqueous CH_3CN, 20-24 min; 100% CH_3CN, 24-27 min; 0 - 90 % aqueous CH_3CN, 27-30 min; 90% aqueous CH_3CN) at 0.5 mL/min flow rate and UV detection of 210 nm;

(f) a molecular formula of $C_{27}H_{41}NO_9$ which was determined by interpretation of the ESIMS and NMR data analysis;

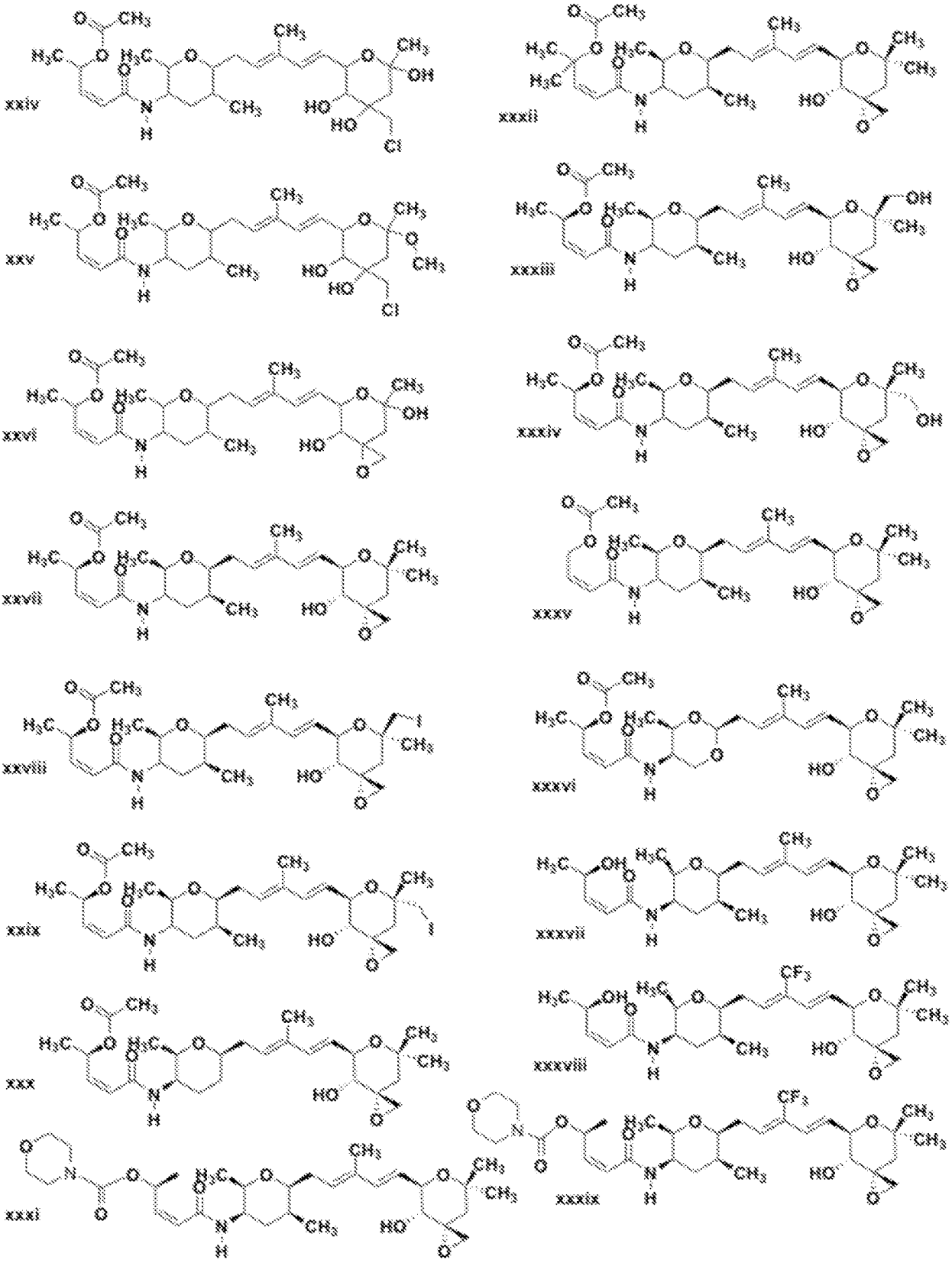
(g) UV absorption bands at about 210-450 nm and most particularly at about 234 nm.

In a more particular embodiment, the compound is a known compound FR901465 which was isolated earlier from culture broth of a bacterium of *Pseudomonas* sp. No. 2663 (Nakajima et al. 1996) and had been reported to have anticancer activity with the following structure:



FR901465

In an even another particular embodiment, Family ##STR006a## compounds may be the compounds set forth in **xxiv** to **xxxix.** These are from either natural materials or compounds obtained from commercial sources or by chemical synthesis. Natural sources of Family ##STR006a## compounds include, but are not limited to, microorganisms, alga, and sponges. In a more particular embodiment, microorganisms which include the Family ##STR006a## compounds which may be derived from species such as *Pseudomonas* sp. No. 2663 (compounds **xxiv-xxvi**) (Nakajima et al., 1996). The synthetic analogues of the FR901464 (**xxvii-xxxix**) which have been synthesized and patented as anticancer compounds (see Koide et al., US Patent Application No. 2008/0096879 A1).



Compositions

A substantially pure culture, cell fraction or supernatant and compounds produced by the *Burkholderia* strain of the present invention, may be formulated into pesticidal

compositions.

The substances set forth above can be formulated in any manner. Non-limiting formulation examples include but are not limited to emulsifiable concentrates (EC), wettable powders (WP), soluble liquids (SL), aerosols, ultra-low volume concentrate solutions (ULV), soluble powders (SP), microencapsulation, water dispersed granules, flowables (FL), microemulsions (ME), nano-emulsions (NE), etc. In particular, the concentrate, powders, granules and emulsions may be freeze-dried. In any formulation described herein, percent of the active ingredient is within a range of 0.01% to 99.99%.

The compositions may be in the form of a liquid, gel or solid. Liquid compositions comprise pesticidal compounds derived from said *Burkholderia* strain, e.g. a strain having the identifying characteristics of *Burkholderia* A396 (NRRL Accession No. B-50319).

A solid composition can be prepared by suspending a solid carrier in a solution of pesticidal compounds and drying the suspension under mild conditions, such as evaporation at room temperature or vacuum evaporation at 65°C or lower.

A composition of the invention may comprise gel-encapsulated compounds derived from the *Burkholderia* strain of the present invention. Such gel-encapsulated materials can be prepared by mixing a gel-forming agent (e.g., gelatin, cellulose, or lignin) with a solution of pesticidal compounds used in the method of the invention; and inducing gel formation of the agent.

The composition may additionally comprise a surfactant to be used for the purpose of emulsification, dispersion, wetting, spreading, integration, disintegration control, stabilization of active ingredients, and improvement of fluidity or rust inhibition. In a particular embodiment, the surfactant is a non-phytotoxic non-ionic surfactant which preferably belongs to EPA List 4B. In another particular embodiment, the nonionic surfactant is polyoxyethylene (20) monolaurate. The concentration of surfactants may range between 0.1-35% of the total formulation, preferred range is 5-25%. The choice of dispersing and emulsifying agents, such as non-ionic, anionic, amphoteric and cationic dispersing and emulsifying agents, and the amount employed is determined by the nature of the composition and the ability of the agent to facilitate the dispersion of these compositions.

The composition may further comprise another microorganism and/or pesticide (e.g, nematocide, fungicide, insecticide). The microorganism may include but is not limited to an agent derived from *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Brevabacillus sp., Lecanicillium* sp., non-*Ampelomyces* sp., *Pseudozyma* sp., *Streptomyces* sp, *Burkholderia* sp, *Trichoderma* sp, *Gliocladium* sp. Alternatively, the agent may be a natural oil or oil-product having fungicidal and/or insecticidal activity (e.g., paraffinic oil, tea tree oil, lemongrass oil, clove oil, cinnamon oil, citrus oil, rosemary oil).

The composition, in particular, may further comprise an insecticide. The insecticide may include but is not limited to avermectin, *Bacillus thuringiensis*, neem oil and

azadiractin, spinosads, *Chromobacterium subtsugae*, eucalyptus extract, entomopathogenic bacterium or fungi such a *Beauveria bassiana, and Metarrhizium anisopliae* and chemical insecticides including but not limited to organochlorine compounds, organophosphorous compounds, carbamates, pyrethroids, and neonicotinoids.

The composition my further comprise a nematicide. The nematicide may include, but is not limited to chemical nematicides such as fenamiphos, aldicarb, oxamyl, carbofuran, natural product neamticide, avermectin, the fungi *Paecilomyces lilacinas and Muscodor spp.*, the bacteria *Bacillus firmus and other Bacillus spp.* and *Pasteuria penetrans*.

The composition may further comprise a biofungicide such as extract of *R. sachalinensis* (Regalia) or a fungicide. Such fungicides include, but are not limited to, a single site anti-fungal agent which may include but is not limited to benzimidazole, a demethylation inhibitor (DMI) (e.g., imidazole, piperazine, pyrimidine, triazole), morpholine, hydroxypyrimidine, anilinopyrimidine, phosphorothiolate, quinone outside inhibitor, quinoline, dicarboximide, carboximide, phenylamide, anilinopyrimidine, phenylpyrrole, aromatic hydrocarbon, cinnamic acid, hydroxyanilide, antibiotic, polyoxin, acylamine, phthalimide, benzenoid (xylylalanine). In yet a further embodiment, the antifungal agent is a demethylation inhibitor selected from the group consisting of imidazole (e.g., triflumizole), piperazine, pyrimidine and triazole (e.g.,bitertanol, myclobutanil, penconazole, propiconazole, triadimefon, bromuconazole, cyproconazole, diniconazole, fenbuconazole, hexaconazole, tebuconazole, tetraconazole, propiconazole).

The antimicrobial agent may also be a multi-site non-inorganic, chemical fungicide selected from the group consisting of a nitrile (e.g., chloronitrile or fludioxonil), quinoxaline, sulphamide, phosphonate, phosphite, dithiocarbamate, chloralkythios, phenylpyridin-amine, cyano-acetamide oxime.

The compositions may be applied using methods known in the art. Specifically, these compositions may be applied to plants or plant parts. Plants are to be understood as meaning in the present context all plants and plant populations such as desired and undesired wild plants or crop plants (including naturally occurring crop plants). Crop plants can be plants which can be obtained by conventional plant breeding and optimization methods or by biotechnological and genetic engineering methods or by combinations of these methods, including the transgenic plants and including the plant cultivars protectable or not protectable by plant breeders' rights. Plant parts are to be understood as meaning all parts and organs of plants above and below the ground, such as shoot, leaf, flower and root, examples which may be mentioned being leaves, needles, stalks, stems, flowers, fruit bodies, fruits, seeds, roots, tubers and rhizomes. The plant parts also include harvested material, and vegetative and generative propagation material, for example cuttings, tubers, rhizomes, offshoots and seeds.

Treatment of the plants and plant parts with the compositions set forth above may be

carried out directly or by allowing the compositions to act on their surroundings, habitat or storage space by, for example, immersion, spraying, evaporation, fogging, scattering, painting on, injecting. In the case that the composition is applied to a seed, the composition may be applied to the seed as one or more coats prior to planting the seed using one or more coats using methods known in the art.

As noted above, the compositions may be herbicidal compositions. The composition may further comprise one or more herbicides. These may include, but are not limited to, a bioherbicide and/or a chemical herbicide. The bioherbicide may be selected from the group consisting of clove, cinnamon, lemongrass, citrus oils, orange peel oil, tentoxin, cornexistin, AAL-toxin, leptospermone, thaxtomin, sarmentine, momilactone B, sorgoleone, ascaulatoxin and ascaulatoxin aglycone. The chemical herbicide may include, but is not limited to, diflufenzopyr and salts thereof, dicamba and salts thereof, topramezone, tembotrione, S-metolachlor, atrazine, mesotrione, primisulfuron-methyl, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, nicosulfuron, thifensulfuron-methyl, asulam, metribuzin, diclofop-methyl, fluazifop, fenoxaprop-p-ethyl, asulam, oxyfluorfen, rimsulfuron, mecoprop, and quinclorac, thiobencarb, clomazone, cyhalofop, propanil, bensulfuron-methyl, penoxsulam, triclopyr, imazethapyr, halosulfuron-methyl, pendimethalin, bispyribac-sodium, carfentrazone ethyl, sodium bentazon/sodium acifluorfen, glyphosate, glufosinate and orthosulfamuron.

Herbicidal compositions may be applied in liquid or solid form as pre-emergence or post-emergence formulations.

For pre-emergence dry formulations, the granule size of the carrier is typically 1-2 mm (diameter) but the granules can be either smaller or larger depending on the required ground coverage. Granules may comprise porous or non-porous particles.

For post-emergence formulations, the formulation components used may contain smectite clays, attapulgite clays and similar swelling clays, thickeners such as xanthan gums, gum Arabic and other polysaccharide thickeners as well as dispersion stabilizers such as nonionic surfactants (for example polyoxyethylene (20) monolaurate).

Uses

The compositions and pesticidal compounds derived from the *Burkholderia* strain set forth herein may be used as pesticides, particularly as insecticides, nematocides, fungicides and herbicides.

Specifically, nematodes that may be controlled using the method set forth above include but are not limited to parasitic nematodes such as root-knot, ring, sting, lance, cyst, and lesion nematodes, including but not limited to *Meloidogyne, Heterodera* and *Globodera* spp; particularly *Meloidogyne incognita* (root knot nematodes), as well as *Globodera rostochiensis* and *globodera pailida* (potato cyst nematodes); *Heterodera glycines* (soybean cyst nematode); *Heterodera schachtii* (beet cyst nematode); and *Heterodera avenae* (cereal

cyst nematode).

Phytopathogenic insects controlled by the method of the present invention include but are not limited to insects from the order (a) Lepidoptera, for example, *Acleris spp., Adoxophyes spp., Aegeria spp., Agrotis spp., Alabama argillaceae, Amylois spp., Anticarsia gemmatalis, Archips spp., Argyrotaenia spp., Autographa spp., Busseola fusca, Cadra cautella, Carposina nipponensis, Chilo spp., Choristoneura spp., Clysia ambiguella, Cnaphalocrocis spp., Cnephasia spp., Cochylis spp., Coleophora spp., Crocidolomia binotalis, Cryptophlebia leucotreta, Cydia spp., Diatraea spp., Diparopsis castanea, Earias spp., Ephestia spp., Eucosma spp., Eupoecilia ambiguella, Euproctis spp., Euxoa spp., Grapholita spp., Hedya nubiferana, Heliothis spp., Hellula undalis, Hyphantria cunea, Keiferia lycopersicella, Leucoptera scitella, Lithocollethis spp., Lobesia botrana, Lymantria spp., Lyonetia spp., Malacosoma spp., Mamestra brassicae, Manduca sexta, Operophtera spp., Ostrinia nubilalis, Pammene spp., Pandemis spp., Panolis flammea, Pectinophora gossypiella, Phthorimaea operculella, Pieris rapae, Pieris spp., Plutella xylostella, Prays spp., Scirpophaga spp., Sesamia spp., Sparganothis spp., Spodoptera spp., Synanthedon spp., Thaumetopoea spp., Tortrix spp., Trichoplusia ni and Yponomeuta spp.;*

(b) Coleoptera, for example, *Agriotes spp., Anthonomus spp., Atomaria linearis, Chaetocnema tibialis, Cosmopolites spp., Curculio spp., Dermestes spp., Diabrotica spp., Epilachna spp., Eremnus spp., Leptinotarsa decemlineata, Lissorhoptrus spp., Melolontha spp., Orycaephilus spp., Otiorhynchus spp., Phlyctinus spp., Popillia spp., Psylliodes spp., Rhizopertha spp-, Scarabeidae, Sitophilus spp., Sitotroga spp., Tenebrio spp., Tribolium spp. and Trogoderma spp.; (c) Orthoptera, for example, Blatta spp., Blattella spp., Gryllotalpa spp., Leucophaea maderae, Locusta spp., Periplaneta spp. and Schistocerca spp.; (d) Isoptera, for example, Reticulitermes spp.; (e) Psocoptera, for example, Liposcelis spp.; (f) Anoplura, for example, Haematopinus spp., Linognathus spp., Pediculus spp., Pemphigus spp. and Phylloxera spp.; (g) Mallophaga, for example, Damalinea spp. and Trichodectes spp.; (h) Thysanoptera, for example, Frankliniella spp., Hercinotnrips spp., Taeniothrips spp., Thrips palmi, Thrips tabaci and Scirtothrips aurantii; (i) Heteroptera, for example, Cimex spp., Distantiella theobroma, Dysdercus spp., Euchistus spp., Eurygaster spp., Leptocorisa spp., Nezara spp., Piesma spp., Rhodnius spp., Sahlbergella singularis, Scotinophara spp. and Tniatoma spp.; (j) Homoptera, for example, Aleurothrixus floccosus, Aleyrodes brassicae, Aonidiella spp., Aphididae, Aphis spp., Aspidiotus spp., Bemisia tabaci, Ceroplaster spp., Chrysomphalus aonidium, Chrysomphalus dictyospermi, Coccus hesperidum, Empoasca spp., Eriosoma larigerum, Erythroneura spp., Gascardia spp., Laodelphax spp., Lecanium corni, Lepidosaphes spp., Macrosiphus spp., Myzus spp., Nephotettix spp., Nilaparvata spp., Paratoria spp., Pemphigus spp., Planococcus spp., Pseudaulacaspis spp., Pseudococcus spp., Psylla spp., Pulvinaria aethiopica, Quadraspidiotus spp., Rhopalosiphum spp., Saissetia spp., Scaphoideus spp., Schizaphis spp., Sitobion spp., Trialeurodes vaporariorum, Trioza*

erytreae and Unaspis citri; (k) Hymenoptera, for example, Acromyrmex, Atta spp., Cephus spp., Diprion spp., Diprionidae, Gilpinia polytoma, Hoplocampa spp., Lasius spp., Monomorium pharaonis, Neodiprion spp., Solenopsis spp. and Vespa spp.; (l) Diptera, for example, Aedes spp., Antherigona soccata, Bibio hortulanus, Calliphora erythrocephala, Ceratitis spp., Chrysomyia spp., Culex spp., Cuterebra spp., Dacus spp., Drosophila melanogaster, Fannia spp., Gastrophilus spp., Glossina spp., Hypoderma spp., Hyppobosca spp., Liriomyza spp., Lucilia spp., Melanagromyza spp., Musca spp., Oestrus spp., Orseolia spp., Oscinella frit, Pegomyia hyoscyami, Phorbia spp., Rhagoletis pomonella, Sciara spp., Stomoxys spp., Tabanus spp., Tannia spp. and Tipula spp.; (m) Siphonaptera, for example, Ceratophyllus spp. und Xenopsylla cheopis and (n) from the order Thysanura, for example, *Lepisma saccharina*. The active ingredients according to the invention may further be used for controlling crucifer flea beetles (*Phyllotreta* spp.), root maggots (*Delia* spp.), cabbage seedpod weevil (*Ceutorhynchus* spp.) and aphids in oil seed crops such as canola (rape), mustard seed, and hybrids thereof, and also rice and maize.

In a particular embodiment, the insect may be a member of the *Spodoptera*, more particularly, *Spodoptera exigua, Myzus persicae, Plutella xylostella* or *Euschistus* sp.

The substances and compositions may also be used to modulate emergence in either a pre-emergent or post-emergent formulation of monocotyledonous, sedge or dicotyledonous weeds. In a particular embodiment, the weeds may be *Chenopodium album, Abutilon theophrasti, Helianthus annuus, Ambrosia artemesifolia, Amaranthus retroflexus, Convolvulus arvensis, Brassica kaber, Taraxacum officinale, Solanum nigrum, Malva neglect,, Setaria lutescens, Bromus tectorum, Poa annua, Poa pratensis, Lolium perenne* L. var. Pace, *Festuca arundinaceae Schreb.* var. Aztec II, Anthem II, LS1100, *Echinochloa crus-galli, Lactuca sativa*. The *Burkholderia* strain, compounds and compositions set forth above may also be used as a fungicide. The targeted fungus may be a *Fusarium* sp., *Botrytis* sp., *Monilinia* sp., *Colletotrichum sp, Verticillium sp.*; *Microphomina* sp., *Phytophtora sp, Mucor* sp., *Podosphaera* sp. *Rhizoctonia sp., Peronospora sp., Geotrichum sp., Phoma, and Penicillium.* In another most particular embodiment, the bacteria are *Xanthomonas.*

The invention will now be described in greater detail by reference to the following non-limiting examples.

EXAMPLES

The compositions and methods set forth above will be further illustrated in the following, non-limiting Examples. The examples are illustrative of various embodiments only and do not limit the claimed invention regarding the materials, conditions, weight ratios, process parameters and the like recited herein.

1. Example 1. Isolation and identification of the microbe

1.1 Isolation of the microorganism

The microbe is isolated using established techniques know to the art from a soil sample collected under an evergreen tree at the Rinnoji Temple, Nikko, Japan. The isolation is done using potato dextrose agar (PDA) using a procedure described in detail by Lorch et al. , 1995. In this procedure, the soil sample is first diluted in sterile water, after which it is plated in a solid agar medium such as potato dextrose agar (PDA). The plates are grown at 25°C for five days, after which individual microbial colonies are isolated into separate PDA plates. The isolated bacterium is gram negative, and it forms round, opaque cream-colored colonies that change to pink and pinkish-brown in color and mucoid or slimy over time.

1.2. Identification on the microorganism

The microbe is identified based on gene sequencing using universal bacterial primers to amplify the 16S rRNA region. The following protocol is used: *Burkholderia sp* A396 is cultured on potato-dextrose agar plates. Growth from a 24 hour-old plate is scraped with a sterile loop and re-suspended in DNA extraction buffer. DNA is extracted using the MoBio Ultra Clean Microbial DNA extraction kit. DNA extract is checked for quality/quantity by running 5μl on a 1% agarose gel.

PCR reactions are set up as follows: 2 μl DNA extract, 5 μl PCR buffer, 1 μl dNTPs (10 mM each), 1.25 μl forward primer (27F; 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' (SEQ ID NO:1), 1.25 μl reverse primer (907R; 5'-CCGTCAATTCCTTTGAGTTT-3' (SEQ ID NO:2)) and 0.25 μl Taq enzyme. The reaction volume is made up to 50 μl using sterile nuclease-free water. The PCR reaction includes an initial denaturation step at 95°C for 10 minutes, followed by 30 cycles of 94°C/30 sec, 57°C/20 sec, 72°C/30 sec, and a final extension step at 72°C for 10 minutes.

The product's approximate concentration and size is calculated by running a 5 μl volume on a 1% agarose gel and comparing the product band to a mass ladder.

Excess primers, dNTPs and enzyme are removed from the PCR product with the MoBio PCR clean up kit. The cleaned PCR product as directly sequenced using primers 27F (same as above), 530F (5'-GTGCCAGCCGCCGCGG-3' (SEQ ID NO:3)), 1114F (5'-GCAACGAGCGCAACCC (SEQ ID NO:4)) and 1525R (5'-AAGGAGGTGWTCCARCC-3' (SEQ ID NO:5)), 1100R (5'-GGGTTGCGCTCGTTG-3' (SEQ ID NO:6)), 519R (5'-GWATTACCGCGGCKGCTG-3' (SEQ ID NO:7).

The 16S rRNA gene sequence of strain A396 is compared with the available 16s rRNA gene sequences of representatives of the β-proteobacteria using BLAST. Strain A395 A396 is closely related to members of the *Burkholderia cepacia* complex, with 99% or higher similarity to several isolates of *Burkholderia multivorans*, *Burkholderia vietnamensis*, and *Burkholderia cepacia*. A BLAST search excluding the *B. cepacia*

complex, showed 98% similarity to *B. plantarii, B. gladioli* and *Burkholderia sp.* isolates.

A distance tree of results using the neighbor joining method, showed that A396 is related to *Burkholderia multivorans* and other *Burkholderia cepacia* complex isolates. *Burkholderia plantarii* and *Burkholderia glumae* grouped in a separate branch of the tree.

The isolated *Burkholderia* strain was found to contain the following sequences: forward sequence, DNA sequence with 27F primer, 815 nucleotides (SEQ ID NO:8); reverse sequence, 1453 bp, using primers 1525R, 1100R, 519R (SEQ ID NO:9); reverse sequence 824 bp using primer 907R (SEQ NO: 10); forward sequence 1152 bp using primer 530F (SEQ ID NO:11); forward sequence 1067 bp using 1114F primer (SEQ ID NO:12); reverse sequence 1223 bp using 1525R primer (SEQ NO:13); reverse sequence 1216 bp using 1100R primer (SEQ ID NO:14); reverse sequence 1194 bp using 519R primer (SEQ ID NO:15).

1.3. Proof that Burkholderia A396 does not belong to Burkholderia cepacia complex

1.3.1 Molecular Biology work using specific PCR primers

In order to confirm the identification of *Burkholderia A396* as *Burkholderia multivorans*, additional sequencing of housekeeping genes is performed. *Burkholderia multivorans* is a known member of the *Burkholderia cepacia* complex. Efforts are focused on PCR of recA genes, as described by Mahenthiralingam et al., 2000. The following primers are used: (a) BCR1 and BCR2 set forth in Mahenthiralingam et al., 2000 to confirm *B. cepacia* complex match and (b) BCRBM1 and BCRBM2 set forth Mahenthiralingam et al, 2000 to confirm *B. multivorans* match. A product-yielding PCR reaction for the first primer set would confirm that the microbe belongs to the *B. cepacia* complex. A product-yielding PCR reaction for the second primer set would confirm that the microbe is indeed *B. multivorans*.

No PCR product is obtained for either pair of primers. The performance of the PCR reaction and primers is tested using *Burkholderia multivorans* ATCC 17616 (positive control) and *Pseudomonas fluorescens* (negative control). Strong bands are observed both for *B. multivorans* using both sets of primers. No bands are observed for *Pseudomonas fluorescens*. The results indicate that A396 is a Burkholderia, but not a member of the *B. cepacia* complex, and not *Burkholderia multivorans*. This is also demonstrated in a comparative culture experiment in which both A396 and a type culture of *B. multivorans* are grown side-by-side in a shake culture, and the growth is monitored daily using optical density measurements at 600 nm. Under the set conditions, the novel species A396 grew much faster than the *B. multivorans* type strain (Figure 1).

1.3.2 DNA-DNA Hybridization

In order to confirm that isolate A396 is a new species of *Burkholderia*, a DNA-DNA hybridization experiment with *Burkholderia multivorans* (the closest 16S rRNA sequence

match) is conducted. Biomass for both A396 and *B. multivorans* is produced in ISP2 broth, grown over 48 hours at 200 rpm/25°C in Fernbach flasks. The biomass is aseptically harvested by centrifugation. The broth is decanted and the cell pellet is resuspended in a 1:1 solution of water: isopropanol. DNA-DNA hybridization experiments are performed by the DSMZ, the German Collection of Microorganisms and Cell Cultures in Germany. DNA is isolated using a French pressure cell (Thermo Spectronic) and is purified by chromatography on hydroxyapatite as described by Cashion et al., 1977. DNA-DNA hybridization is carried out as described by De Ley et al., 1970 under consideration of the modifications described by Huss et al., 1983 using a model Cary 100 Bio UV/VIS-spectrophotometer equipped with a Peltier thermostatted 6x6 multicell changer and a temperature controller with *in-situ* temperature probe (Varian). DSMZ reported % DNA-DNA similarly between A396 and *Burkholderia multivorans* of 37.4%. The results indicate that *Burkholderia sp* strain A396 does not belong to the species *Burkholderia multivorans* when the recommendations of a threshold value of 70% DNA-DNA similarity for the definition of bacterial species by the ad hoc committee (Wayne et al., 1987) are considered.

1.4. Biochemical profile using Biolog GN2 plates

For the carbon source utilization profile, A396 is grown overnight on Potato Dextrose Agar (PDA). The culture is transferred to BUG agar to produce an adequate culture for Biolog experiments as recommended by the manufacturer (Biolog, Hayward, CA).

The biochemical profile of the microorganism is determined by inoculating onto a Biolog GN2 plate and reading the plate after a 24-hour incubation using the MicroLog 4-automated microstation system. Identification of the unknown bacteria is attempted by comparing its carbon utilization pattern with the Microlog 4 Gram negative database.

No clear definitive matches are found to the Biolog profile. The closest matches all had less than 35% similarity with A396: *Pseudomonas spinosa (Burkholderia), Burkholderia cepacia, and Burkholderia pseudomallei*. The results are shown in Table I.

Table 1. Biochemical Profile of A396

Substrate	Result	Substrate	Result
Cyclodextrin	-	L-arabinose	-
Dextrin	-	D-arabitol	-
Glycogen	-	D-cellobiose	-
Tween 40	+	Erythritol	-
Tween 80	+	D-Fructose	-
N-acetyl-D-Galactoseamine	-	L-Fucose	-
N-acetyl-D-glucosamine	-	D-Galactose	+/-
Adonitol	-	Gentibiose	-
Succinic Acid Mon-methyl ester	-	D-Glucose	+
Acetic acid	-	m-Inositol	-
Cis-aconitic acid	-	D-Lactose	-
Citric acid	-	Lactulose	-
Formic acid	+	Maltose	-
D-Galactonic Acid Lactone	-	D-Mannitol	-
D-Galacturonic Acid	-	D-Mannose	-
D-Gluconic acid	-	D-Melibiose	-
D-Glucosaminic acid	-	β-methyl-D-glucoside	-
D-Glucuronic Acid	-	D-Psicose	-
α-hydroxyburytic acid	-	D-Raffinose	-
β-hydroxybutyric acid	+	L-Rhamonose	-
γ-hydroxybutyric acid	-	D-Sorbitol	-
p-hydroxyphenylacetic acid	-	Sucrose	-
Itaconic acid	-	D-Trehalose	+
α-keto butyric acid	-	Turanose	-
α-keto glutaric acid	-	Xylitol	-
α-ket valeric acid	-	Pyruvic Acid Methyl esther	-
D,L-Lactic acid	-	Uridine	-
Malonic acid	-	Thymidine	-
Propionic acid	+	Phenyethyl-amine	-
Quinic acid	-	Putrescine	-
D-Saccharic acid	-	2-aminoethanol	-
Sebacic acid	-	2,3-Butanediol	-
Succinic Acid	+	Glycerol	+/-
Bromosuccinic acid	-	D,L-a-glycerol phosphate	+/-
Succinamic acid	-	α-D-Glucose-1-phosphate	-
Glucuronamide	-	D-glucose-6-phosphate	+
L-alaninamide	+	γ-amino butyric acid	+
D-Alanine	-	Urocanic acid	-
L-alanine	+	Inosine	-
L-alanyl-glycine	-	L-phenylalanine	+
L-asparagine	+	L-proline	-
L-aspartic acid	+/-	L-pyroglutamic acid	-
L-glutamic acid	+	D-serine	-
Glycyl-L-Aspartic acid	-	L-serine	-
Glycyl-L-glutamic acid	-	L-threonine	-
L-histidine	-	D,L-carnitine	-
Hydroxy-L-proline	+	L-ornithine	-
L-leucine	-		

1.5. Fatty acid composition

After incubation for 24 hours at 28°C, a loopful of well-grown cells are harvested and fatty acid methyl esters are prepared, separated and identified using the Sherlock

Microbial Identification System (MIDI) as described (see Vandamme et al., 1992). The predominant fatty acids present in the *Burkholderia* A396 are as follows: 16:0 (24.4%), cyclo 17:0 (7.1%), 16:0 3- OH (4.4%), 14:0 (3.6%), 19:0 ω8*c* (2.6%) cyclo, 18:0 (1.0%). Summed feature 8 (comprising 18:1 ω7*c*) and summed feature 3 (comprising of 16:1 ω7c and 16:1 ω6*c*) corresponded to 26.2% and 20.2 % of the total peak area, respectively. Summed feature 2 comprising 12:0 ALDE, 16:1 iso I, and 14:0 3-OH) corresponded to 5.8% of the total peak area while summed feature 5 comprising 18:0 ANTE and 18:2 ω6,9c corresponded to 0.4%. Other fatty acids detected in A396 in minor quantities included: 13:1 at 12-13 (0.2%), 14:1 ω5c (0.2%), 15:0 3-OH (0.13%), 17:1 ω7c (0.14%), 17:0 (0.15%), 16:0 iso 3-OH (0.2%), 16:0 2-OH (0.8%), 18:1 ω7c 11-methyl (0.15%), and 18:1 2-OH (0.4%).

A comparison of the fatty acid composition of A396 with those of known microbial strains in the MIDI database suggested that the fatty acids in the novel strain A396 were most similar with those of *Burkholderia cenocepacia*.

1.6 Resistance to Antibiotics

Antibiotic susceptibility of *Burkholderia A396* is tested using antibiotic disks on Muller-Hinton medium as described in PML Microbiological's technical data sheet #535. Results obtained after 72-hour incubation at 25°C are presented in Table 2 below.

Table 2: Susceptibility of MBI-206 to various antibiotics. +++ very susceptible, ++ susceptible, - resistant

	Concentration (ug)	Susceptible
Tetracycline	30	-
Kanamycin	30	+++
Erythromycin	15	-
Streptomycin	10	-
Penicillin	10	-
Ampicillin	10	-
Oxytetracycline	30	-
Chloramphenicol	30	++
Ciprofloxacin	5	++
Gentamicin	10	-
Piperacillin	100	+++
Cefuroxime	30	-
Imipenem	10	+++
Sulphamethoxazole-Trimethoprim	23.75/ 25	++

The results indicate that the antibiotic susceptibility spectrum of *Burkholderia A396* is quite different from pathogenic *B. cepacia* complex strains. *Burkholderia A396* is susceptible to kanamycin, chloramphenicol, ciprofloxacin, piperacillin, imipenem, and a combination of sulphamethoxazole and trimethoprim. As a comparison, Zhou et al., 2007 tested the susceptibility of 2,621 different strains in *B. cepacia complex* isolated from cystic fibrosis patients, and found that only 7% and 5% of all strains were susceptible to imipenem or ciprofloxacin, respectively. They also found 85% of all strains to be resistant to chloramphenicol (15% susceptible), and 95% to be resistant (5% susceptible) to the combination of sulphamethoxazole and trimethoprim. Results of Zhou et al., 2007 are similar to those of Pitt et al., 1996 who determined antibiotic resistance among 366 *B. cepacia* isolates and reported that most of them are resistant to ciprofloxacin, cefuroxime, imipenem, chloramphenicol, tetracycline, and sulphametoxacole.

2. Example 2. Burkholderia sp. as an Herbicide

2.1 Study #1

To confirm the activity found in the initial herbicide screen, an *in vivo* study is conducted using the Amberlite 7 XAD resin extract derived from a 5-day old whole cell

broth of the novel *Burkholderia* species. The dried crude extract is resuspended in 4% ethanol and 0.2 % non-ionic surfactant (glycosperse) at a concentration of 10 mg/mL, and further diluted to a concentration of 5.0 mg/mL. The two samples are sprayed on 4-week old plants of bindweed (*Convolvulus arvensis*), and the plants are kept under growth lights at 25°C for 2 weeks, at which point, the phytotoxicity evaluations are performed. In the same study, 2-week old redroot pigweed plants are sprayed with increasing concentrations of the crude extract derived from the bacterial culture. The test concentrations are 1.25, 2.5, 5.0 and 10.0 mg/mL, and the plants are incubated as described above before phytotoxicity evaluations.

Results presented in Figures 2 (bindweed) and 3 (pigweed) show the phytotoxic effect of Burkholderia crude extract at different concentrations, and they show good herbicidal effect on pigweed even at low treatment concentrations. Both extract treatments (5 and 10 mg/mL) result in stunting on bindweed.

2.2 Study #2

A novel strain of *Burkholderia sp.* A396 is grown in an undefined mineral medium for 5 days (25°C, 200 rpm). The whole cell broth is extracted using XAD7 resin. The dried crude extract is resuspended in 4% ethanol and 0.2 % non-ionic surfactant at a concentration of 10 mg/mL, and further diluted to concentrations of 5.0, 2.5, and 1.25 mg/mL. All four test solutions are then tested on the following broadleaf and grass weed species listed in Table 3:

Table 3. Broadleaf and Grass Weed Species Tested

Common Name	Scientific Name
Lambsquarter	*Chenopodium album*
Horseweed	*Conyza canadensis*
Curlydock	*Rumex crispus*
Crabgrass	*Digitaria sanguinalis*
Bluegrass	*Poa annua*
Dandelion	*Taraxacum officinale*
Nightshade	*Solanum nigrum*
Mustard	*Brassica kaber*
Mallow	*Malva neglecta*
Cocklebur	*Xanthium pensylvanicum*
Bermuda Grass	*Cynodon dactylon*
Foxtail	*Setaria lutescens*
Sowthistle	*Sonchus oleraceus*

A solution of 0.2 % glycosperse and Roundup at 6 fl oz per gallon rate is used as negative and positive controls, respectively.

All plant species are tested in 4"x4" plastic pots in three replicates. The untreated control plants are sprayed with the carrier solution (4% Ethanol, 0.2% glycosperse) and the positive control plants with Roundup at a rate corresponding to 6 fl. oz/acre. Treated plants are kept in a greenhouse under 12h light/12h dark conditions. Phytotoxicity data taken 22 days after treatment for species #1-8 and 12 days for species #9-12 are presented in Tables 5

and 6, respectively. The rating scale for both tables is shown in Table 4:

Table 4. Rating Scale

Rating Scale	% Control
0	0
1	<10
2	25
3	50
4	75
5	100

Table 5. Phytotoxicity Data for Species #1-8

Treatment	Horseweed	Lambsquarter	Dandelion	Curlydock	Crabgrass	Mustard	Nightshade	Bluegrass
UTC	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.7	0.0	0.0
1.25 mg/mL	0.0	4.7	0.0	0.0	0.0	4.3	0.0	0.0
2.5 mg/mL	0.7	4.5	0.0	0.0	0.0	4.7	0.0	0.0
5.0 mg/mL	4.3	5.0	0.0	0.0	0.0	5.0	0.0	0.0
10.0 mg/mL	4.7	5.0	0.0	0.0*	0.0	5.0	1.5	0.0
Roundup	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
	* stunting that resulted in plants approximately half the size of untreated plants							

Table 6. Phytotoxicity Data for Species #9-12

Treatment	Cocklebur	Foxtail	Bermuda Grass	Sowthistle	Mallow
UTC	0.0	0.7	0.0	0.0	2.8
1.25 mg/mL	0.5	0.3	0.3	0.0	2.0
2.5 mg/mL	0.5	0.7	0.5	0.0	2.7
5.0 mg/mL	0.8	0.3	0.2	0.0	2.2
10.0 mg/mL	0.7	0.7	0.3	0.2	1.7
Roundup	4.7	4.8	4.7	5.0	5.0

Based on the results obtained in these studies, the compounds extracted from fermentation broths of the isolated *Burkholderia* species had herbicidal activity against several weed species are tested. Of the twelve species tested, Lambsquarters and mustard are most susceptible, followed by mallow and horseweed. Extract concentration as low as 1.25 mg/mL is able to provide almost complete control of Lambsquarters and mustard, whereas higher concentration is required for the mallow and horseweed.

In a separate experiment, using the same design as described above, systemic activity is tested. A 10 mg/ml crude extract supernatant of *Burkholderia sp. A396* is painted onto first true leaves of Ragweed, Mustard, Nightshade, Crabgrass, Wheat and Barnyard Grass. Seedlings are evaluated 7 days after treatment. Observed symptoms include: burning, warping, bleaching Herbicidal activity is observed in the next leaf above the treated leaf in Ragweed, Mustard and Nightshade. No systemic activity is observed in the

tested grasses. In a second experiment. five fractions of the same crude extract (10 mg/ml) are evaluated using the same experimental design as described above. Seedlings of Mustard, Wheat and Crabgrass are treated. Seven and 20 days after treatment, symptoms of herbicidal activity are observed in Mustard from four out of the five fractions (091113B4F6, 091113B4F7, 091113B4F8 and 091113B4F9) using a C-18 column (Phenomenex Sepra C18-E, 50 μm, 65Å). Symptoms are observed in the next leaf above the treated leaf. No systemic activity is observed in the tested grasses.

3. Example 3. *Burkholderia* sp. as an Insecticide

3.1. Contact Activity Studies

The following assay is used in the initial screening phase to determine if the compounds derived from a culture of the novel *Burkholderia* species has contact activity against a Lepidopteran pest (larvae). It is further used as a tool for the bioassay-guided fractionation to determine the active fractions and peaks derived from the whole-cell-broth extract. The test is conducted in individual 1.25 oz plastic cups using either Cabbage looper (*Tricoplusia ni*) late third instar larvae or Beet Armyworm (*Spodoptera exigua*) early third instar larvae. A 1cm x 1cm piece of solid Beet armyworm diet is placed in the center of each cup together with one larvae. A 1µl aliquot of each treatment (whole cell broth or extract from a 5-day-old *Burkholderia* A396 culture) is injected on each larvae thorax (dorsal side) using a Hamilton Precision Syringe. Each treatment is replicated ten times. Water is used as a negative control treatment and malathion as the positive control treatment. After injection, each cup is covered with parafilm with an airhole, and the cups are incubated for three days at 26°C. Mortality evaluations are done daily, starting 24 hours after the treatment.

Figures 4 and 5 present the results from contact activity tests. According to the results, the filter-sterilized broth from a *Burkholderia* sp culture killed about 40% of all test insects within 3 days. Diluted broth (50%) has lower activity, resulting in about 10% control in both insects tested.

3.2. Activity Against Larvae Through Feeding

Direct toxicity via feeding is tested using the diet-overlay tests with following 96-well plate assay format using microtiter plates with 200 µl of solid, artificial Beet Armyworm diet in each well. One hundred (100) microliters of each test sample is pipetted on the top of the diet (one sample in each well), and the sample is let dry under flowing air until the surface is dry. Each sample (filter-sterilized through a 0.2 micron filter) is tested in six replicates, and water and a commercial Bt (*B. thuringiensis*) product are used as negative and positive controls, respectively. One third instar larvae of the test insect (Cabbage looper-*Trichoplusia ni*; Beet armyworm – *Spodoptera exiqua*; Diamondback

Moth – *Plutella xylostella*) is placed in each well, and the plate is covered with plastic cover with airholes. The plates with insects are incubated at 26°C for 6 days with daily mortality evaluations.

Figure 5 represents data from a diet overlay study with Beet Armyworm (*Spodoptera exigua*) early third instar larvae tested at four different broth concentrations:1x (100%) ,1/4x (25%), 1/8x (12.5%), 1/16x (6.125%). The data shows that the undiluted, filter-sterilized broth is able to give 100% control at the end of the 7-day incubation period. Similar control is obtained with a 4-fold dilution of the broth, and in the end of the study, both undiluted and 4-fold diluted broths are comparable to Bt used as a positive control. However, the effect of Bt is significantly faster than that of the *Burkholderia* broths. Efficacy against armyworm larvae is dependent on broth concentration, and the two lowest broth concentrations (12.5% and 6.125%) provided less control than the two highest ones. However, the performance of the 12.5% dilution is not much lower than the 25% dilution. The 16-fold dilution of broth is clearly not efficient enough, and it only provided partial (33%) control of armyworm larvae during this 7-day study. The corresponding mortality rates for the same broth dilution used on cabbage loopers and diamondback moth larvae are a little higher with 6.125% broth killing 80% and 50% of larvae, respectively.

3.3. In vitro activity against sucking insects

Five stinkbug (*Euschistus* sp.) adults are placed in each 16 oz plastic container lined with a piece of paper towel. A microcentrifuge tube containing 2 mL of each test sample (filter sterilized whole broth) is capped with a cotton ball, and laid down on the bottom of the plastic container. One sunflower seed is placed next to the tube as bait. Water and a commercial product with a mixture of pyrethrin and PBO at a recommended rate are used as negative and positive controls, respectively. Each container is closed with a lid, and they are incubated at 25°C for 7 days with daily mortality checks.

Results are presented below in Table 7 and they show about 80% control of sucking insect (stinkbug) by day 7 in this *in vitro* system with 50% diluted broth. In this study, the diluted fermentation broth of *Burkholderia* A396 is more effective in controlling stinkbugs than the commercial product used as a positive control. Interestingly, the non-diluted broth resulted in lower insect control, which might be an indication of antifeedant (feeding inhibition) properties of the active secondary metabolites produced by this new species of *Burkholderia*.

Table 7. Effect of A396 on Stinkbugs

Treatment	% control (Day 3)	% control (Day 5)	% control (Day 7)
A396 undil. broth (1x)	0	0	40
A396 broth dil. 50% (0.5x)	20	20	80
Pyrethrin+PBO (pos control)	0	0	40
Water (neg control)	0	0	0

4. Example 4. Sucking insect test *in vivo*

The *in vivo* efficacy of the filtered whole cell broth is tested in a plant assay with mustard plants and green peach aphid (*Myzus persicae*) as the test insect. Approximately one-month-old Florida Broadleaf mustard (*Brassica* sp.) plants are sprayed with two different concentrations (1x and 0.5x) of the filter sterilized whole cell broth of *Burkholderia* sp. using a Paasche airbrush. Water and a commercial product of avermectin (Avid) are used as negative and positive controls, respectively. The plants are allowed to dry on the benchtop, after which they are placed in a 6-cup plastic container with a lid with airholes. Ten aphids at various developmental stages are placed on each test plant, and the plants are incubated under growth lamps for 7 days at 25°C. Daily evaluations for the number of aphids on each plant (summarized in table Table 8 below) are made and recorded in a notebook.

Table 8. In vivo Efficacy of A396 on Green Peach Aphids

Treatment	# live aphids Day 0	# live aphids Day 2	# live aphids Day 4	# live aphids Day 7
A396 undiluted broth (1x)	10	36	88	145
A396 broth diluted (0.5x)	10	47	138	217
Avermectin (pos control)	10	0	0	0
Water (neg control)	10	140	364	393

According to the results, both concentrations of the filter-sterilized broth derived from a culture of a novel species of *Burkholderia* are able to control the population growth of a sucking insect, *M. persicae*.

5. Example 5. Nematocidal Activity

5.1 Study #1

To assess the effect of filter-sterilized *Burkholderia* sp A396 culture broth on the motility (and subsequent recovery) of juvenile (J2) root-knot nematodes (*Meloidogyne incognita* VW6), the following test is conducted on 24-well plastic cell-culture plates:

A 300-ul aliquot of each test solution (either 1x or 0.5x filter-sterilized broth) is added into appropriate wells after which, fifteen nematodes dispensed in 10 µl of DI water are added into each well, plate is closed with a lid, and incubated at 25°C for 24 hours. Water and Avid at 20,000x dilution are used as negative and positive controls, respectively. Effect of each compound on nematode mobility is checked after 24 hours by probing each nematode with a needle, and the proportion of immobile nematodes in each treatment is recorded in a notebook using a % scale. To assess the recovery of mobility in each treatment, a volume of 200 µl is removed from each well, and the remaining solution in each well is diluted by adding 2 mL of DI water. Plates are again incubated for 24 hours as

described above, after which the second mobility evaluation is performed.

The results presented in Figure 6 show the filter-sterilized broth at both test concentrations can immobilize the free-living juvenile root-knot nematodes. This effect lasts at least for 24-hours, which suggests that Burkholderia A396 broth can be used to prevent plants from nematode infections.

5.2 Study #2

Materials and Methods

Mini Drench Test: *Burkholderia A396* whole cell broth is tested in a greenhouse assay conducted in 45 ml pots. Cucumber seeds cv. Toshka are sown directly into pots filled with a sandy loam soil. Ten days later, pots were each treated with 5 ml of a suspension. Specific amounts used are shown in Table 9:

Table 9

Compounds	*Burkholderia* strain A396 Fosthiazate (Standard, EC 150) (positive control)
Test species	*Meloidogyne sp.* applied at 3000 eggs per mini drench pot (in 2 ml)
Test plant	*Cucumis sativus* (cucumber cv. Toschka)
Test formulation	100% liquid formulation
Test concentrations	100, 50, 25, 12.5, 6, 3, 1.5 ml/L
Test application	Drench application

As indicated in Table 9, pots are inoculated with 3000 eggs of *M. incognita*. Four replicates were prepared for each treatment and rate. The trial was harvested fourteen days after trial application and inoculation. Root galling was assessed according to Zeck`s gall index (Zeck, 1971). Phytotoxicity was measured as a reduction of root galling in comparison to the control. The results are shown in Figures 9 and 10.

In *Mini Drench Test no. 1* (see Figure 9), the activity of the treatment was very high and a reduction of almost 100% was observed when applied at a concentration of 100 ml/L *Burkholderia A396*. Fosthiazate performed as usual (100% control at 20 ppm).

In Mini Drench Test no. 2 (see Figure 10) a 100% reduction of root galling was achieved at the highest concentration of 100 ml/L dropping to approximately 50% at 1.5 ml/L.Fosthiazate performed as usual (100% control at 20 ppm).

5.3 Study #3

To demonstrate the nematicidal activity of *Burkholderia A396*, a greenhouse study on cucumber (*Cucumis sativus*) is performed using a whole cell broth of *Burkholderia A396* as the test product to control root knot nematodes (*Meloidogyne incognita*). One cucumber plant per pot is planted in soil and grown in a greenhouse under artificial lights at 28°C. Each pot with a plant is treated with an aliquot (about 80 mL) of either the undiluted test product or a test product diluted to 5% with water. Each *Burkholderia* A396 treatment as

well as a positive control treatment with Temik (at a label rate) and a negative control with no additions consisted of five replicates. Plants are grown in a greenhouse for 60 days, after which each plant was harvested and evaluated for fresh shoot and root weights. Number of nematode eggs in each pot was recorded and a parameter indicating the number of eggs per a gram of root mass was calculated. Statistical analysis (ANOVA) is perfomed, and the statistical differences among treatment means at $p<0.1$ was calculated. Data presented in Table 10 below shows that even though not statistically different from the untreated control, the pots treated with A396 whole cell broth contained less nematode eggs than the untreated control pots. The effect calculated as number of eggs per root mass is more clear when undiluted broth is used as a treatment.

Table 10. The effect of A396 whole cell broth on the cucumber shoot and root weight, total number *of M. incognita* eggs per pot and the number of eggs per gram of root mass.

	shoot fresh wt		root fresh wt		# of eggs		# of eggs/g of root	
untreated	15.22	b	11.76	bc	67693	a	5252.0	ab
A396 5% v/v	11.89	b	6.914	c	56084	a	8419.4	a
A 396 undiluted	15.66	b	11.09	bc	40463	a	3929.2	ab
Temik 15 G 5 lb/a	29.54	a	29.74	a	68907	a	2604.4	b
LSD at $p < 0.1$	5.34		6.9879		36509.2		3317.07	

6. **Example 6. Isolation of Templazole A and B**

Methods and Materials

The following procedure is used for the purification of Templazole A and B extracted from cell culture of *Burkholderia sp* (see Figure 7):

The culture broth derived from the 10-L fermentation *Burkholderia* (A396) in Hy soy growth medium is extracted with Amberlite XAD-7 resin (Asolkar et al., 2006) by shaking the cell suspension with resin at 225 rpm for two hours at room temperature. The resin and cell mass are collected by filtration through cheesecloth and washed with DI water to remove salts. The resin, cell mass, and cheesecloth are then soaked for 2 h in acetone after which the acetone is filtered and dried under vacuum using rotary evaporator to give the crude extract. The crude extract is then fractionated by using reversed-phase C18 vacuum liquid chromatography (H_2O/CH_3OH; gradient 90:20 to 0:100%) to give 10 fractions. These fractions are then concentrated to dryness using rotary evaporator and the resulting dry residues are screened for biological activity using 96 well plate lettuce seeding assay. The active fractions are then subjected to reversed phase HPLC (Spectra System

P4000 (Thermo Scientific) to give pure compounds, which are then screened in above mentioned bioassays to locate/identify the active compounds. To confirm the identity of the compound, additional spectroscopic data such as LC/MS and NMR is recorded.

The active fraction **4** is purified further by using HPLC C-18 column (Phenomenex, Luna 10u C18(2) 100 A, 250 x 30), water:acetonitrile gradient solvent system (0-10 min; 80% aqueous CH_3CN, 10-25 min; 80 - 65% aqueous CH_3CN, 25-50 min; 65 - 50 % aqueous CH_3CN, 50-60 min; 50-70% CH_3CN, 60-80 min; 70–0% aqueous CH_3CN, 80-85 min; 0 – 20% aqueous CH_3CN) at 8 mL/min flow rate and UV detection of 210 nm, to give templazole B, retention time 46.65 min. The other active fraction **6** is also purified using HPLC C-18 column (Phenomenex, Luna 10u C18(2) 100 A, 250 x 30), water:acetonitrile gradient solvent system (0-10 min; 80 % aqueous CH_3CN, 10-25 min; 80 - 60 % aqueous CH_3CN, 25-50 min; 60 - 40% aqueous CH_3CN, 50-60 min; 40% CH_3CN, 60-80 min; 40–0% aqueous CH_3CN, 80-85 min; 0-20 % aqueous CH_3CN) at 8 mL/min flow rate and UV detection of 210 nm, to give templazole A, retention time 70.82 min.

Mass spectroscopy analysis of pure compounds is performed on a Thermo Finnigan LCQ Deca XP Plus electrospray (ESI) instrument using both positive and negative ionization modes in a full scan mode (m/z 100-1500 Da) on a LCQ DECA XP^{plus} Mass Spectrometer (Thermo Electron Corp., San Jose, CA). Thermo high performance liquid chromatography (HPLC) instrument equipped with Finnigan Surveyor PDA plus detector, autosampler plus, MS pump and a 4.6 mm x 100 mm Luna C18 5 μm column (Phenomenex). The solvent system consists of water (solvent A) and acetonitrile (solvent B). The mobile phase begins at 10% solvent B and is linearly increased to 100% solvent B over 20 min and then kept for 4 min, and finally returned to 10% solvent B over 3 min and kept for 3 min. The flow rate is 0.5 mL/min. The injection volume was 10 μL and the samples are kept at room temperature in an auto sampler. The compounds are analyzed by LC-MS utilizing the LC and reversed phase chromatography. Mass spectroscopy analysis of the present compounds is performed under the following conditions: The flow rate of the nitrogen gas was fixed at 30 and 15 arb for the sheath and aux/sweep gas flow rate, respectively. Electrospray ionization was performed with a spray voltage set at 5000 V and a capillary voltage at 35.0 V. The capillary temperature was set at 400°C. The data was analyzed on Xcalibur software. The active compound templazole A has a molecular mass of 298 and showed *m/z* ion at 297.34 in negative ionization mode. The LC-MS chromatogram for templazole B suggests a molecular mass of 258 and exhibited *m/z* ion at 257.74 in negative ionization mode.

^{1}H, ^{13}C and 2D NMR spectra were measured on a Bruker 500 MHz & 600 MHz gradient field spectrometer. The reference is set on the internal standard tetramethylsilane (TMS, 0.00 ppm).

For structure elucidation of templazole A, the purified compound with a molecular weight 298 is further analyzed using a 500 MHz NMR instrument, and has ^{1}H NMR δ values at 8.44, 8.74, 8.19, 7.47, 7.31, 3.98, 2.82, 2.33, 1.08 and has ^{13}C NMR δ values of 163.7, 161.2, 154.8, 136.1, 129.4, 125.4, 123.5, 123.3, 121.8, 121.5, 111.8, 104.7, 52.2, 37.3, 28.1, 22.7, 22.7. Templazole A has UV absorption bands at 226, 275, 327 nm, which suggested the presence of indole and oxazole rings. The molecular formula, $C_{17}H_{18}N_2O_3$, was determined by interpretation of ^{1}H, ^{13}C NMR and HRESI MS data *m/z* 299.1396 $(M+H)^+$ (Calcd for $C_{17}H_{19}N_2O_3$, 299.1397), which entails a high degree of unsaturation shown by 10 double bond equivalents. The ^{13}C NMR spectrum revealed signals for all 17 carbons, including two methyls, a methoxy, a methylene carbon, an aliphatic methine, an ester carbonyl, and eleven aromatic carbons. The presence of 3'-substituted indole was revealed from ^{1}H-^{1}H COSY and HMBC spectral data. The ^{1}H-^{1}H COSY and HMBC also indicated the presence of a carboxylic acid methyl ester group and a $-CH_2-CH-(CH_3)_2$ side chain. From the detailed analysis of ^{1}H-^{1}H COSY, ^{13}C, and HMBC data it was derived that the compound contained an oxazole nucleus. From the 2D analysis it was found that the iso-butyl side chain was attached at C-2 position, a carboxylic acid methyl ester at C-4 position and the indole unit at C-5 position to give templazole A.

The second herbicidally active compound, templazole B, with a molecular weight 258 is further analyzed using a 500 MHz NMR instrument, and has ^{1}H NMR δ values at 7.08, 7.06, 6.75, 3.75, 2.56, 2.15, 0.93, 0.93 and ^{13}C NMR values of δ 158.2, 156.3, 155.5, 132.6, 129.5, 129.5, 127.3, 121.8, 115.2, 115.2, 41.2, 35.3, 26.7, 21.5, 21.5. The molecular formula, is assigned as $C_{15}H_{18}N_2O_2$, which is determined by interpretation of ^{1}H, ^{13}C NMR and mass data. The ^{13}C NMR spectrum revealed signals for all 15 carbons, including two methyls, two methylene carbons, one aliphatic methine, one amide carbonyl, and nine aromatic carbons. The general nature of the structure was deduced from ^{1}H and ^{13}C NMR spectra that showed a *para*-substituted aromatic ring [δ 7.08 (2H, d, J = 8.8 Hz), 6.75 (2H, d, J = 8.8 Hz), and 132.7, 129.5, 115.2, 127.3, 115.2, 129.5]. The ^{1}H NMR spectrum of this structure together with the ^{1}H-^{1}H COSY and HSQC spectra, displayed characteristic signals for an isobutyl moiety [δ 0.93 (6H, d, J = 6.9 Hz), 2.15 (1H, sept., J = 6.9 Hz), 2.57 (2H, d, J = 6.9 Hz). In addition, an olefinic/aromatic proton at (δ 7.06, s), and a carbonyl carbon group (δ 158.9) were also found in the ^{1}H and ^{13}C NMR spectra. On inspection of the HMBC spectrum, the H-1' signal in the isobutyl moiety correlated with the olefinic carbon (C-2, δ 156.3), and the olefinic proton H-4 correlated with (C-5, δ 155.5; C-2, 156.3 & C-1'', 41.2). The methylene signal at δ 3.75 correlated with C-5, C-4 as well as the C-2'' of

the para-substituted aromatic moiety. All these observed correlations suggested the connectivity among the isobutyl, and the para-substituted benzyl moieties for the skeleton of the structure as shown. In addition, the carboxamide group is assigned at the para position of the benzyl moiety based on the HMBC correlation from the aromatic proton at H-4''& H-6'' position. Thus, based on the above data, the structure was designated as templazole B.

7. Example 7. Isolation of FR90128

The whole cell broth from the fermentation of *Burkholderia sp.* in an undefined growth medium is extracted with Amberlite XAD-7 resin (Asolkar et al., 2006) by shaking the cell suspension with resin at 225 rpm for two hours at room temperature. The resin and cell mass are collected by filtration through cheesecloth and washed with DI water to remove salts. The resin, cell mass, and cheesecloth are then soaked for 2 h in acetone after which the acetone is filtered and dried under vacuum using rotary evaporator to give the crude extract. The crude extract is then fractionated by using reversed-phase C18 vacuum liquid chromatography (H_2O/CH_3OH; gradient 90:20 to 0:100%) to give 10 fractions. These fractions are then concentrated to dryness using rotary evaporator and the resulting dry residues are screened for biological activity using both insect bioassay as well as herbicidal bioassay. The active fractions are then subjected to reversed/normal phase HPLC (Spectra System P4000; Thermo Scientific) to give pure compounds, which are then screened in herbicidal, insecticidal and nematicidal bioassays described below to locate/identify the active compounds. To confirm the identity of the compound, additional spectroscopic data such as LC/MS and NMR is recorded.

Mass spectroscopy analysis of active peaks is performed on a Thermo Finnigan LCQ Deca XP Plus electrospray (ESI) instrument using both positive and negative ionization modes in a full scan mode (m/z 100-1500 Da) on a LCQ DECA XP^{plus} Mass Spectrometer (Thermo Electron Corp., San Jose, CA). Thermo high performance liquid chromatography (HPLC) instrument equipped with Finnigan Surveyor PDA plus detector, autosampler plus, MS pump and a 4.6 mm x 100 mm Luna C18 5 μm column (Phenomenex). The solvent system consists of water (solvent A) and acetonitrile (solvent B). The mobile phase begins at 10% solvent B and is linearly increased to 100% solvent B over 20 min and then kept for 4 min, and finally returned to 10% solvent B over 3 min and kept for 3 min. The flow rate is 0.5 mL/min. The injection volume is 10 μL and the samples are kept at room temperature in an auto sampler. The compounds are analyzed by LC-MS utilizing the LC and reversed phase chromatography. Mass spectroscopy analysis of the present compounds is performed under the following conditions: The flow rate of the nitrogen gas is fixed at 30 and 15 arb for the sheath and aux/sweep gas flow rate, respectively. Electrospray ionization is performed with a spray voltage set at 5000 V and a

capillary voltage at 35.0 V. The capillary temperature is set at 400°C. The data is analyzed on Xcalibur software. Based on the LC-MS analysis, the active insecticidal compound from fraction **5** has a molecular mass of 540 in negative ionization mode.

For structure elucidation, the purified insecticidal compound from fraction **5** with molecular weight 540 is further analyzed using a 500 MHz NMR instrument, and has ^{1}H NMR values at 6.22, 5.81, 5.69, 5.66, 5.65, 4.64, 4.31, 3.93, 3.22, 3.21, 3.15, 3.10, 2.69, 2.62, 2.26, 2.23. 1.74, 1.15, 1.12, 1.05, 1.02; and has ^{13}C NMR values of 172.99, 172.93, 169.57, 169.23, 167.59, 130.74, 130.12, 129.93, 128.32, 73.49, 62.95, 59.42, 57.73, 38.39, 38.00, 35.49, 30.90, 30.36, 29.26, 18.59, 18.38, 18.09, 17.93, 12.51. The NMR data indicates that the compound contains amino, ester, carboxylic acid, aliphatic methyl, ethyl, methylene, oxymethylene, methine, oxymethine and sulfur groups. The detailed 1D and 2D NMR analysis confirms the structure for the compound as FR90128 as a known compound.

8. Example 8. Herbicidal activity of FR90128

The herbicidal activity of the active compound FR90128 (MW 540) is tested in a laboratory assay using one-week old barnyard grass (*Echinochloa crus-galli*) seedlings in a 96-well plate platform. One grass seedling was placed in each of the wells containing 99 microliters of DI water. One microliter aliquot of the pure compound in ethanol (10 mg/mL) is added into each well, and the plate is sealed with a lid. One microliter of ethanol in 99 microliters of water is used as a negative control. The treatments were done in eight replicates, and the sealed plate is incubated in a greenhouse under artificial lights (12 hr light/dark cycle). After five days, the results are read. The grass seedlings in all eight wells that received the active compound are dead with no green tissue left, whereas the seedlings in the negative control wells were actively growing.

9. Example 9. Insecticidal activity of FR90128

The insecticidal activity of the active compound FR90128 (MW 540) is tested in a laboratory assay using a contact bioassay system. The compound is dissolved in 100% ethanol to concentrations of 0.001, 0.005, 0.01, 0.025, 0.05, 0.1, 0.25, and 0.5 μg/μL. Individual early 3rd instar Beet Armyworm, *Spodoptera exigua*, larvae are placed in 1.25 ounce plastic cups with a 1 cm^2 piece of artificial diet (Bio-Serv). A Hamilton Micropipette is used to apply 1 μL of compound to the thorax of each larvae. Cups are covered with stretched parafilm and a single hole is cut into the parafilm for aeration. Ten larvae per concentration are treated. The assay is incubated at 25°C, 12h light/12h dark. Larvae are scored at 48 and 72 hours after application. Probit analysis is performed to assess LC_{50} value which is found for compound (MW 540) as 0.213.

10. Example 10. Isolation of Templamide A, B, FR901465 and FR90128

Methods and Materials

The following procedure is used for the purification of compounds extracted from cell culture of *Burkholderia sp* (see Figure 7):

The culture broth derived from the 10-L fermentation *Burkholderia* (A396) in Hy soy growth medium is extracted with Amberlite XAD-7 resin (Asolkar et al., 2006) by shaking the cell suspension with resin at 225 rpm for two hours at room temperature. The resin and cell mass are collected by filtration through cheesecloth and washed with DI water to remove salts. The resin, cell mass, and cheesecloth are then soaked for 2 h in acetone after which the acetone is filtered and dried under vacuum using rotary evaporator to give the crude extract. The crude extract is then fractionated by using reversed-phase C18 vacuum liquid chromatography (H_2O/CH_3OH; gradient 90:20 to 0:100%) to give 10 fractions. These fractions are then concentrated to dryness using rotary evaporator and the resulting dry residues are screened for biological activity using 96 well plate lettuce seeding (herbicidal) and early 3rd instar Beet Armyworm (insecticidal) assay. The active fractions are then subjected to repeatedly to reversed phase HPLC separation (Spectra System P4000 (Thermo Scientific) to give pure compounds, which are then screened in above-mentioned bioassays to locate/identify the active compounds. To confirm the identity of the compound, additional spectroscopic data such as LC/MS, HRMS and NMR are recorded.

The active fraction **5** is purified further by using HPLC C-18 column (Phenomenex, Luna 10u C18(2) 100 A, 250 x 30), water:acetonitrile gradient solvent system (0-10 min; 80 % aqueous CH_3CN, 10-25 min; 80 - 65 % aqueous CH_3CN, 25-50 min; 65 - 50 % aqueous CH_3CN, 50-60 min; 50 - 70 % aqueous CH_3CN, 60-80 min; 70 – 0 % aqueous CH_3CN, 80-85 min; 0 – 20 % aqueous CH_3CN) at 8 mL/min flow rate and UV detection of 210 nm, to give templamide A, retention time 55.64 min and FR901465, retention time 63.59 min and FR90128, retention time 66.65 min respectively. The other active fraction **6** is also purified using HPLC C-18 column (Phenomenex, Luna 10u C18(2) 100 A, 250 x 30), water:acetonitrile gradient solvent system (0-10 min; 70-60 % aqueous CH_3CN, 10-20 min; 60-40 % aqueous CH_3CN, 20-50 min; 40 - 15 % aqueous CH_3CN, 50-75 min; 15 - 0 % CH_3CN, 75-85 min; 0 – 70 % aqueous CH_3CN) at 8 mL/min flow rate and UV detection of 210 nm, to give templamide B, retention time 38.55 min.

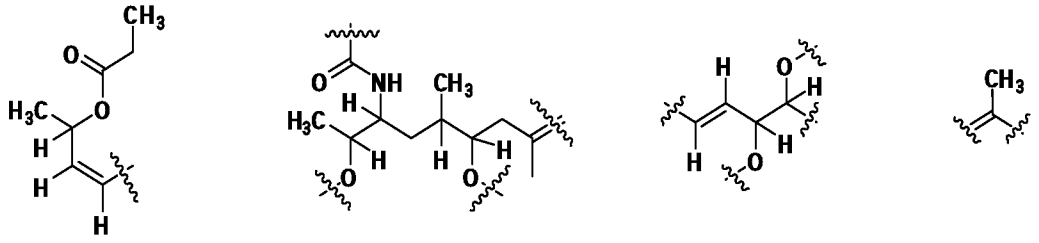
Mass spectroscopy analysis of pure compounds is performed on a Thermo Finnigan LCQ Deca XP Plus electrospray (ESI) instrument using both positive and negative

ionization modes in a full scan mode (*m/z* 100-1500 Da) on a LCQ DECA XP^{plus} Mass Spectrometer (Thermo Electron Corp., San Jose, CA). Thermo high performance liquid chromatography (HPLC) instrument equipped with Finnigan Surveyor PDA plus detector, autosampler plus, MS pump and a 4.6 mm x 100 mm Luna C18 5 μm column (Phenomenex) is used. The solvent system consists of water (solvent A) and acetonitrile (solvent B). The mobile phase begins at 10% solvent B and is linearly increased to 100% solvent B over 20 min and then kept for 4 min, and finally returns to 10% solvent B over 3 min and kept for 3 min. The flow rate is 0.5 mL/min. The injection volume is 10 μL and the samples are kept at room temperature in an auto sampler. The compounds are analyzed by LC-MS utilizing the LC and reversed phase chromatography. Mass spectroscopy analysis of the present compounds is performed under the following conditions: The flow rate of the nitrogen gas is fixed at 30 and 15 arb for the sheath and aux/sweep gas flow rate, respectively. Electrospray ionization is performed with a spray voltage set at 5000 V and a capillary voltage at 45.0 V. The capillary temperature is set at 300°C. The data is analyzed on Xcalibur software. The active compound templamide A has a molecular mass of 555 based on the *m/z* peak at 556.41 $[M + H]^+$ and 578.34 $[M + Na]^+$ in positive ionization mode. The LC-MS analysis in positive mode ionization for templamide B suggests a molecular mass of 537 based *m/z* ions at 538.47 $[M + H]^+$ and 560.65 $[M + Na]^+$. The molecular weight for the compounds FR901465 and FR90128 are assigned as 523 and 540 respectively on the basis of LCMS analysis.

^1H, ^{13}C and 2D NMR spectra are measured on a Bruker 600 MHz gradient field spectrometer. The reference is set on the internal standard tetramethylsilane (TMS, 0.00 ppm).

For structure elucidation of templamide A, the purified compound with molecular weight 555 is further analyzed using a 600 MHz NMR instrument, and has ^1H NMR δ values at 6.40, 6.39, 6.00, 5.97, 5.67, 5.54, 4.33, 3.77, 3.73, 3.70, 3.59, 3.47, 3.41, 2.44, 2.35, 2.26, 1.97, 1.81, 1.76, 1.42, 1.37, 1.16, 1.12, 1.04 and has ^{13}C NMR values of δ 173.92, 166.06, 145.06, 138.76, 135.71, 129.99, 126.20, 123.35, 99.75, 82.20, 78.22, 76.69, 71.23, 70.79, 70.48, 69.84, 60.98, 48.84, 36.89, 33.09, 30.63, 28.55, 25.88, 20.37, 18.11, 14.90, 12.81, 9.41. The ^{13}C NMR spectrum exhibits 28 discrete carbon signals which are attributed to six methyls, four methylene carbons, and thirteen methines including five sp^2, four quaternary carbons. The molecular formula, $C_{28}H_{45}NO_{10}$, is determined by interpretation of ^1H, ^{13}C NMR and HRESI MS data. The detailed analysis of ^1H-^1H COSY, HMBC and HMQC spectral data reveals the following substructures (I – IV) and two isolated methylene & singlet methyl groups. These substructures are connected later using

the key HMBC correlations to give the planer structure for the compound, which has been not yet reported in the literature and designated as templamide A. This polyketide molecule contains two tetrahydropyranose rings, and one conjugated amide.



I II III IV

Substructures I-IV assigned by analysis of 1D & 2D NMR spectroscopic data.

The (+) ESIMS analysis for the second herbicidal compound, shows *m/z* ions at 538.47 $[M + H]^+$ and 560.65 $[M + Na]^+$ corresponding to the molecular weight of 537. The molecular formula of $C_{28}H_{43}NO_9$ is determined by interpretation of the ESIMS and NMR data analysis. The ^1H and ^{13}C NMR of this compound is similar to that of templamide A except that a new isolated $-CH_2-$ appear instead of the non-coupled methylene group in templamide A. The small germinal coupling constant of 4.3 Hz is characteristic of the presence of an epoxide methylene group. The presence of this epoxide is further confirmed from the ^{13}C NMR shift from 60.98 in templamide A to 41.07 in compound with MW 537. The molecular formulae difference between these two compounds is reasonably explained by elimination of the water molecule followed by formation of epoxide. Thus, on the basis of based NMR and MS analysis the structure for the new compound was assigned and was designated as templamide B.

For structure elucidation, the purified compound from fraction **5** with molecular weight 523 is further analyzed using a 600 MHz NMR instrument, and has ^1H NMR δ values at 6.41, 6.40, 6.01, 5.98, 5.68, 5.56, 4.33, 3.77, 3.75, 3.72, 3.65, 3.59, 3.55, 3.50, 2.44, 2.26, 2.04, 1.96, 1.81, 1.75, 1.37, 1.17, 1.04; and has ^{13}C NMR δ values of 172.22, 167.55, 144.98, 138.94, 135.84, 130.14, 125.85, 123.37, 99.54, 82.19, 78.28, 76.69, 71.31, 70.13, 69.68, 48.83, 42.52, 36.89, 33.11, 30.63, 25.99, 21.20, 20.38, 18.14, 14.93, 12.84. The detailed ^1H and ^{13}C NMR analysis of compound suggested that this compound was quite similar to compound templamide B; the only difference was in the ester side chain; an acetate moiety was present instead of a propionate moiety in the side chain. The detailed 1D and 2D NMR analysis confirm the structure for the compound as FR901465 as a known compound.

Based on the LC-MS analysis, the other compound from fraction **5** has a molecular mass of 540 in negative ionization mode. For structure elucidation, the purified compound from fraction **5** with molecular weight 540 is further analyzed using a 500 MHz NMR instrument, and has ^1H NMR δ values at 6.22, 5.81, 5.69, 5.66, 5.65, 4.64, 4.31, 3.93, 3.22,

3.21, 3.15, 3.10, 2.69, 2.62, 2.26, 2.23. 1.74, 1.15, 1.12, 1.05, 1.02; and has ^{13}C NMR values of 172.99, 172.93, 169.57, 169.23, 167.59, 130.74, 130.12, 129.93, 128.32, 73.49, 62.95, 59.42, 57.73, 38.39, 38.00, 35.49, 30.90, 30.36, 29.26, 18.59, 18.38, 18.09, 17.93, 12.51. The NMR data indicates that the compound contains amino, ester, carboxylic acid, aliphatic methyl, ethyl, methylene, oxymethylene, methine, oxymethine and sulfur groups. The detailed 1D and 2D NMR analysis confirm the structure for the compound as FR90128 as a known compound.

11. Example 11. Herbicidal activity of Templamide A, Templamide B, FR901465 and FR90128

The herbicidal activity of templamide A, B, FR901465 and FR90128 are tested in a laboratory assay using one-week old barnyard grass (*Echinochloa crus-galli*) and lettuce (*Lactuca sativa* L.) seedlings in a 96-well plate platform. One seedling is placed in each of the wells containing 99 microliters of DI water. Into each well, a one microliter aliquot of the pure compound in ethanol (10 mg/mL) is added, and the plate is sealed with a lid. One microliter of ethanol in 99 microliters of water is used as a negative control. The treatments are done in eight replicates, and the sealed plate is incubated in a greenhouse under artificial lights (12 hr light/dark cycle). After five days, the results are read. The grass seedlings in all eight wells that received the active compound are dead with no green tissue left, whereas the seedlings in the negative control wells are actively growing. The herbicidal activity of templamide A against lettuce seedlings is slightly lower than for the grass. On the other hand, templamide B provides a better (100%) control of lettuce seedlings (used as a model system for broadleaf weeds) than templamide A (Table 11).

Table 11: Herbicidal Bioassay data for Templamide A, B, FR901465 and FR90128

Compounds[1]	Grass seedlings (% Mortality)	Lettuce seedlings (% Mortality)
Templamide A	100	88
Templamide B	0	75
FR901465	88	100
FR90128	100	88
Control	0	0

[1]10 μg/mL concentration per well

12. Example 12. Insecticidal activity of active compounds

The insecticidal activity of templamide A, B, FR901465 and FR90128 are tested in a laboratory assay using a 96-well diet overlay assay with 1st instar Beet Armyworm larvae using microtiter plates with 200 μl of solid, artificial Beet Armyworm diet in each well. One hundred (100) μl of each test sample is pipetted on the top of the diet (one sample in each well), and the sample is let dry under flowing air until the surface is dry. Each sample

was tested in six replicates, and water and a commercial Bt (*B. thuringiensis*) product are used as negative and positive controls, respectively. One first instar larvae of the test insect (Beet armyworm – *Spodoptera exiqua)* was placed in each well, and the plate was covered with plastic cover with airholes. The plates with insects were incubated at 26°C for 6 days with daily mortality evaluations. Based on the results presented in Table 12, templamide A and B results in 40% and 80% mortality, respectively.

Table 12: Insecticidal Bioassay data for Templamide A, B, FR901465 and FR90128 against 1st instar Beet Army Worm (*Spodoptera exigua*).

Compounds[1]	(% Mortality)
Templamide A	40
Templamide B	80
FR901465	50
FR90128	90
Bt	100
Control	0

[1]10 μg/mL concentration per well

Example 11. Fungicidal activity of FR90128 (MW 540)

Fungicidal activity of FR90128 (MW 540) against three plant pathogenic fungi (*Botrytis cinerea, Phytophtora* sp., *Monilinia fructicola*) is tested in an in vitro PDA (potato dextrose agar) plate assay. Plates are inoculated with the fungus using a plug method. After the fungus had established and started to grow on the growth medium, eight sterile filter paper disks are placed on each plate about 1 cm from the edge in a circle. Ten microliters of ethanol solution containing 20, 15, 10, 7.5, 5, 2.5 1.25 mg FR90128/mL is added into filter paper disks, and the solution is left to evaporate. One disk imbedded with 10 μL of pure ethanol is used as a negative control. The assay is done with three replicates. Plates are incubated at room temperature for 5 days, after which the fungicidal activity is recorded by measuring the inhibition zone around each filter paper disk corresponding to different concentrations of FR90128. According to the results, FR90128 has no effect on the growth of *Monilinia* but it is effective in controlling the hyphal growth of both *Botrytis* and *Phytophtora*. There seems to be a clear dose-response in inhibition with threshold concentrations of 10 mg/mL and 1.25 mg/mL for *Botrytis* and *Phytophtora*, respectively (Figure 8).

DEPOSIT OF BIOLOGICAL MATERIAL

The following biological material has been deposited under the terms of the Budapest Treaty with the Agricultural Research Culture Collection (NRRL), 1815 N. University Street, Peoria, Illinois 61604 USA, and given the following number:

Deposit	Accession Number	Date of Deposit
Burkholderia sp. A396	NRRL B-50319	September 15, 2009

The strain has been deposited under conditions that assure that access to the culture will be available during the pendency of this patent application to one determined by the Commissioner of Patents and Trademarks to be entitled thereto under 37 C.F.R. §1.14 and 35 U.S.C. §122. The deposit represents a substantially pure culture of the deposited strain. The deposit is available as required by foreign patent laws in countries wherein counterparts of the subject application, or its progeny are filed. However, it should be understood that the availability of a deposit does not constitute a license to practice the subject invention in derogation of patent rights granted by government action.

The invention described and claimed herein is not to be limited in scope by the specific aspects herein disclosed, since these aspects are intended as illustrations of several aspects of the invention. Any equivalent aspects are intended to be within the scope of this invention. Indeed, various modifications of the invention in addition to those shown and described herein will become apparent to those skilled in the art from the foregoing description. Such modifications are also intended to fall within the scope of the appended claims. In the case of conflict, the present disclosure including definitions will control.

Various references are cited herein, the disclosures of which are incorporated by reference in their entireties.

Literature cited:

Anderson, et al. "The structure of thiostrepton," Nature 225: 233-235. 1970.

Andra, "Endotoxin-like properties of a rhamnolipid exotoxin from *Burkholderia (Pseudomonas) plantarii*: immune cell stimulation and biophysical characterization." Biol. Chem. 387: 301-310. 2006.

Arena, et al. "The mechanism of action of avermectins in *Caenorhabditis elegans* - correlation between activation of glutamate-sensitive chloride current, membrane binding and biological activity." J Parasitol. 81: 286-294. 1995.

Asolkar, et al., "Weakly cytotoxic polyketides from a marine-derived Actinomycete of the genus *Streptomyces* strain CNQ-085." J. Nat. Prod. 69:1756-1759. 2006.

Burkhead, et al., "Pyrrolnitrin production by biological control agent *Pseudomonas cepacia* B37w in culture and in colonized wounds of potatoes." Appl. Environ. Microbiol. 60: 2031-2039. 1994.

Burkholder, W. H "Sour skin, a bacterial rot of onion bulbs." Phytopathology 40: 115-117. 1950.

Caballero-Mellado et al., "*Burkholderia unamae* sp. nov., an N2-fixing rhizospheric and endophytic species." Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 54: 1165-1172. 2004.

Cashion et al. "Rapid method for base ratio determination of bacterial DNA." Anal. Biochem. 81: 461-466. 1977.

Casida, et al., US Patent No. 6,689,357.

Chen et al. , "*Burkholderia nodosa* sp. nov., isolated from root nodules of the woody Brazilian legumes *Mimosa bimucronata* and *Mimosa scabrella* " Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 57: 1055-1059. 2007.

Cheng, A. C. and Currie, B. J. "Melioidosis: epidemiology, pathophysiology, and management." Clin. Microbiol. 18: 383-416. 2005.

Coenye, T. and P. Vandamme, P. "Diversity and significance of Burkholderia species occupying diverse ecological niches." Environ. Microbiol. 5: 719-729. 2003.

Compant, et al. "Diversity and occurence of *Burkholderia* spp. in the natural environment." FEMS Microbiol. Rev. **32**: 607-626. 2008.

De Ley et al. "The quantitative measurement of DNA hybridization from renaturation rates." Eur. J. Biochem. **12**: 133-142. 1970.

Duke et al. "Natural products as sources for herbicides: current status and future trends." Weed Res 40: 99-111. 2000.

Gerwick et al., US Patent No. 7,393,812.

Gottlieb et al., US Patent No. 4,808,207.

Gouge et al., US Patent Application Pub. No. 2003/0082147.

Guella et al. "Almazole C, a new indole alkaloid bearing an unusually 2,5-disubstituted oxazole moiety and its putative biogenetic precursors, from a Senegalese Delesseriacean sea weed." Helv. Chim. Acta 77: 1999-2006. 1994.

Guella et al. "Isolation, synthesis and photochemical properties of almazolone, a new indole alkaloid from a red alga of Senegal." Tetrahedron. 62: 1165-1170. 2006.

Henderson, P. J. and Lardy H. A. "Bongkrekic acid. An inhibitor of the adenine nucleotide translocase of mitochondria." J. Biol. Chem. 245: 1319-1326. 1970.

Hirota et al. "Isolation of indolmycin and its derivatives as antagonists of L-tryptophan." Agri. Biol Chem. 42: 147-151. 1978.

Hu, F.-P. and Young, J. M. "Biocidal activity in plant pathogenic *Acidovorax, Burkholderia*, *Herbaspirillum, Ralstonia*, and *Xanthomonas* spp." J. Appl. Microbiol. 84: 263-271. 1998.

Huss et al. "Studies of the spectrophotometric determination of DNA hybridization from renaturation rates." System. Appl. Microbiol. 4: 184-192. 1983.

Jansiewicz, W. J. and Roitman J. "Biological control of blue mold and gray mold on apple and pear with *Pseudomonas cepacia*." Phytopathology 78: 1697-1700. 1988.

Jeddeloh et al., WO2001/055398.

Jansen et al. "Thiangazole: a novel inhibitor of HIV-1 from Polyangium Spec." Liebigs Ann. Chem. 4: 357-3359. 1992.

Jeong et al. "Toxoflavin produced by *Burkholderia glumae* causing rice grain rot is responsible for inducing bacterial wilt in many field crops." Plant Disease 87: 890-895. 2003.

Knudsen, G. R. and Spurr, J. "Field persistence and efficacy of five bacterial preparations for control of peanut leaf spot." Plant Disease 71: 442-445. 1987.

Koga-Ban et al. "cDNA sequences of three kinds of beta-tubulins from rice." DNA Research 2: 21-26. 1995.

Koide et al. US Patent Application Pub. No. 2008/0096879.

Koyama et al. "Isolation, characterization, and synthesis of pimprinine, pimrinrthine, and pimprinaphine, metabolites of *Streptoverticillium olivoreticuli*." Agri. Biol. Chem. 45: 1285-1287. 1981.

Krieg et al. "*Bacillus thuringiensis* var. tenebrionis: Ein neuer, gegenuber Larven von Coleopteren wirksamer Pathotyp." Z. Angew. Entomol. 96:500-508. 1983.

Kunze et al. "Thiangazole, a new thiazoline antibiotic from *Polyangium* sp (Myxobacteria Production, antimicrobial activity and mechanism of action." J. Antibiot., 46: 1752-1755. 1993.

Leahy et al. "Comparison of factors influencing trichloroethylene degradation by toluene-oxidizing bacteria." Appl. Environ. Microbiol. 62: 825-833. 1996.

Lessie et al. "Genomic complexity and plasticity of *Burkholderia cepacia*." FEMS Microbiol. Lett. 144: 117-128. 1996.

Lindquist, N. et al. "Isolation and structure determination of diazonamides A and B, unusual cytotoxic metabolites from the marine ascidian *Diazona chinensis*." J. Am Chem. Soc. 113: 2303-2304. 1991.

Lorch, H et al. "Basic methods for counting microoganisms in soil and water. In Methods in applied soil microbiology and biochemistry. K. Alef and P. Nannipieri. Eds. San Diego, CA, Academic Press: pp. 146-161. 1995.

Ludovic et al. "Burkholderia diveristy and versatility: An inventory of the extracellular products." J. Microbiol. Biotechnol. 17: 1407-1429. 2007.

Lydon, J. and Duke, S. "Inhibitors of glutamine biosynthesis." in Plant amino acids: Biochemistry and Biotechnology. B. Singh., Ed. New York, USA, Marcel Decker. pp. 445-464. 1999.

Mahenthiralingam et al. "DNA-based diagnostic approaches for identification of *Burkholderia cepacia* complex, *Burkholderia vietnamiensis*, *Burkholderia multivorans*, *Burkholderia stabilis*, and *Burkholderia cepacia* genomovars I and III." J.Clin. Microbiol. 38: 3165-3173. 2000.

Ming, L.-J. and Epperson. "Metal binding and structure-activity relationship of the metalloantibiotic peptide bacitracin." Biochemistry 91: 46-58. 2002.

Morita et al. "Biological activity of tropolone." Biol. Pharm. Bull. 26: 1487-1490. 2003.

Nagamatsu, T. "Syntheses, transformation, and biological activities of 7-azapteridine antibiotics: toxoflavin, fervenulin, reumycin, and their analogs". Recent Res. Devel. Org. Bioorg. Chem. 4: 97 –121. 2001.

Naik et al., "Pimprine, an extracellular alkaloid produced by *Streptomyces* CDRIL-312: fermentation, isolation and pharmacological activity." J. Biotech. 88: 1-10. 2001.

Nakajima et al., "Antitumor Substances, FR901463, FR901464 and FR901465. I. Taxonomy, Fermentation, Isolation, Physico-chemical Properties and Biological Activities." J. Antibiot. 49: 1196-1203. 1996.

Nakajima et al. US Patent No. 5,545,542.

Nakajima et al., "Hydantocidin: a new compound with herbicidal activity." J Antibiot. 44: 293-300. 1991.

N'Diaye, I. et al., "Almazole A and amazole B, unusual marine alkaloids of an unidentified red seaweed of the family *Delesseriaceae* from the coasts of Senegal." Tet Lett. 35: 4827-4830. 1994.

N'Diaye, I. et al., "Almazole D, a new type of antibacterial 2,5-disubstituted oxazolic dipeptide from a red alga of the coast of Senegal." Tet Lett. 37: 3049-3050. 1996.

Nierman et al., "Structural flexibility in the *Burkholderia mallei* genome." Proc. Natl. Acad. Sci._USA 101: 14246-14251. 2004.

Okazaki et al., "Rhizobial strategies to enhance symbiotic interaction: Rhizobitoxine and 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase." Microbes Environ. 19: 99-111. 2004.

Parke, J. L. and D. Gurian-Sherman, D. 2001. "Diversity of the Burkholderia cepacia complex and implications for risk assessment of biological control strains." Annual Reviews in Phytopathology 39: 225-258. 2001.

Parke, et al. US Patent No. 6,077,505.

Pettit, G. et al. "Isolation of Labradorins 1 and 2 from *Pseudomonas syringae*." J. Nat. Prod. 65: 1793-1797. 2002.

Pitt, et al., "Type characterization and antibiotic susceptibility of *Burkholderia* (*Pseudomonas*) *cepacia* isolates from patients with cystic fibrosis in the United Kingdom and the Republic of Ireland." J. Med. Microbiol. 44: 203-210. 1996.

Ramette et al., "Species abundance and diversity of *Burkholderia cepacia* complex in the environment." Appl. Environ. Microbiol. 71: 1193-1201. 2005.

Resi et al., "Burkholderia tropica sp. nov., a novel nitrogen-fixing, plant-associated bacterium."Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 54: 2155-2162. 2004.

Salama et al. "Potency of spore-gamma-endotoxin complexes of *Bacillus thuringiensis* against some cotton pests." Z. Angew. Entomol. 91: 388-398. 1981.

Selva et al., "Targeted screening for elongation factor Tu binding antibiotics." J. Antibiot. 50: 22-26. 1997.

Takahashi, S. et al. "Martefragin A, a novel indole alkaloid isolated from a red alga, inhibits lipid peroxidation." Chem Pharm. Bull. 46: 1527-1529. 1998.

Thompson et al. "Spinosad - a case study: an example from a natural products discovery programme." Pest Management Science **56**: 696-702. 2000.

Takita et al., "Chemistry of Bleomycin. XIX Revised structures of bleomycin and phleomycin." J. Antibiot. 31: 801-804. 1978.

Tran Van et al., "Repeated beneficial effects of rice inoculation with a strain of *Burkholderia vietnamiensis* on early and late yield component in low fertility sulphate acid soils of Vietnam." Plant and Soil 218: 273-284. 2000.

Tsuruo et al., "Rhizoxin, a macrocyclic lactone antibiotic, as a new antitumor agent against human and murine tumor cells and their vincristine-resistant sublines." Cancer Res. 46: 381-385. 1986.

Ueda et al., US Patent No. 7,396,665.

Umehara, K. et al. "Studies of new antiplatelet agents WS-30581 A and B." J. Antibiot. 37: 1153-1160. 1984.

Vandamme et al. Polyphasic taxonomic study of the emended genus *Arcobacter* with *Arcobacter butzleri* comb. nov. and *Arcobacter skirrowii* sp. nov., an aerotolerant bacterium isolated from veterinary specimens." Int. J. Syst. Bacteriol. 42: 344-356. 1992.

Vanderwall et al., "A model of the structure of HOO-Co•bleomycin bound to d(CCAGTACTGG): recognition at the d(GpT)site and implications for double-stranded DNA cleavage, Chem. Biol. 4: 373-387. 1997.

Vermis K., et al. "Evaluation of species-specific recA-based PCR tests for genomovar level identification within the *Burkholderia cepacia* complex." J. Med. Microbiol 51: 937-940. 2002.

Watanabe, H. et al. "A new antibiotic SF2583A, 4-chloro-5-(3'indoly)oxazole, produced by *Streptomyces*." Meiji Seika Kenkyu Nenpo 27: 55-62. 1988.

Wayne et al., "Report of the Ad Hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics." Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 37: 463-464. 1987.

Werner et al., "Uptake of indolmycin in gram-positive bacteria." Antimicrob Agents Chemotherapy 18: 858-862. 1980.

Wilson et al. "Toxicity of rhizonin A, isolated from *Rhizopus microsporus*, in laboratory animals." Food Chem. Toxicol. 22: 275-281. 1984.

Zeck W.M. "Ein Bonitierungsschema zur Feldauswertung von Wurzelgallenbefall. Pflanzenschutznachrichten." Bayer 24,1: 144-147. 1971.

Zhang et al., US Patent No. 7,141,407.

Zhou et al., "Antimicrobial susceptibility and synergy studies of *Burkholderia cepacia* complex isolated from patients with cystic fibrosis." Antimicrobial Agents and Chemotherapy 51: 1085-088. 2007.

WHAT IS CLAIMED IS:

1. An isolated strain of a non-*Burkholderia cepacia,* non-*Burkholderia plantari*, non-*Burkholderia gladioli*, *Burkholderia sp.* non-*Burkholderia cepacia,* non-*Burkholderia multivorans*, *Burkholderia sp.* which has the following characteristics:

(A) a 16S rRNA gene sequence comprising the forward sequence having at least 99% identity to the sequence set forth in SEQ ID NO:8, 11, 12 and a reverse sequence having at least 99% identity to the sequence set forth in SEQ ID NO:9, 10, 13, 14 and 15;

(B) pesticidal activity;

(C) produces a pesticidal compound selected from the group consisting of:

(i) a compound having the following properties: (a) a molecular weight of about 525-555 as determined by Liquid Chromatography/Mass Spectroscopy (LC/MS); (b) ^{1}H NMR δ values of 6.22, 5.81, 5.69, 5.66, 5.65, 4.64, 4.31, 3.93, 3.22, 3.21, 3.15, 3.10, 2.69, 2.62, 2.26, 2.23. 1.74, 1.15, 1.12, 1.05, 1.02; (c) has ^{13}C NMR δ values of 172.99, 172.93, 169.57, 169.23, 167.59, 130.74, 130.12, 129.93, 128.32, 73.49, 62.95, 59.42, 57.73, 38.39, 38.00, 35.49, 30.90, 30.36, 29.26, 18.59, 18.38, 18.09, 17.93, 12.51 and (c) an High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) retention time of about 10-15 minutes, on a reversed phase C-18 HPLC column using a water:acetonitrile (CH_3CN) gradient;

(iv) a compound having an oxazolyl-indole structure comprising at least one indole moiety, at least one oxazole moiety, at least one substituted alkyl group and at least one carboxylic ester group, at least 17 carbons, at least 3 oxygens and at least 2 nitrogens;

(v) a compound having an oxazolyl-benzyl structure comprising at least one benzyl moiety, at least one oxazole moiety, at least one substituted alkyl group and at least one amide group, at least 15 carbons, at least 2 oxygen and at least 2 nitrogens;

(vi) a compound having at least one ester, at least one amide, at least three methylene groups, at least one tetrahydropyranose moiety, at least three olefinic double bonds, at least six methyl groups, at least three hydroxyl groups, at least twenty five carbons, at least eight oxygen and at least one nitrogen and

(vii) a compound having at least one ester, at least one amide, an epoxide methylene group, at least one tetrahydropyranose moiety, at least three olefinic double bonds, at least six methyl groups, at least three hydroxyl groups, at least 25 carbons, at least 8 oxygens and at least 1 nitrogen;

(D) is non-pathogenic to vertebrate animals;

(E) is susceptible to kanamycin, chloramphenicol, ciprofloxacin, piperacillin. , imipenem, and a combination of sulphamethoxazole and trimethoprim and

(F) contains the fatty acids 16:0, cyclo 17:0, 16:0 3-OH, 14:0, cyclo 19:0 ω8*c*, 18:0.

2. The strain of claim 1, wherein the *Burkholderia* species is a *Burkholderia* strain having the identifying characteristics of *Burkholderia* A396 (NRRL Accession No. B-50319).

3. A substantially pure culture, cell fraction or supernatant derived from the strain of claims 1-2 or extract thereof.

4. An isolated pesticidal compound optionally obtainable from a Burkholderia species selected from the group consisting of:

(A) a compound having an oxazolyl-indole structure comprising at least one indole moiety, at least one oxazole moiety, at least one substituted alkyl group and at least one carboxylic ester group; at least 17 carbons and at least 3 oxygen and 2 nitrogens; and which has at least one of the following: (i) a molecular weight of 275-435; (ii) ^{1}H NMR δ values at 8.44, 8.74, 8.19, 7.47, 7.31, 3.98, 2.82, 2.33, 1.08; (iii) ^{13}C NMR values of δ 163.7, 161.2, 154.8, 136.1, 129.4, 125.4, 123.5, 123.3, 121.8, 121.5, 111.8, 104.7, 52.2, 37.3, 28.1, 22.7, 22.7; (iv) an High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) retention time of about 10-20 minutes on a reversed phase C-18 HPLC column using a water:acetonitrile (CH_3CN) with a gradient solvent system and UV detection of 210 nm; (v) UV absorption bands at 226, 275, 327 nm.;

(B) a compound having an oxazolyl-benzyl structure comprising at least one benzyl moiety, at least one oxazole moiety, at least one substituted alkyl group, at least one amide group; at least 15 carbons, at least 2 oxygens and at least 2 nitrogens; and at least one of the following characteristics: (i) a molecular weight of about 240-290 as determined by Liquid Chromatography/Mass Spectroscopy (LC/MS); (ii) ^{1}H NMR δ values at about 7.08, 7.06, 6.75, 3.75, 2.56, 2.15, 0.93, 0.93; (iii) ^{13}C NMR values of δ 158.2, 156.3, 155.5, 132.6, 129.5, 129.5, 127.3, 121.8, 115.2, 115.2, 41.2, 35.3, 26.7, 21.5, 21.5; (iv) an High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) retention time of about 6-15 minutes, on a reversed phase C-18 HPLC column using a water:acetonitrile (CH_3CN) gradient and (v) UV absorption bands at about 230, 285, 323 nm;

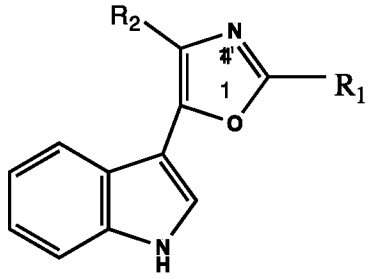
(C) a non-epoxide compound comprising at least one ester, at least one amide, at least three methylene groups, at least one tetrahydropyranose moiety, at least three olefinic double bonds, at least six methyl groups, at least three hydroxyl groups, at least twenty five carbons, at least eight oxygens and one nitrogen and at least one of the following characteristics: (i) has a molecular weight of about 530-580 as determined by Liquid

Chromatography/Mass Spectroscopy (LC/MS); (ii) ^{1}H NMR values of δ 6.40, 6.39, 6.00, 5.97, 5.67, 5.54, 4.33, 3.77, 3.73, 3.70, 3.59, 3.47, 3.41, 2.44, 2.35, 2.26, 1.97, 1.81, 1.76, 1.42, 1.37, 1.16, 1.12, 1.04; (iii) ^{13}C NMR values of δ 173.92, 166.06, 145.06, 138.76, 135.71, 129.99, 126.20, 123.35, 99.75, 82.20, 78.22, 76.69, 71.23, 70.79, 70.48, 69.84, 60.98, 48.84, 36.89, 33.09, 30.63, 28.55, 25.88, 20.37, 18.11, 14.90, 12.81, 9.41; (iv) a High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) retention time of about 7-12 minutes, on a reversed phase C-18 HPLC column using a water:acetonitrile (CH_3CN) with a gradient solvent system and UV detection of 210 nm; (v) has a molecular formula of $C_{28}H_{45}NO_{10}$ which was determined by interpretation of the ESIMS and NMR data analysis and (vii) has UV absorption bands between about 210-450 nm;

(D) a compound comprising (i) at least one ester, at least one amide, an epoxide methylene group, at least one tetrahydropyranose moiety and at least three olefinic double bonds, at least six methyl groups, at least three hydroxyl groups, at least 25 carbons, at least 8 oxygens and at least 1 nitrogen; (ii) ^{13}C NMR values of δ 174.03, 166.12, 143.63, 137.50, 134.39, 128.70, 126.68, 124.41, 98.09, 80.75, 76.84, 75.23, 69.87, 69.08, 68.69, 68.60, 48.83, 41.07, 35.45, 31.67, 29.19, 27.12, 24.55, 19.20, 18.95, 13.48, 11.39, 8.04; (iii) a molecular formula of $C_{28}H_{43}NO_9$ and at least one of: (i) ^{1}H NMR δ values at about 6.41, 6.40, 6.01, 5.97, 5.67, 5.55, 4.33, 3.77, 3.75, 3.72, 3.64, 3.59, 3.54, 3.52, 2.44, 2.34, 2.25, 1.96, 1.81, 1.76, 1.42, 1.38, 1.17, 1.12, 1.04; (ii) an High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) retention time of about 6-15 minutes, on a reversed phase C-18 HPLC column using a water:acetonitrile (CH_3CN) gradient; (iii) UV absorption bands between about 210-450 nm.

5. The compound according to claim 4, wherein said compound has the structure:

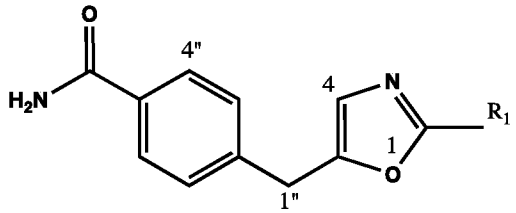
(a) ##STR002a##



##STR002a##

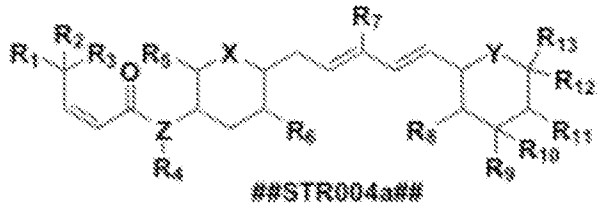
wherein R_1 is --H or C_1-C_{10} alkyl; R_2 is an alkyl ester;

(b) ##STR003a##



wherein R_1 is --H or C_1-C_{10} alkyl;

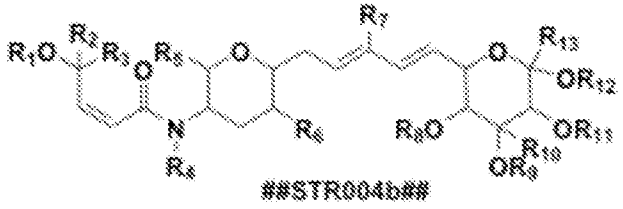
(c) ##STR004a##



##STR004a##

Wherein X, Y and Z are each independently -O, -NR, or -S, wherein R is H or C_1-C_{10} alkyl; R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8, R_9, R_{10}, R_{11}, R_{12}, and R_{13} are each independently H, alkyl, substituted alkyl, alkenyl, substituted alkenyl, alkynyl, substituted alkynyl, aryl, substituted aryl, heteroaryl, substituted heteroaryl, heterocyclic, substituted heterocyclic, cycloalkyl, substituted cycloalkyl, alkoxy, substituted alkoxy, thioalkyl, substituted thioalkyl, hydroxy, halogen, amino, amido, carboxyl, -C(O)H, acyl, oxyacyl, carbamate, sulfonyl, sulfonamide, or sulfuryl;

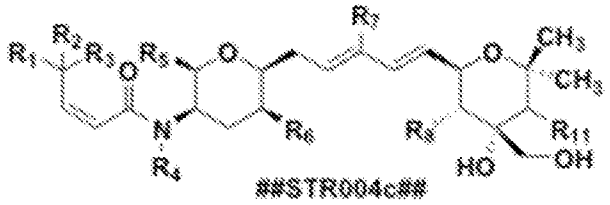
(d)



##STR004b##

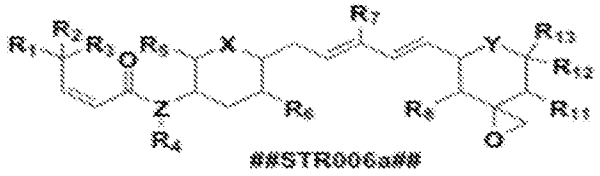
wherein R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8, R_9, R_{10}, R_{11}, R_{12}, and R_{13} are each independently H, alkyl, substituted alkyl, alkenyl, substituted alkenyl, alkynyl, substituted alkynyl, aryl, substituted aryl, heteroaryl, substituted heteroaryl, heterocyclic, substituted heterocyclic, cycloalkyl, substituted cycloalkyl, alkoxy, substituted alkoxy, thioalkyl, substituted thioalkyl, hydroxy, halogen, amino, amido, carboxyl, -C(O)H, acyl, oxyacyl, carbamate, sulfonyl, sulfonamide, or sulfuryl;

(e)



wherein R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8, R_{11}, are each independently H, alkyl, substituted alkyl, alkenyl, substituted alkenyl, alkynyl, substituted alkynyl, aryl, substituted aryl, heteroaryl, substituted heteroaryl, heterocyclic, substituted heterocyclic, cycloalkyl, substituted cycloalkyl, alkoxy, substituted alkoxy, thioalkyl, substituted thioalkyl, hydroxy, halogen, amino, amido, carboxyl, -C(O)H, acyl, oxyacyl, carbamate, sulfonyl, sulfonamide, or sulfuryl;

(f)



Wherein X, Y and Z are each independently -O, -NR, or -S, wherein R is H or C_1-C_{10} alkyl; R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8, R_{11}, R_{12}, and R_{13} are each independently H, alkyl, substituted alkyl, alkenyl, substituted alkenyl, alkynyl, substituted alkynyl, aryl, substituted aryl, heteroaryl, substituted heteroaryl, heterocyclic, substituted heterocyclic, cycloalkyl, substituted cycloalkyl, alkoxy, substituted alkoxy, thioalkyl, substituted thioalkyl, hydroxy, halogen, amino, amido, carboxyl, -C(O)H, acyl, oxyacyl, carbamate, sulfonyl, sulfonamide, or sulfuryl and

Wherein when Z is –NR, R_3 is a non-oxyformyl moiety.

6. The compound according to claim 4-5, wherein said compound is selected from the group consisting of templazole A, templazole B, templamide A and templamide B. or biological pesticide and (c) optionally at least one of a carrier, diluent, surfactant, adjuvant.

7. A method for producing a compound selected from the group consisting of

(A) a compound having the following properties: (i) a molecular weight of about 525-555 as determined by Liquid Chromatography/Mass Spectroscopy (LC/MS); (ii) ^{1}H NMR values of 6.22, 5.81, 5.69, 5.66, 5.65, 4.64, 4.31, 3.93, 3.22, 3.21, 3.15, 3.10, 2.69,

2.62, 2.26, 2.23. 1.74, 1.15, 1.12, 1.05, 1.02; (iii) has ^{13}C NMR values of 172.99, 172.93, 169.57, 169.23, 167.59, 130.74, 130.12, 129.93, 128.32, 73.49, 62.95, 59.42, 57.73, 38.39, 38.00, 35.49, 30.90, 30.36, 29.26, 18.59, 18.38, 18.09, 17.93, 12.51 and (iv) an High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) retention time of about 10-15 minutes, on a reversed phase C-18 HPLC column using a water:acetonitrile (CH_3CN) gradient;

(B) a compound having an oxazolyl-indole structure comprising at least one indole moiety, at least one oxazole moiety, at least one substituted alkyl group, at least one carboxylic ester group; at least 17 carbons, at least 3 oxygens and at least 2 nitrogens;

(C) a compound having an oxazolyl-benzyl structure comprising at least one benzyl moiety, at least one oxazole moiety, at least one substituted alkyl group, at least one amide group, at least 15 carbons, at least 2 oxygens and at least 2 nitrogens;

(D) a compound having at least one ester, at least one amide, at least three methylene groups, at least one tetrahydropyranose moiety, at least three olefinic double bonds, at least six methyl groups, at least three hydroxyl groups, at least twenty five carbons, at least eight oxygens and at least one nitrogen and

(E) a compound having at least one ester, at least one amide, an epoxide methylene group, at least one tetrahydropyranose moiety, at least three olefinic double bonds, at least six methyl groups, at least three hydroxyl groups, at least 25 carbons, at least 8 oxygens, at least 1 nitrogen;

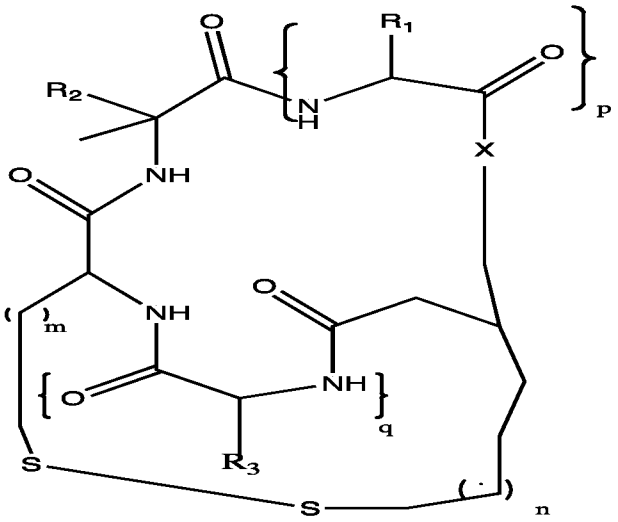
(F) the compound of claim 4;

which method comprises culturing the strain of claim 1-2 and producing said compound.

8. The method according to claim 7, wherein said compound produced is selected from the group consisting of

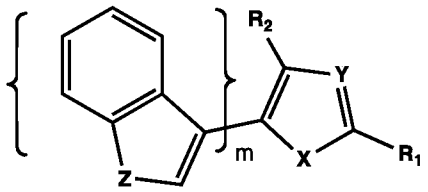
(A) the compound of claim 5;

(B) a compound having the structure ##STR001##



or a pesticidally acceptable salt or steriosomers thereof, wherein M is 1, 2, 3 or 4; n is 0, 1, 2, or 3; p and q are independently 1 or 2; X is O, NH or NR; R1, R2 and R3 are the same or different and independently an amino acid side-chain moiety or an amino acid side-chain derivative and R is a lower chain alkyl, aryl or arylalkyl moiety;

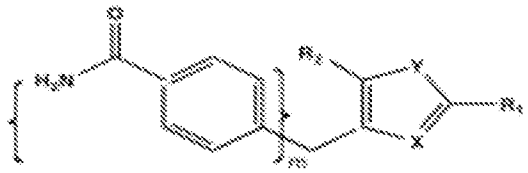
(C) a compound having the structure ##STR002##



##STR002##

wherein X, Y and Z are each independently --O, --NR_1, or --S, wherein R_1 is --H or C_1-C_{10} alkyl; R_1, R_2 and m are each independently --H, alkyl, substituted alkyl, alkenyl, substituted alkenyl, alkynyl, substituted alkynyl, aryl, substituted aryl, heteroaryl, substituted heteroaryl, heterocyclic, substituted heterocyclic, cycloalkyl, substituted cycloalkyl, alkoxy, substituted alkoxy, thioalkyl, substituted thioalkyl, hydroxy, halogen, amino, amido, carboxyl, --C(O)H, acyl, oxyacyl, carbamate, sulfonyl, sulfonamide, or sulfuryl and "m" may be located anywhere on the oxazole ring;

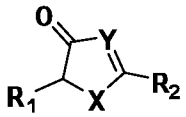
(D) a compound having the structure ##STR003##



##STR003##

wherein: X and Y are each independently --OH, --NR_1, or --S, wherein R_1 is --H or C_1-C_{10} alkyl; R_1, R_2 and m, a substituent on the oxazole ring, are each independently --H, alkyl, substituted alkyl, alkenyl, substituted alkenyl, alkynyl, substituted alkynyl, aryl, substituted aryl, heteroaryl, substituted heteroaryl, heterocyclic, substituted heterocyclic, cycloalkyl, substituted cycloalkyl, alkoxy, substituted alkoxy, thioalkyl, substituted thioalkyl, hydroxy, halogen, amino, amido, carboxyl, --C(O)H, acyl, oxyacyl, carbamate, sulfonyl, sulfonamide, or sulfuryl.

(E) a compound having the structure ##STR005##



##STR005##

wherein: X and Y are each independently --OH, --NR_1, or --S, wherein R_1, R_2 are each independently --H, alkyl (e.g., C_1-C_{10} alkyl), substituted alkyl, alkenyl, substituted alkenyl, alkynyl, substituted alkynyl, aryl, substituted aryl, heteroaryl, substituted heteroaryl, heterocyclic, substituted heterocyclic, cycloalkyl, substituted cycloalkyl, alkoxy, substituted alkoxy, thioalkyl, substituted thioalkyl, hydroxy, halogen, amino, amido, carboxyl, --C(O)H, acyl, oxyacyl, carbamate, sulfonyl, sulfonamide, or sulfuryl.

9. The method according to claim 7-8 wherein said compound produced is selected from the group consisting of:

(i) templazole A;

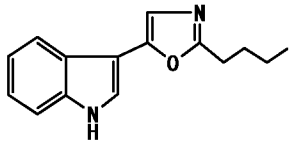
(ii) teplazole B;

(iii) templamide A;

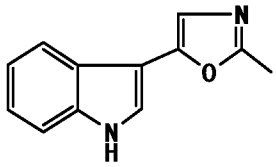
(iv) templamide B

(v) FR90128;

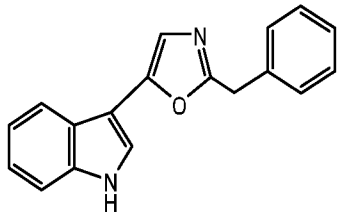
(vi)



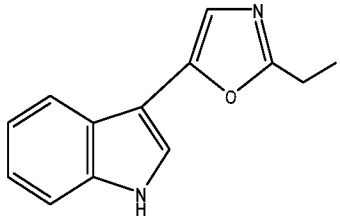
(vii)



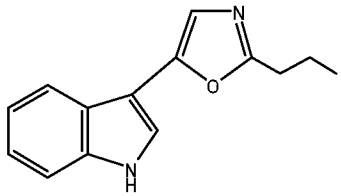
(viii)



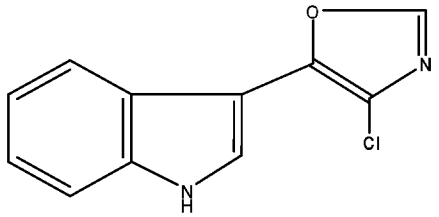
(ix)



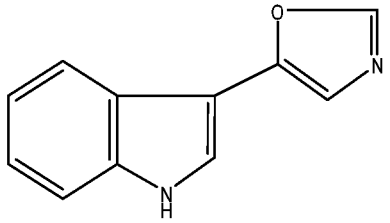
(x)



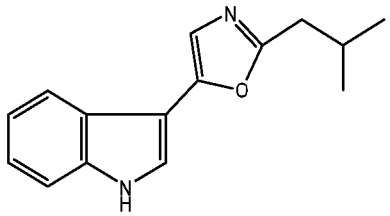
(xi)



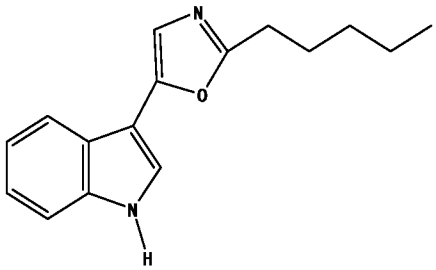
(xii)



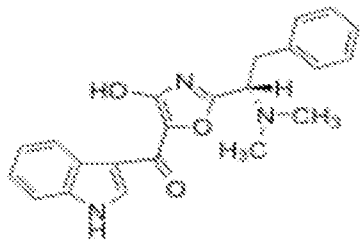
(xiii)



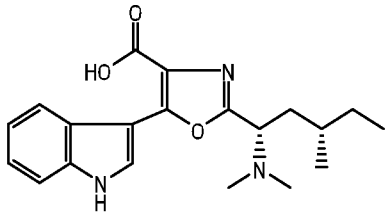
(xiv)



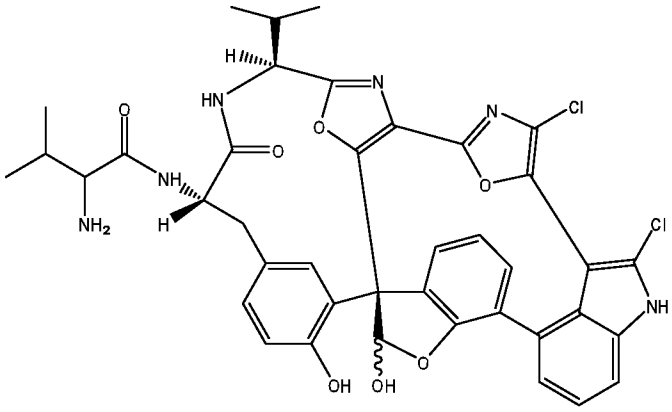
(xv)



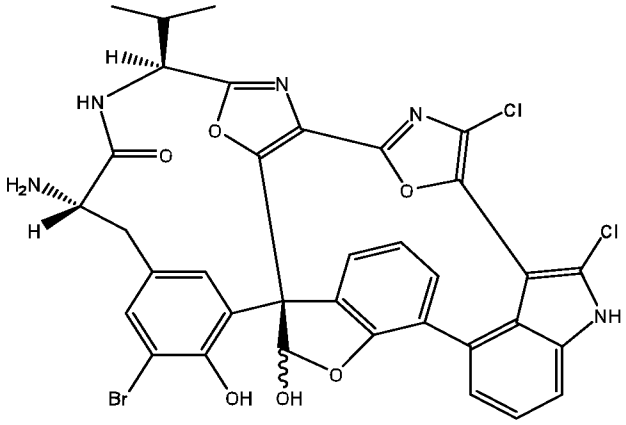
(xvi)



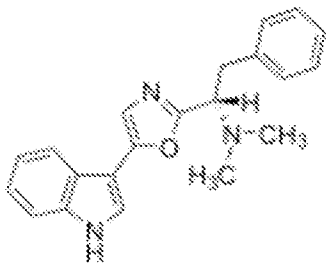
(xvii)



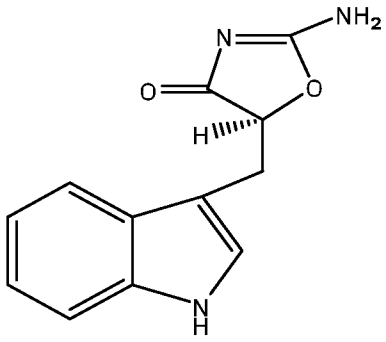
(xviii)



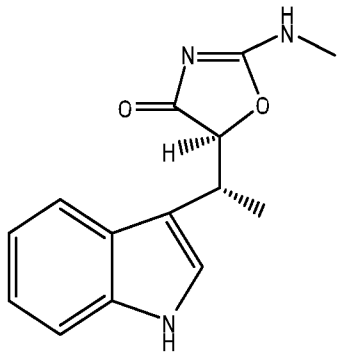
(xix)



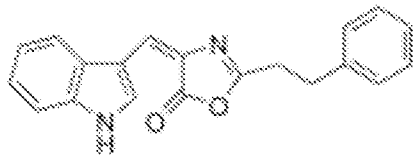
(xx)



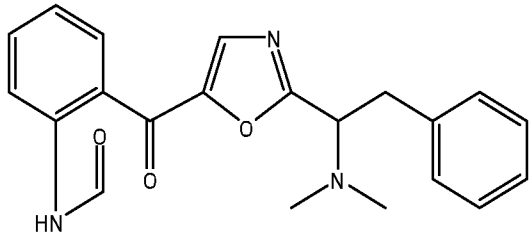
(xxi)

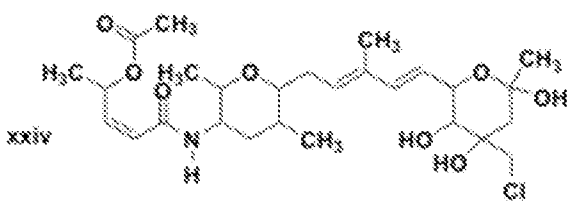


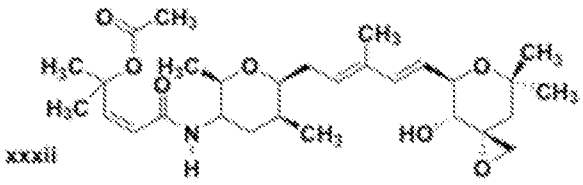
(xxii)

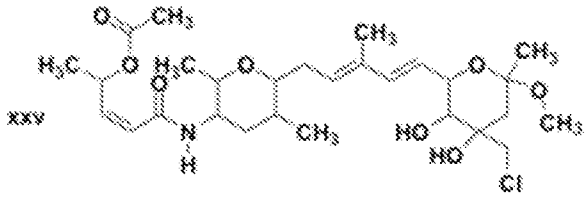


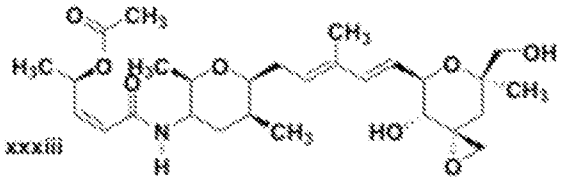
(xxiii)

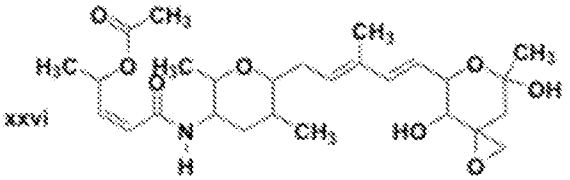


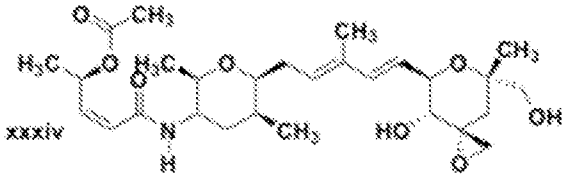

xxiv

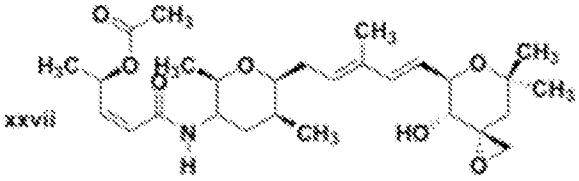

xxxii

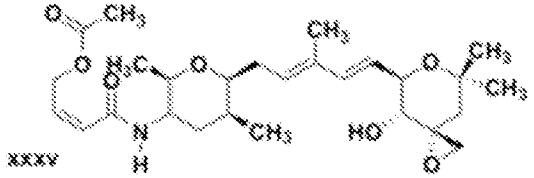

xxv

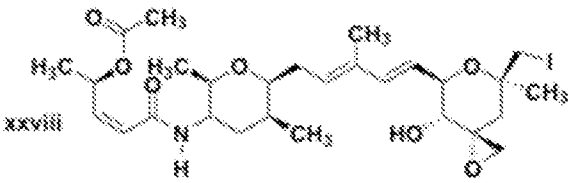

xxxiii

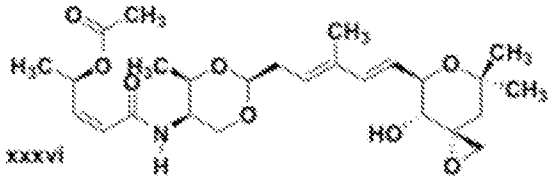

xxvi

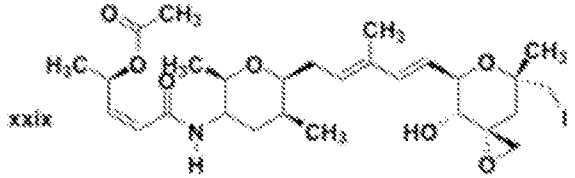

xxxiv

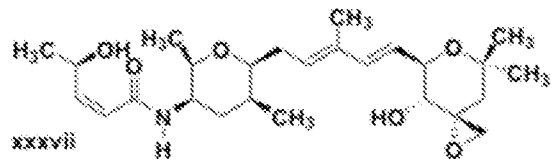

xxvii

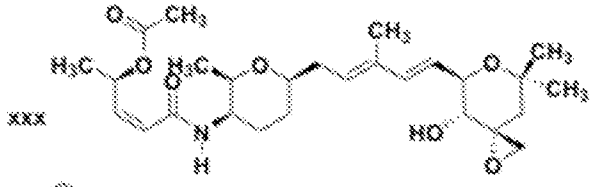

xxxv

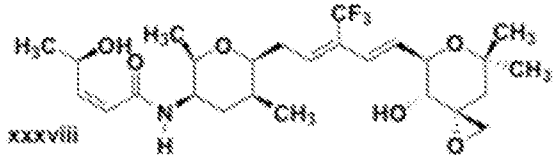

xxviii

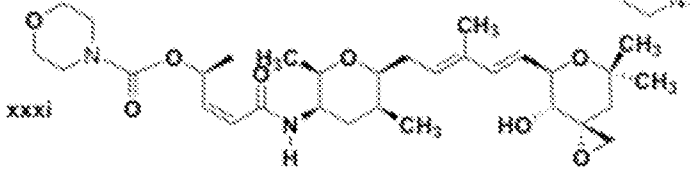

xxxvi

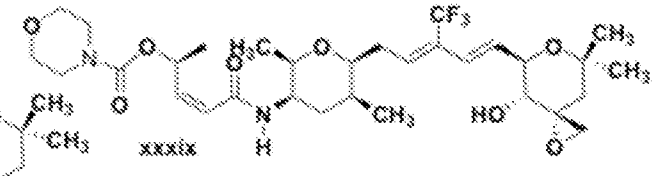

xxix


xxxvii


xxx


xxxviii


xxxi


xxxix

(XL) FR901465.

10. A method for isolating a compound from a strain of *Burkholderia* comprising (a) producing a compound according to the method of claim 7-9; (b) isolating the compound produced in step (a) from the supernatant of said culture.

11. A combination comprising (a) a first substance selected from the group consisting of (i) a pure culture, cell fraction or supernatant derived from the strain of claims 1-2 or extract thereof; (ii) the compound of claims 4-6; (iii) a compound produced by the strain of claims 1-2; and (iii) a compound isolated according to the method of claim 9; (b) optionally a second substance, wherein said second substance is a chemical or biological pesticide and (c) optionally at least one of a carrier, diluent, surfactant, adjuvant.

12. The combination according to claim 11, wherein said second substance is a pesticide selected from the group consisting of nematicide, herbicide, fungicide and insecticide.

13. The combination according to claim 11-12, wherein said combination is a composition.

14. A method for modulating pest infestation in a plant comprising applying to the plant and/or seeds thereof and/or substrate used for growing said plant an amount of the combination of claim 11-13 effective to modulate said pest infestation.

15. A method for modulating emergence and/or growth of monocotyledonous, sedge or dicotyledonous weeds comprising applying to said weed or soil an amount of the combination of claim 11-13 effective to modulate said emergence and/or growth of said weeds.

16. A seed comprising the combination of claim 13.

17. Use of a compound selected from the group consisting of

(A) a compound having the following properties: (i) a molecular weight of about 525-555 as determined by Liquid Chromatography/Mass Spectroscopy (LC/MS); (ii) 1H NMR values of 6.22, 5.81, 5.69, 5.66, 5.65, 4.64, 4.31, 3.93, 3.22, 3.21, 3.15, 3.10, 2.69, 2.62, 2.26, 2.23. 1.74, 1.15, 1.12, 1.05, 1.02; (iii) has 13C NMR values of 172.99, 172.93, 169.57, 169.23, 167.59, 130.74, 130.12, 129.93, 128.32, 73.49, 62.95, 59.42, 57.73, 38.39, 38.00, 35.49, 30.90, 30.36, 29.26, 18.59, 18.38, 18.09, 17.93, 12.51 and (iv) an High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) retention time of about 10-15 minutes, on a

reversed phase C-18 HPLC column using a water:acetonitrile (CH_3CN) gradient;

(B) a compound having an oxazolyl-indole structure comprising at least one indole moiety, at least one oxazole moiety, at least one substituted alkyl group, at least one carboxylic ester group, at least 17 carbons, at least 3 oxygen and at least 2 nitrogens;

(C) a compound having an oxazolyl-benzyl structure comprising at least one benzyl moiety, at least one oxazole moiety, at least one substituted alkyl group and at least one amide group; at least 15 carbons, at least 2 oxygens, at least 2 nitrogens;

(D) a compound having at least one ester, at least one amide, at least three methylene groups, at least one tetrahydropyranose moiety, at least three olefinic double bonds, at least six methyl groups, at least three hydroxyl groups, at least twenty five carbons, at least eight oxygens and at least one nitrogen and

(E) a compound having at least one ester, at least one amide, an epoxide methylene group, at least one tetrahydropyranose moiety and at least three olefinic double bonds, at least six methyl groups, at least three hydroxyl groups, at least 25 carbons, at least 8 oxygens, and at least 1 nitrogen, and optionally a pesticide for formulating a composition for modulating pest infestation in a plant and/or modulating emergence and/or growth of monocotyledonous, sedge or dicotyledonous weeds.

18. The use according to claim 17, wherein said pest is selected from the group consisting of nematodes, fungi, weeds and insects.

Figure 1

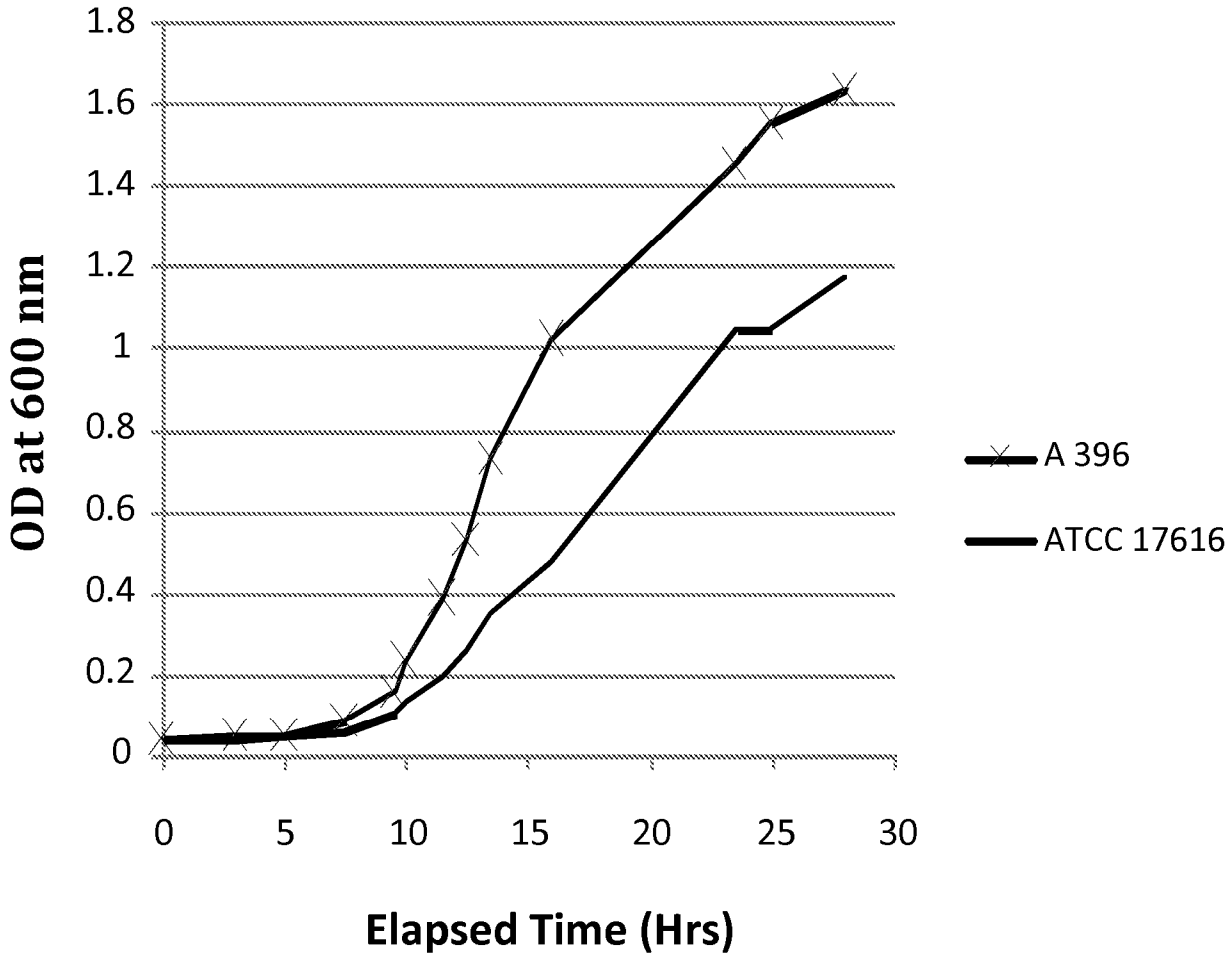

1.8
1.6
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
OD at 600 nm
0
5
10
15
20
25
30
Elapsed Time (Hrs)
A 396
ATCC 17616

Figure 2

UTC (back)
A396 @ 5 mg/mL (middle)
A396 @ 10 mg/mL (front)



Figure 3

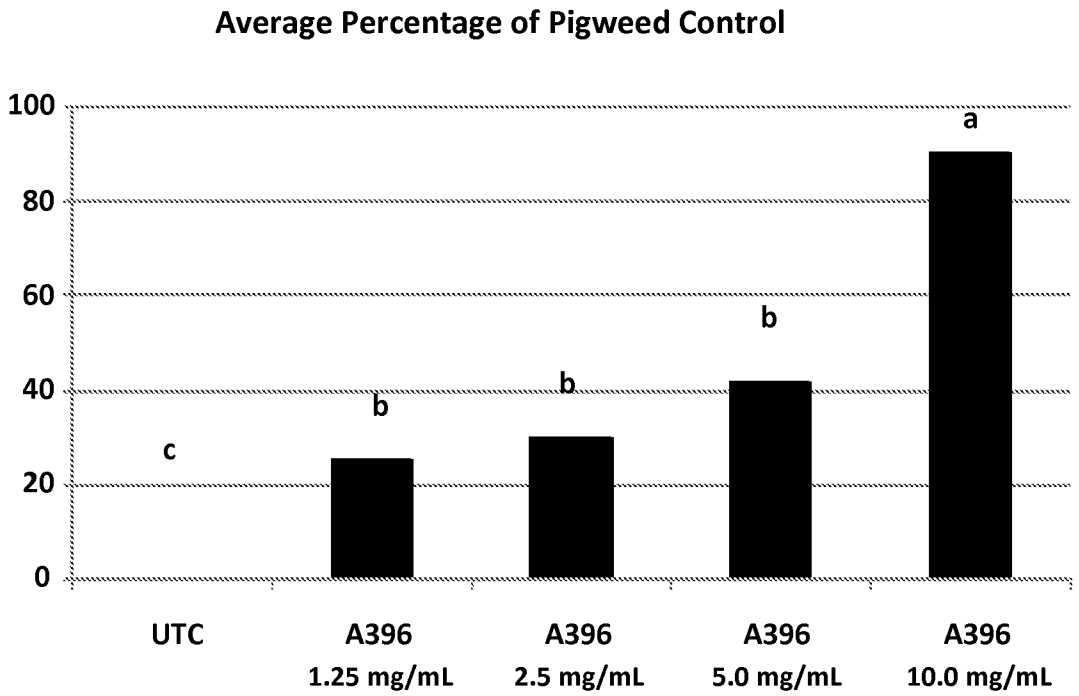

Average Percentage of Pigweed Control
100
80
60
40
20
0
c
b
b
b
a
UTC
A396
1.25 mg/mL
A396
2.5 mg/mL
A396
5.0 mg/mL
A396
10.0 mg/mL

Figure 4

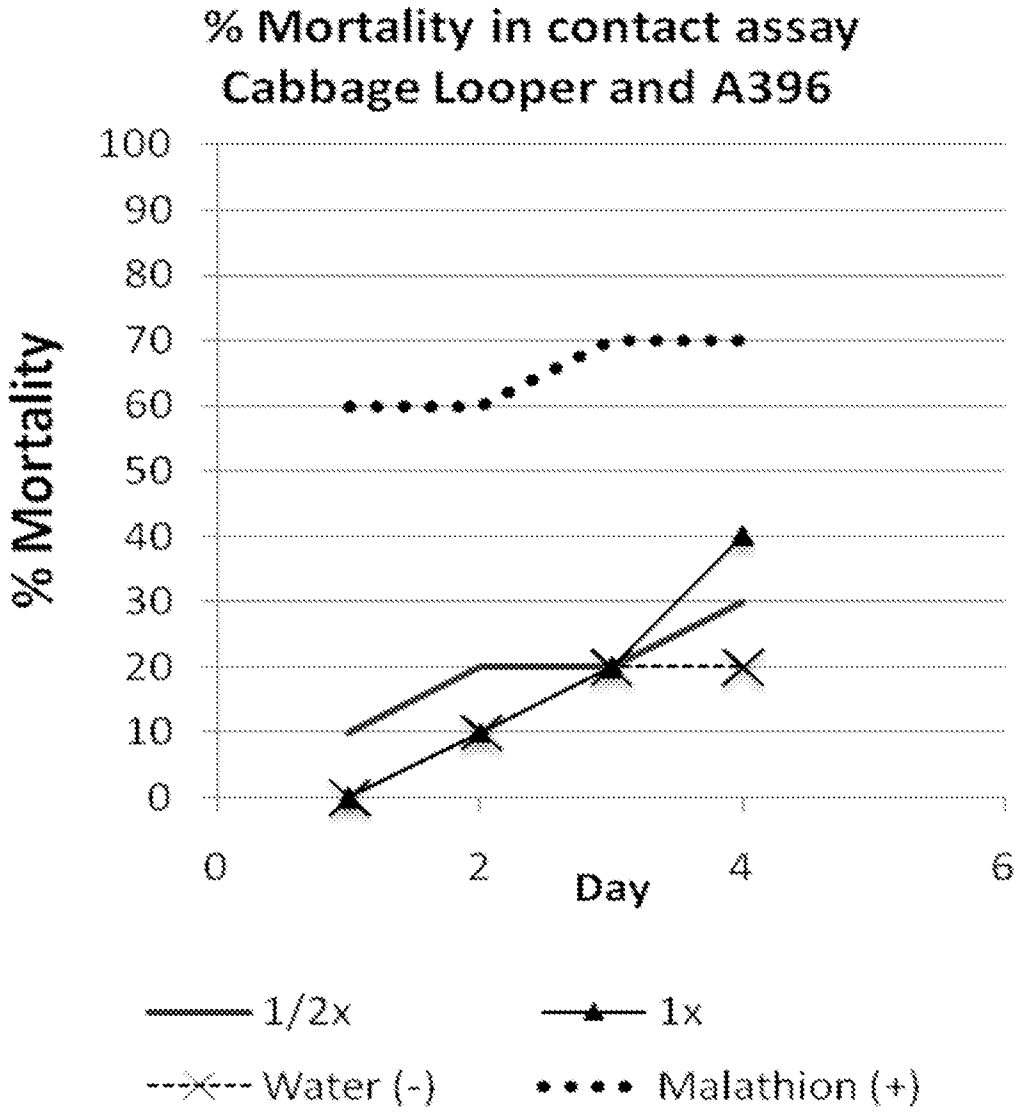

% Mortality in contact assay
Cabbage Looper and A396
% Mortality
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
2
4
6
Day
1/2x
1x
Water (-)
Malathion (+)

Figure 5

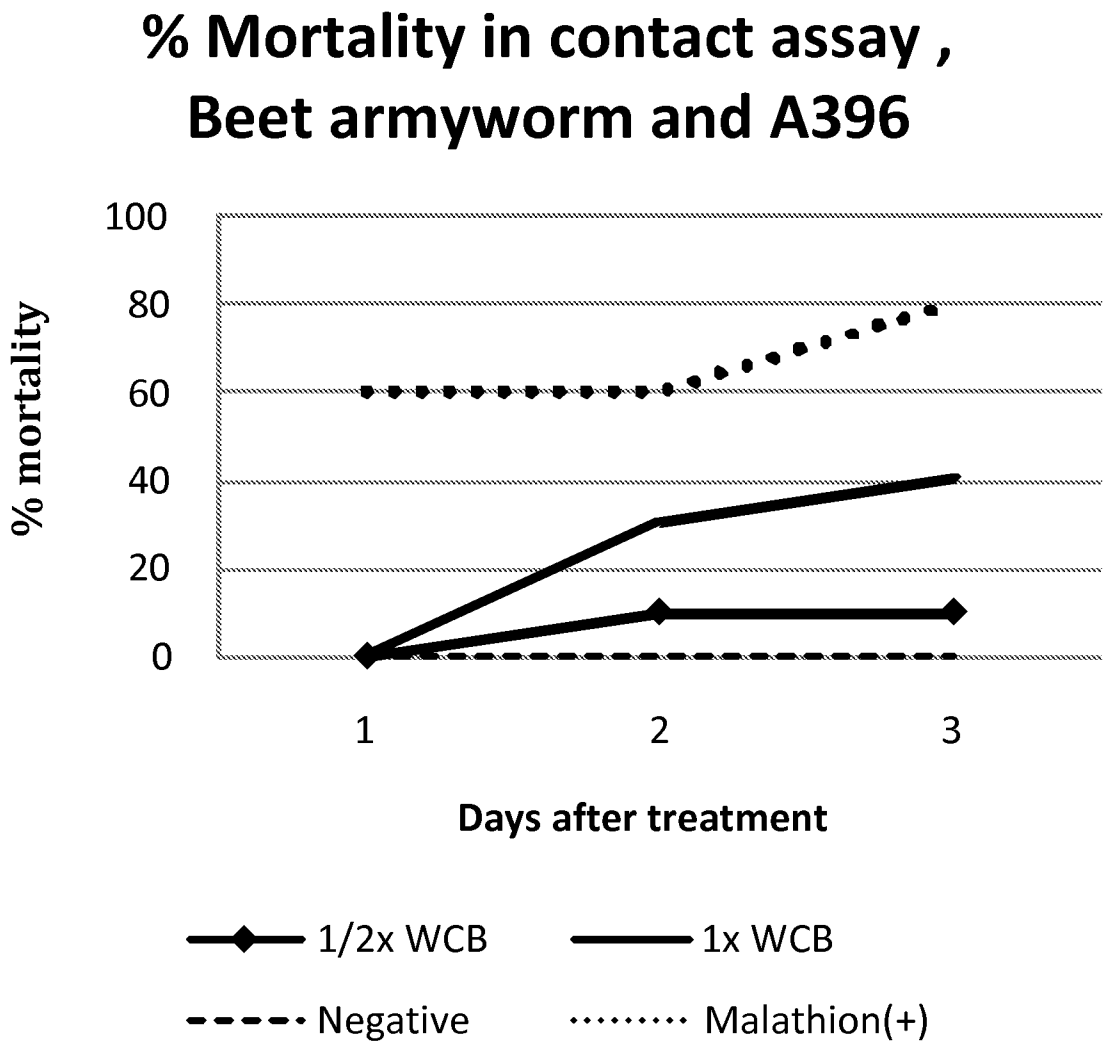

% Mortality in contact assay , Beet armyworm and A396
% mortality
100
80
60
40
20
0
1
2
3
Days after treatment
1/2x WCB
1x WCB
Negative
Malathion(+)

Figure 6

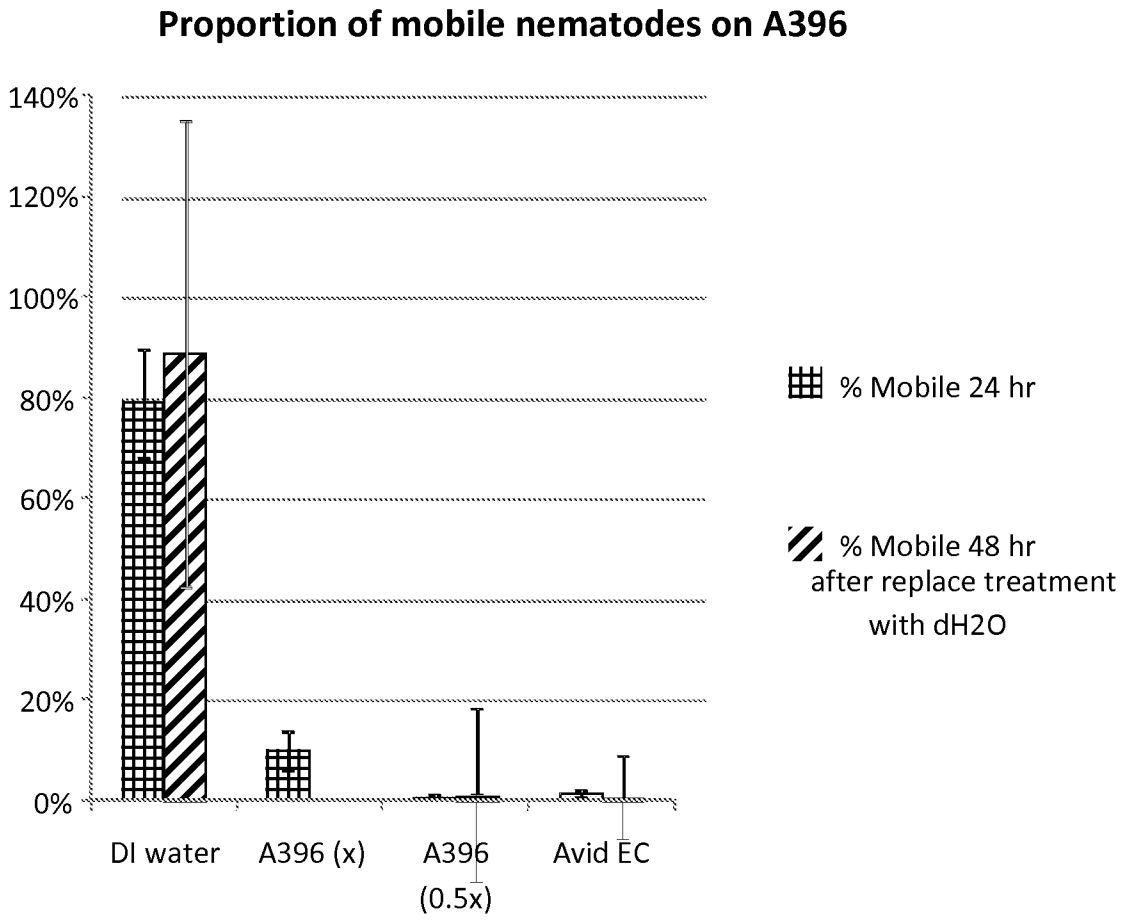

Proportion of mobile nematodes on A396
140%
120%
100%
80%
60%
40%
20%
0%
DI water
A396 (x)
A396 (0.5x)
Avid EC
% Mobile 24 hr
% Mobile 48 hr after replace treatment with dH2O

Figure 7

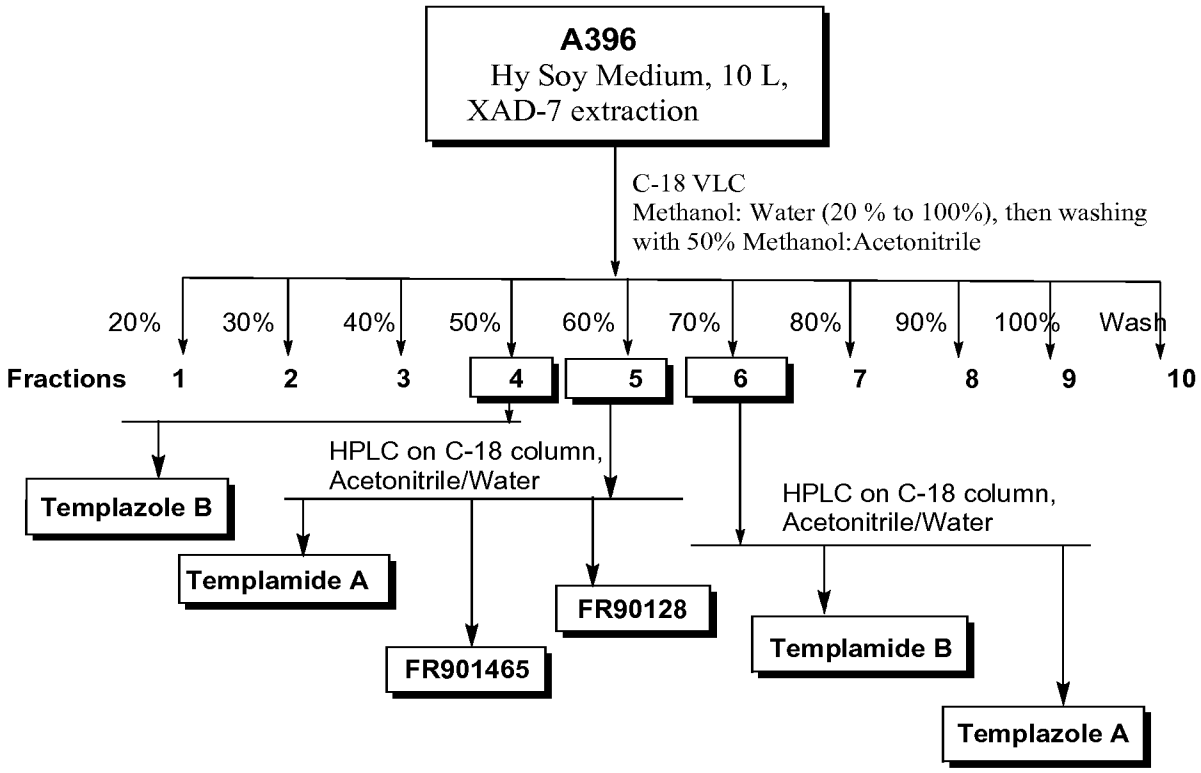

A396
Hy Soy Medium, 10 L,
XAD-7 extraction
C-18 VLC
Methanol: Water (20 % to 100%), then washing with 50% Methanol:Acetonitrile
20%
30%
40%
50%
60%
70%
80%
90%
100%
Wash
Fractions
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
HPLC on C-18 column, Acetonitrile/Water
HPLC on C-18 column, Acetonitrile/Water
Templazole B
Templamide A
FR901465
FR90128
Templamide B
Templazole A

Figure 8

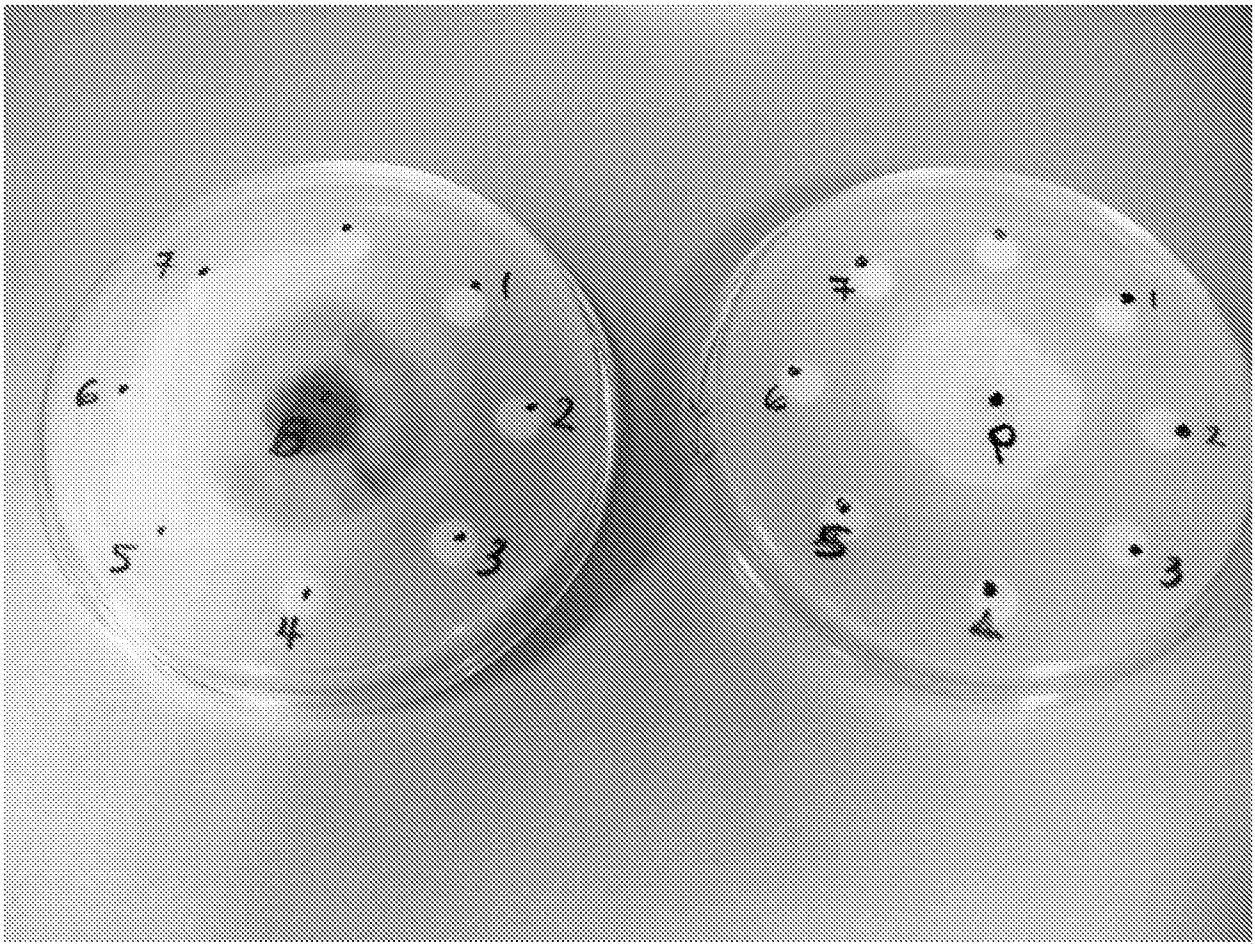


Figure 9

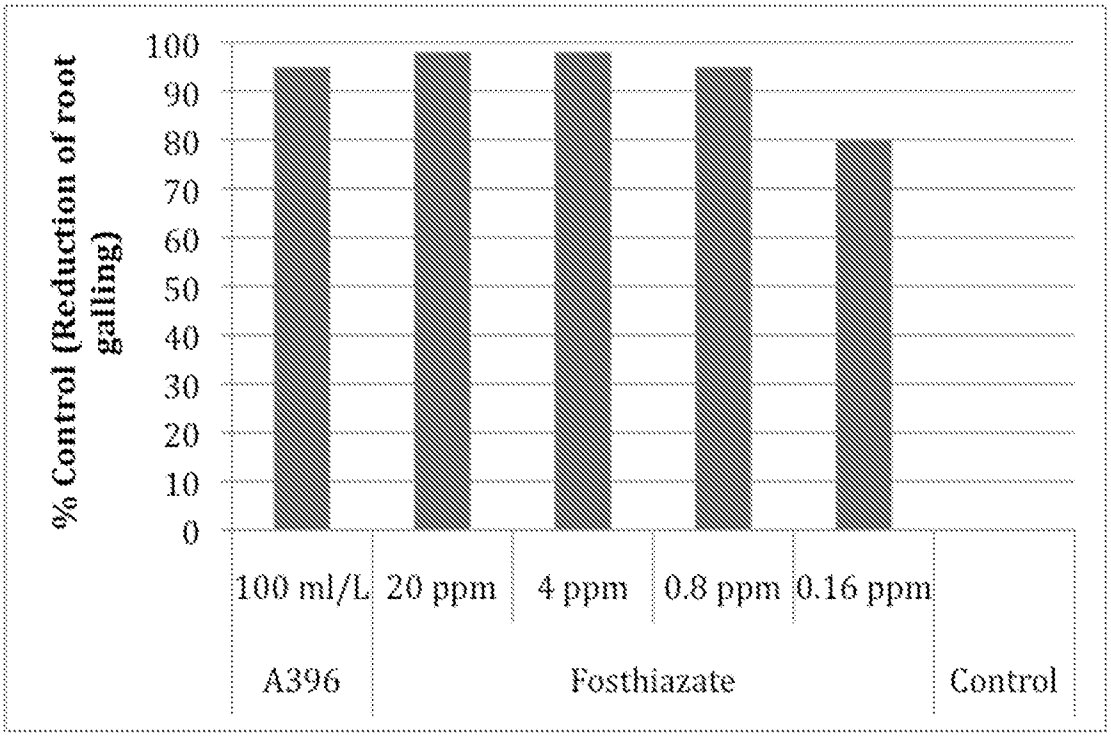
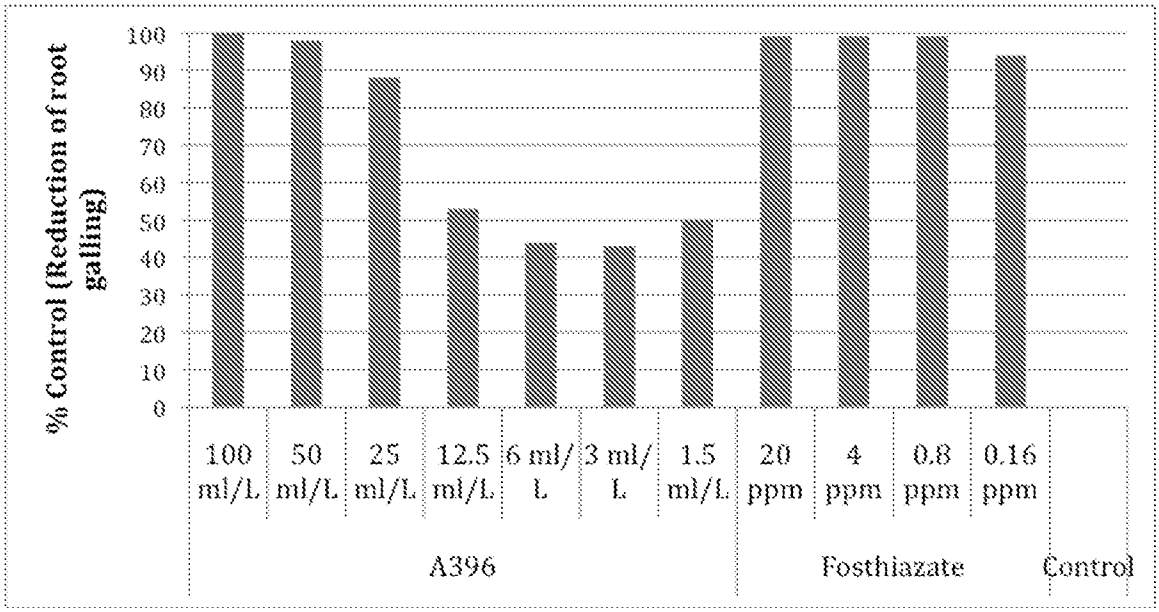

% Control (Reduction of root galling)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
100 ml/L
20 ppm
4 ppm
0.8 ppm
0.16 ppm
A396
Fosthiazate
Control

Figure 10


% Control (Reduction of root galling)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
100 ml/L
50 ml/L
25 ml/L
12.5 ml/L
6 ml/L
3 ml/L
1.5 ml/L
20 ppm
4 ppm
0.8 ppm
0.16 ppm
A396
Fosthiazate
Control

(12) PUBLICACIÓN DE LA SOLICITUD INTERNACIONAL BAJO PCT

(19) Organización Mundial de Propiedad Intelectual
Oficina internacional

(43) Fecha de publicación internacional
1° de septiembre de 2011 (01.09.2011)

(10) Número de publicación internacional
WO 2011/106491 A2

(51) Clasificación internacional de Patentes:

C12N 1/20 *(2006.01)* **A01N 43/14** *(2006.01)*

A01N 63/02 *(2006.01)* **A01P 7/00** (2006.01)

A01N 43/74 *(2006.01)*

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/US2011/026016

(22) Fecha de la presentación internacional
24 de febrero de 2011 (24.02.2011)

(25) Idioma de la presentación:
inglés

(26) Idioma de la publicación:
inglés

(30) Datos de la prioridad
61/308,287 25 de febrero de 2010 (25.02.2010) US
61/406,541 25 de octubre de 2010 (25.10.2010) US

(71) Solicitante (*para todos los estados designados con excepción de US)* **MARRONE BIO INNOVATIONS, INC** [US/US]; 2121 Second Street Suite 107B, Davis, CA 95618 (US).

(72) Inventores; e
(75) Inventores/Solicitantes: *(solamente para US)* **ASOLKAR, Ratnakar** [IN/US]; 4005 Cowell Blvd, Davis, CA 95618 (US). **KOIVUNEN, Marja** [FI/US]; 1236 Evans Court, Davis, CA 95618 (US). **MARRONE, Pamela** [US/US]; 3333 Victoria Place, Davis, CA 95616 (US). **HUANG, Huazhang** [CN/US]; 2674 Briscoe Place, Woodland, CA 95776 (US). **CORDOVA-KREYLOS, Ana Lucia** [MX/US]; 18 Simmons Way, Davis, CA 95616 (US).

(74) Representante: AGRIS, Cheryl, H.; The Law

(81) Estados designados *(en la medida en que no se indique lo contrario para cada tipo de protección nacional disponible):*AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados: *(en la medida en que no se indique lo contrario para cada tipo de protección regional disponible*): Patente ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW) Patente euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), Patente europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR) OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declaración según regla 4.17:
- en referencia al derecho de la solicitante para solicitar una patente y obtenerla (regla 4.17 cifra ii)
- en relación a la legitimidad del solicitante para reivindicar la prioridad de una solicitud anterior (regla 4.17 (iii)).
- Con listado de secuencias como parte de la memoria (regla 5.2(a))

Publicado:
- sin el informe de búsqueda internacional y será publicado nuevamente luego de recibir

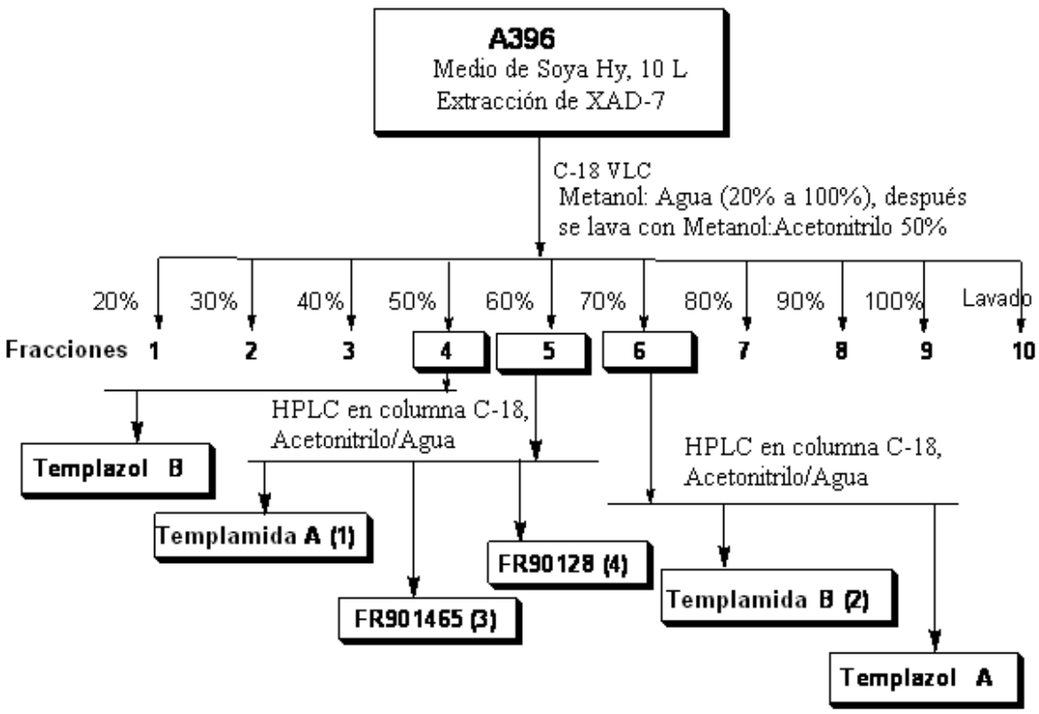
Offices of Cheryl H. Agris, Phd, PC, P.O. Box 8495, Pelham, NY 10803 (US)

dicho informe (regla 48 párrafo 2 letra g).

(54) Título: **CEPA BACTERIANA AISLADA DEL GÉNERO *BURKHOLDERIA* Y METABOLITOS PESTICIDAS DEL MISMO**

(57) Resumen: La presente invención se refiere a especies de *Burkholderia sp* sin patogenicidad conocida a vertebrados pero con actividad pesticida (por ejemplo, plantas, insectos, hongos, malezas y nemátodos). También se proporcionan productos naturales derivados de un cultivo de las especies y métodos para controlar las plagas usando los productos naturales.

Figura 7



CEPA BACTERIANA AISLADA DEL GÉNERO *BURKHOLDERIA* Y METABOLITOS PESTICIDAS DEL MISMO

CAMPO DE LA INVENCIÓN

Proporcionada en la presente está una especie de *Burkholderia sp* sin patogenicidad conocida a vertebrados, tales como mamíferos, peces y aves pero actividad pesticida contra plantas, insectos, hongos y nemátodos. También se proporcionan productos naturales derivados de un cultivo de las especies y métodos para controlar la germinación y crecimiento de dicotiledóneas, monocotiledóneas y malezas de juncias, modulando el crecimiento de hongo y controlando placas tales como insectos y nemátodos usando los productos naturales.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Los productos naturales son sustancias producidas por microbios, plantas y otros organismos. Los productos naturales microbianos ofrecen una fuente abundante de diversidad química, y existe una larga historia para utilizar productos naturales para propósitos farmacéuticos. Uno de tal compuesto es FR901228 aislado de *Chromobacterium* y se ha encontrado por ser útil como un agente antibacteriano y agente antitumoral (véase, por ejemplo, Ueda et al., Patente Estadounidense No. 7,396,665).

Sin embargo, metabolitos secundarios producidos por microbios también han sido exitosamente encontrados por tener usos para control de plagas y malezas en aplicaciones agrícolas (véase, por ejemplo, Nakajima et al. 1991; Duke et al., 2000; Lydon & Duke, 1999; Gerwick et al., Patente Estadounidense No. 7,393,812). Productos naturales microbianos han sido también exitosamente desarrollados en insecticidas agrícolas (véase, por

ejemplo, Salama et al. 1981; Thompson et al., 2000; Krieg et al. 1983). Algunas veces, tales productos naturales se han combinado con pesticidas químicas (véase, por ejemplo, Gottlieb, Patente Estadounidense No. 4,808,207).

Burkholderia

El género Burkholderia, subdivisión β de la proteobacteria, comprenden más de 40 especies que inhabitan nichos ecológicos diversos (Compant et al., 2008). Las especies bacterianas en el género *Burkholderia* son organismos ubicuos en suelo y rizosfera (Coenye and Vandamme, 2003; Parke and Gurian-Sherman, 2001). Tradicionalmente, se han conocido como patógenos vegetales, *B. cepacia* es el primero descubierto e identificado como el patógeno que causa la enfermedad en cebolla (Burkholder, 1950). Varias especies de *Burkholderia* han desarrollado interacciones benéficas con sus hospederos vegetales (véase, p.ej., Cabballero-Mellado et al., 2004, Chen et al., 2007). Algunas especies de *Burkholderia* también se han encontrado por ser patógenos humanos oportunistas (véase, p.ej., Cheng and Currie, 2005 y Nierman et al., 2004). Adicionalmente, algunas especies de *Burkholderia* se han encontrado por tener potencial como productos de biocontrol (véase p.ej., Burkhead et al., 1994; Knudsen et al., 1987; Jansiewicz et al., 1988; Gouge et al., Solicitud de Patente Estadounidense No. 2003/0082147; Parke et al., Patente Estadounidense No. 6,077,505; Casida et al., Patente Estadounidense No. 6,689,357; Jeddeloh et al., WO2001055398; Zhang et al., Patente Estadounidense No. 7,141,407). Algunas especies en este género han sido efectivas en bioremedios para descontaminar suelos contaminados o aguas subterráneas (véase, p.ej., Leahy et al. 1996). Además, algunas especies de *Burkholderia* se han

encontrado por secretar una variedad de enzimas extracelulares con actividades proteolíticas, lipolíticas y hemolíticas, así como también toxinas, antibióticos y sideróforos (véase, por ejemplo, Ludovic et al., 2007; Nagamatsu, 2001).

Oxazoles, Tiazoles e Indoles

Oxazoles, tiazoles e indoles son ampliamente distribuidos en plantas, algas, esponjas y microorganismos. Un gran número de productos naturales contienen uno o más de las porciones de núcleo oxazol, tiazol e indol de cinco elementos.

Estos productos naturales exhiben un amplio espectro de actividad biológica de valor terapéutico demostrable. Por ejemplo, la bleomicina A (Tomohisa et al.), un fármaco anticancerígeno ampliamente descrito, efectúa la degradación oxidativa de ADN y usa una porción de bitiazol para enlazar sus secuencias de ADN objetivo (Vanderwall et al., 1997). La Bacitracina (Ming et al., 2002), un antibiótico peptídico que contiene tiazolina, pone en entre dicho la nueva biosíntesis de la pared celular bacteriana por formación de complejos con C55-bactoprenolpirofosfato. El Tiangazol (Kunze et al., 1993) contiene un arreglo en serie de un oxazol y tres tiazolinas y exhibe actividad antiviral (Jansen et al., 1992). Aún otros productos naturales que contienen oxazol/tiazol tales como tiostreptona (Anderson et al., 1970) y GE2270A (Selva et al., 1997) inhiben las etapas de traducción en la síntesis de proteína bacteriana. Más de 1000 alcaloides con el esqueleto indol se han reportado a partir de microorganismos. Un tercio de estos compuestos son péptidos con masas más allá de 500 Da en donde el indol es derivado de triptofano. La variedad estructural de los dos tercios remanentes es superior, y su actividad biológica

parece cubrir un intervalo más amplio, que incluye actividad antimicrobiana, antiviral, citotóxica, insecticida, antitrombótica o inhibidora de enzima.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

Proporcionada en la presente está una cepa aislada de una no *Burkholderia cepacia,* no *Burkholderia plantari*, no *Burkholderia gladioli*, *Burkholderia sp.* la cual tiene las siguientes características:

a. Tiene una secuencia de gen de 16S rARN que comprende secuencias delanteras que tienen al menos 50% de identidad a las secuencias expuestas en la SEC ID NO:8, 11 y 12 y una secuencia inversa que tiene al menos 99.5% de identidad con la SEC ID NO:9, 10, 13–15;

b. Tiene actividad pesticida, en particular, herbicida, insecticida, fungicida y nematicida;

c. Produce al menos uno de los compuestos seleccionados a partir del grupo que consiste de:

(i) un compuesto que tiene las siguientes propiedades: (a) un peso molecular de aproximadamente 525–555 como se determina por Cromatografía Líquida/Espectroscopia de Masas (LC/MS); (b) ^{1}H NMR con valores de 6.22, 5.81, 5.69, 5.66, 5.65, 4.64, 4.31, 3.93, 3.22, 3.21, 3.15, 3.10, 2.69, 2.62, 2.26, 2.23. 1.74, 1.15, 1.12, 1.05, 1.02; (c) tiene ^{13}C NMR con valores de 172.99, 172.93, 169.57, 169.23, 167.59, 130.74, 130.12, 129.93, 128.32, 73.49, 62.95, 59.42, 57.73, 38.39, 38.00, 35.49, 30.90, 30.36, 29.26, 18.59, 18.38, 18.09, 17.93, 12.51 y (c) un tiempo de retención de Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC) de aproximadamente 10–15 minutos, en una

columna de HPLC C-18 de fase inversa usando un gradiente de agua:acetonitrilo (CH_3CN);

(ii) un compuesto que tiene una estructura oxazolil-indol que comprende al menos una porción indol, al menos una porción oxazol, al menos un grupo alquilo sustituido y al menos un grupo éster carboxílico; al menos 17 carbonos y al menos 3 oxígenos y 2 nitrógenos;

(iii) un compuesto que tiene una estructura oxazolil-bencilo que comprende al menos una porción bencilo, al menos una porción oxazol, al menos un grupo alquilo sustituido y al menos un grupo amida; al menos 15 carbonos y al menos 2 oxígenos y 2 nitrógenos;

(iv) un compuesto que tiene al menos un éster, al menos una amida, al menos tres grupos metileno, al menos una porción tetrahidropiranosa y al menos tres enlaces dobles olefínicos, al menos seis grupos metilo, al menos tres grupos hidroxilo, al menos veinticinco carbonos y al menos ocho oxígenos y un nitrógeno y

d. es no patogénico (no infeccioso) a animales vertebrados, tales como mamíferos, aves y peces;

e. es susceptible a canamicina, cloranfenicol, ciprofloxacina, piperacilina, imipenem, y una combinación de sulfametoxazol y trimetoprim y

f. contiene los ácidos grasos 16:0, ciclo 17:0, 16:0 3- OH, 14:0, ciclo 19:0 ω8*c*, 18:0.

En una modalidad particular, la cepa tiene las características de identificación de una cepa de *Burkholderia* A396 (NRRL Acceso No. B-50319).

Descritos en la presente están compuestos aislados los

cuales son opcionalmente obtenibles por derivados de especies de *Burkholderia*, o alternativamente, organismos capaces de producir estos compuestos que pueden ser usados para controlar varias plagas, particularmente plagas fitopatogénicas en planta, ejemplos de las cuales incluyen pero no se limitan a insectos, nemátodos, bacterias, hongos. Estos compuestos también pueden ser usados como herbicidas.

En particular, los compuestos pesticidas aislados pueden incluir pero no se limitan a:

(A) un compuesto que tiene las siguientes propiedades: (i) un peso molecular de aproximadamente 525-555 como se determina por Cromatografía Líquida/Espectroscopia de Masas (LC/MS); (ii) ^{1}H NMR con valores δ de 6.22, 5.81, 5.69, 5.66, 5.65, 4.64, 4.31, 3.93, 3.22, 3.21, 3.15, 3.10, 2.69, 2.62, 2.26, 2.23. 1.74, 1.15, 1.12, 1.05, 1.02; (iii) tiene ^{13}C NMR con valores δ de 172.99, 172.93, 169.57, 169.23, 167.59, 130.74, 130.12, 129.93, 128.32, 73.49, 62.95, 59.42, 57.73, 38.39, 38.00, 35.49, 30.90, 30.36, 29.26, 18.59, 18.38, 18.09, 17.93, 12.51 y (iv) un tiempo de retención de Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC) de aproximadamente 10-15 minutos, en una columna de HPLC C-18 de fase inversa usando un gradiente de agua:acetonitrilo (CH_3CN);

(B) un compuesto que tiene una estructura oxazolil-indol que comprende al menos una porción indol, al menos una porción oxazol, al menos un grupo alquilo sustituido y al menos un grupo éster carboxílico; al menos 17 carbonos y al menos 3 oxígenos y 2 nitrógenos;

(C) un compuesto que tiene una estructura oxazolil-bencilo que comprende al menos una porción bencilo, al menos una porción

oxazol, al menos un grupo alquilo sustituido y al menos un grupo amida; al menos 15 carbonos y al menos 2 oxígenos y 2 nitrógenos;

(D) un compuesto que tiene al menos un éster, al menos una amida, al menos tres grupos metileno, al menos una porción tetrahidropiranosa y al menos tres enlaces dobles olefínicos, al menos seis grupos metilo, al menos tres grupos hidroxilo, al menos veinticinco carbonos y al menos ocho oxígenos y un nitrógeno y

(E) un compuesto que tiene al menos un éster, al menos una amida, un grupo metileno epóxido, al menos una porción tetrahidropiranosa, al menos tres enlaces dobles olefínicos, al menos seis grupos metilo, al menos tres grupos hidroxilo, al menos 25 carbonos, al menos 8 oxígenos y al menos 1 nitrógeno.

En una modalidad particular, los compuestos aislados pueden incluir pero no se limitan a:

(A) un compuesto que tiene una estructura oxazolil-indol que comprende al menos una porción indol, al menos una porción oxazol, al menos un grupo alquilo sustituido, al menos un grupo éster carboxílico, al menos 17 carbonos, al menos 3 oxígenos y al menos 2 nitrógenos; y los cuales tienen al menos uno de los siguientes: (i) un peso molecular de aproximadamente 275-435; (ii) ^{1}H NMR δ valores a 8.44, 8.74, 8.19, 7.47, 7.31, 3.98, 2.82, 2.33, 1.08; (iii) ^{13}C NMR con valores δ de δ 163.7, 161.2, 154.8, 136.1, 129.4, 125.4, 123.5, 123.3, 121.8, 121.5, 111.8, 104.7, 52.2, 37.3, 28.1, 22.7, 22.7; (iv) un tiempo de retención de Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC) de aproximadamente 10-20 minutos en una columna de HPLC C-18 de fase inversa usando

agua:acetonitrilo (CH_3CN) con un sistema de solvente gradiente y detección UV de 210 nm; (v) bandas de absorción UV a aproximadamente 226, 275, 327 nm.;

(B) un compuesto que tiene una estructura oxazolil-bencilo que comprende al menos una porción bencilo, al menos una porción oxazol, al menos un grupo alquilo sustituido y al menos un grupo amida; al menos 15 carbonos y al menos 2 oxígenos, al menos 2 nitrógenos; y al menos una de las siguientes características: (i) un peso molecular de aproximadamente 240-290 como se determina por Cromatografía Líquida/Espectroscopia de Masas (LC/MS); (ii) ^{1}H NMR valores δ a aproximadamente 7.08, 7.06, 6.75, 3.75, 2.56, 2.15, 0.93, 0.93; (iii) ^{13}C NMR con valores de δ 158.2, 156.3, 155.5, 132.6, 129.5, 129.5, 127.3, 121.8, 115.2, 115.2, 41.2, 35.3, 26.7, 21.5, 21.5; (iv) un tiempo de retención de Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC) de aproximadamente 6-15 minutos, en una columna de HPLC C-18 de fase inversa usando un gradiente de agua:acetonitrilo (CH_3CN) y (v) bandas de absorción UV a aproximadamente 230, 285, 323 nm;

(C) un compuesto no epóxido que comprende al menos un éster, al menos una amida, al menos tres grupos metileno, al menos una porción tetrahidropiranosa y al menos tres enlaces dobles olefínicos, al menos seis grupos metilo, al menos tres grupos hidroxilo, al menos veinticinco carbonos, al menos ocho oxígenos y un nitrógeno y al menos una de las siguientes características: (i) un peso molecular de aproximadamente 530-580 como se determina por Cromatografía Líquida/Espectroscopia de Masas (LC/MS); (ii) ^{1}H NMR con valores δ de 6.40, 6.39, 6.00, 5.97, 5.67, 5.54, 4.33, 3.77,

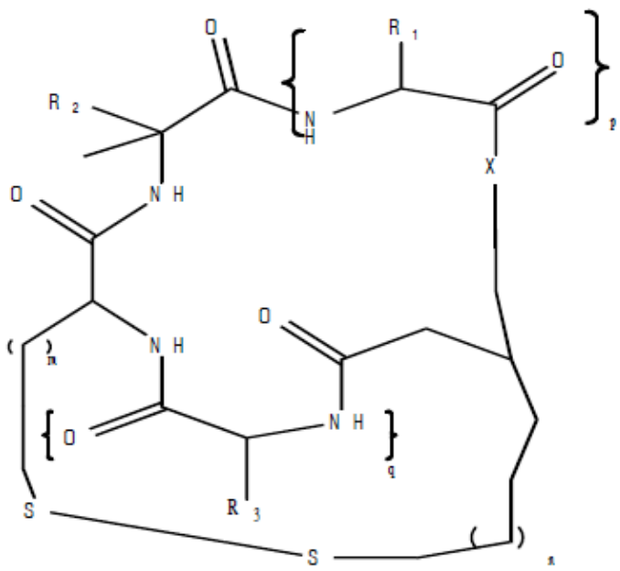
3.73, 3.70, 3.59, 3.47, 3.41, 2.44, 2.35, 2.26, 1.97, 1.81, 1.76, 1.42, 1.37, 1.16, 1.12, 1.04; (iii) ^{13}C NMR con valores de δ 173.92, 166.06, 145.06, 138.76, 135.71, 129.99, 126.20, 123.35, 99.75, 82.20, 78.22, 76.69, 71.23, 70.79, 70.48, 69.84, 60.98, 48.84, 36.89, 33.09, 30.63, 28.55, 25.88, 20.37, 18.11, 14.90, 12.81, 9.41; (iv) un tiempo de retención de Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC) de aproximadamente 7–12 minutos, en una columna de HPLC C–18 de fase inversa usando agua:acetonitrilo (CH_3CN) con un sistema de solvente gradiente y detección UV de 210 nm; (v) una fórmula molecular de $C_{28}H_{45}NO_{10}$ la cual se determina por interpretación del análisis de datos ESIMS y NMR; (vi) UV bandas de absorción entre aproximadamente 210–450 nm;

(D) un compuesto que comprende (i) al menos un éster, al menos una amida, un grupo metileno epóxido, al menos una porción tetrahidropiranosa y al menos tres enlaces dobles olefínicos, al menos seis grupos metilo, al menos tres grupos hidroxilo, al menos 25 carbonos, al menos 8 oxígenos y al menos 1 nitrógeno, (ii) ^{13}C NMR con valores δ de 174.03, 166.12, 143.63, 137.50, 134.39, 128.70, 126.68, 124.41, 98.09, 80.75, 76.84, 75.23, 69.87, 69.08, 68.69, 68.60, 48.83, 41.07, 35.45, 31.67, 29.19, 27.12, 24.55, 19.20, 18.95, 13.48, 11.39, 8.04, (iii) una fórmula molecular de $C_{28}H_{43}NO_9$ y al menos uno de: (i) ^{1}H NMR δ valores a aproximadamente 6.41, 6.40, 6.01, 5.97, 5.67, 5.55, 4.33, 3.77, 3.75, 3.72, 3.64, 3.59, 3.54, 3.52, 2.44, 2.34, 2.25, 1.96, 1.81, 1.76, 1.42, 1.38, 1.17, 1.12, 1.04; (ii) un tiempo de retención de Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC) de aproximadamente 6–15 minutos, en una columna de HPLC C–18 de

fase inversa usando un gradiente de agua:acetonitrilo (CH_3CN); (iii) banda de absorción de UV entre aproximadamente 210-450 nm y muy particularmente a aproximadamente 234 nm.

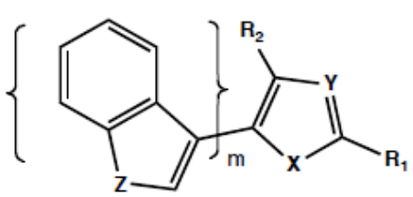
En una modalidad más particular, se proporcionan compuestos que incluyen pero no se limitan a:

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



o una sal pesticídicamente aceptable o estereoisómeros de la misma, en donde M es 1, 2, 3 ó 4; n es 0, 1, 2, ó 3; p y q son independientemente 1 ó 2; X es O, NH o NR; R1, R2 y R3 son los mismos o diferentes e independientemente una porción de cadena lateral de aminoácido o un derivado de cadena lateral de aminoácido y R es una porción de alquilo, arilo o arilalquilo de cadena inferior;

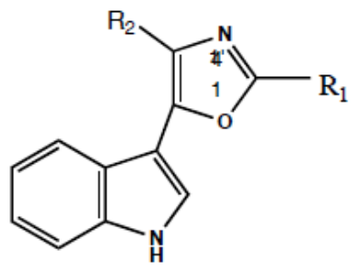
(B) un compuesto que tiene la estructura ##STR002##



##STR002##

en donde X, Y y Z son cada uno independientemente --O, --NR_1, o --S, en donde R_1 es --H o alquilo C_1-C_{10}; R_1, R_2 y m son cada uno independientemente --H, alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterocíclico, heterocíclico sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, tioalquilo, tioalquilo sustituido, hidroxi, halógeno, amino, amido, carboxilo, --C(O)H, acilo, oxiacilo, carbamato, sulfonilo, sulfonamida, o sulfurilo y "m" puede ser localizado en cualquier lugar en el anillo oxazol;

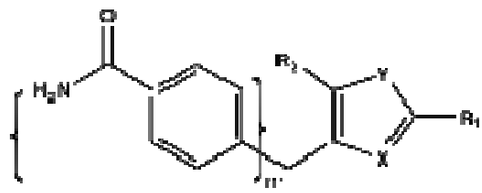
(C) un compuesto que tiene la estructura ##STR002a##



##STR002a##

en donde R_1 es --H o alquilo C_1-C_{10}; R_2 es un alquiléster;

(D) un compuesto que tiene la estructura ##STR003##

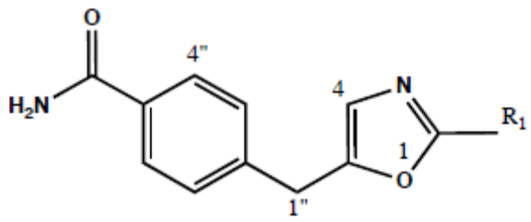


##STR003##

en donde: X y Y son cada uno independientemente --OH, --NR_1, o --S, en donde R_1 es --H o alquilo C_1-C_{10}; R_1, R_2 y m, un sustituyente en el anillo oxazol, son cada uno independientemente --H, alquilo, alquilo sustituido,

alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterocíclico, heterocíclico sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, tioalquilo, tioalquilo sustituido, hidroxi, halógeno, amino, amido, carboxilo, --C(O)H, acilo, oxiacilo, carbamato, sulfonilo, sulfonamida, o sulfurilo.

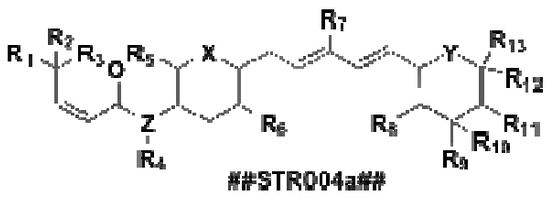
(E) un compuesto que tiene la estructura ##STR003a##



##STR003a##

en donde R_1 es --H o alquilo C_1-C_{10};

(F) un compuesto que tiene la estructura ##STR004a##

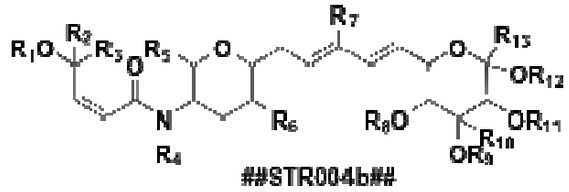


##STR004a##

En donde X, Y y Z son cada uno independientemente -O, -NR, o -S, en donde R es H o alquilo C_1-C_{10}; R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8, R_9, R_{10}, R_{11}, R_{12}, y R_{13} son cada uno independientemente H, alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterocíclico, heterocíclico sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, tioalquilo, tioalquilo sustituido, hidroxi, halógeno, amino, amido, carboxilo, -C(O)H, acilo, oxiacilo, carbamato,

sulfonilo, sulfonamida, o sulfurilo.

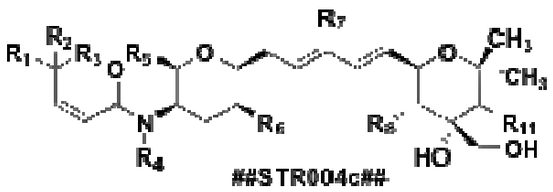
(G) un compuesto que tiene la estructura ##STR004b##



##STR004b##

en donde R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8, R_9, R_{10}, R_{11}, R_{12}, y R_{13} son cada uno independientemente H, alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterocíclico, heterocíclico sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, tioalquilo, tioalquilo sustituido, hidroxi, halógeno, amino, amido, carboxilo, -C(O)H, acilo, oxiacilo, carbamato, sulfonilo, sulfonamida, o sulfurilo;

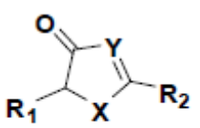
(H) un compuesto que tiene la estructura ##STR004c##



##STR004c##

en donde R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8, R_{11}, son cada uno independientemente H, alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterocíclico, heterocíclico sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, tioalquilo, tioalquilo sustituido, hidroxi, halógeno, amino, amido, carboxilo, -C(O)H, acilo, oxiacilo, carbamato, sulfonilo, sulfonamida, o sulfurilo;

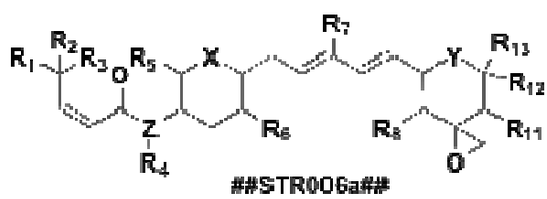
(I) un compuesto que tiene la estructura ##STR005##



##STR005##

en donde X y Y son cada uno independientemente --OH, --NR_1, o --S, en donde R_1, R_2 son cada uno independientemente --H, alquilo (por ejemplo, alquilo C_1-C_{10}), alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterocíclico, heterocíclico sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, tioalquilo, tioalquilo sustituido, hidroxi, halógeno, amino, amido, carboxilo, --C(O)H, acilo, oxiacilo, carbamato, sulfonilo, sulfonamida, o sulfurilo;

(J) un compuesto que tiene la estructura ##STR006a##



##STR006a##

En donde X, Y y Z son cada uno independientemente -O, -NR, o -S, en donde R es H o alquilo C_1-C_{10}; R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8, R_{11}, R_{12}, y R_{13} son cada uno independientemente H, alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterocíclico, heterocíclico sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, tioalquilo, tioalquilo sustituido, hidroxi, halógeno, amino, amido, carboxilo, -C(O)H, acilo, oxiacilo, carbamato, sulfonilo, sulfonamida, o sulfurilo.

En una modalidad muy particular, los compuestos pueden incluir pero no se limitan a

(i) templazol A;

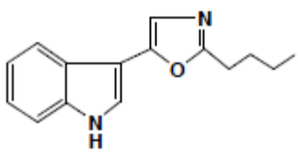
(ii) templazol B;

(iii) templamida A;

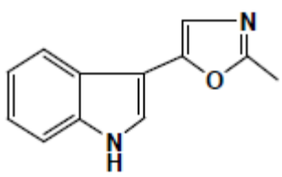
(iv) templamida B;

(v) FR90128;

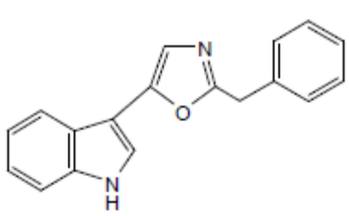
(vi)



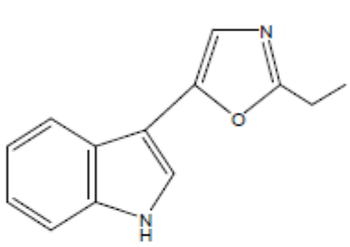
(vii)



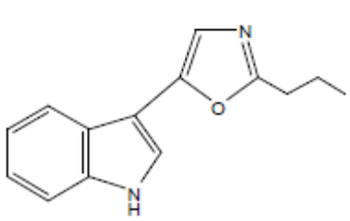
(viii)



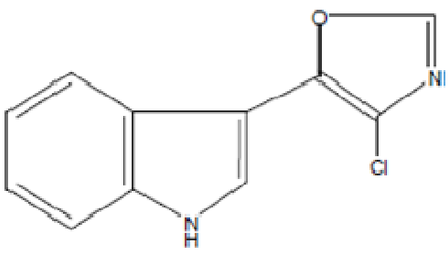
(ix)



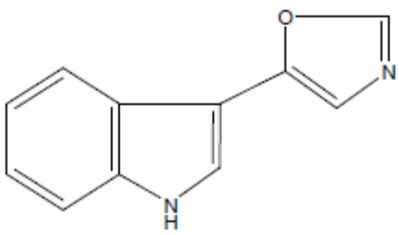
(x)



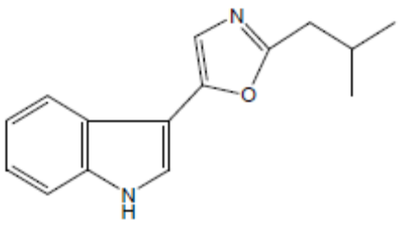
(xi)



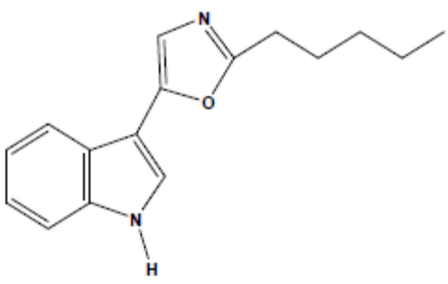
(xii)



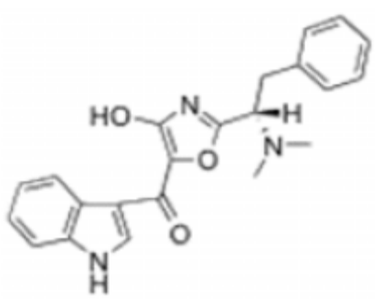
(xiii)



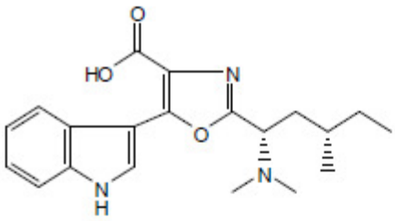
(xiv)



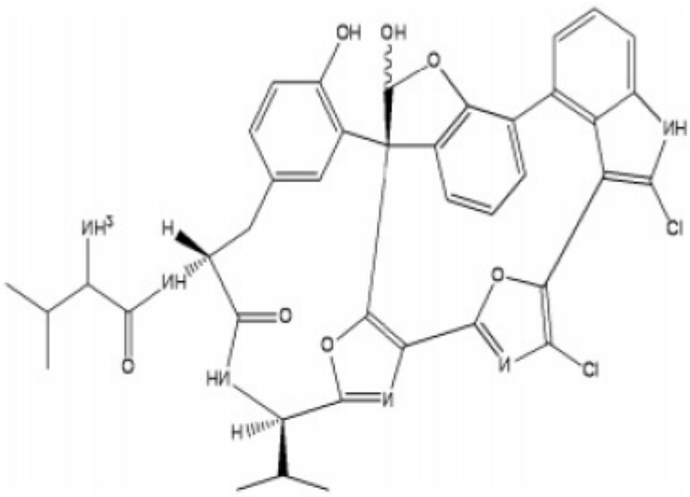
(xv)



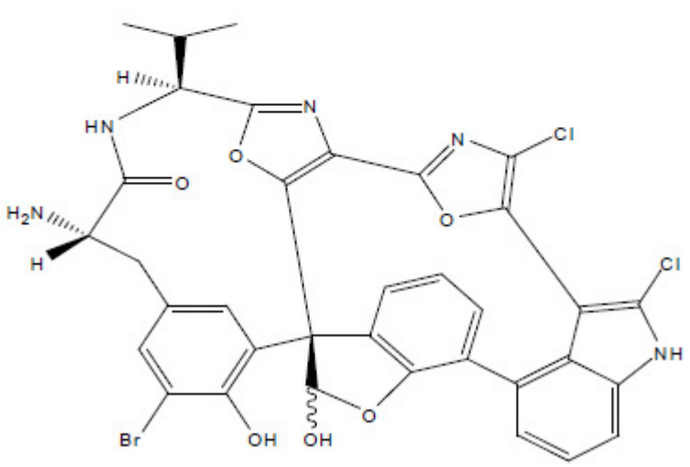
(xvi)



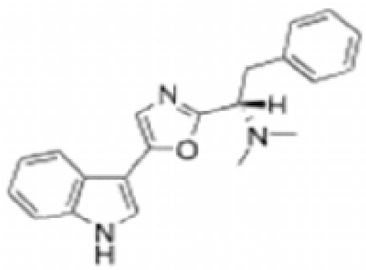
(xvii)



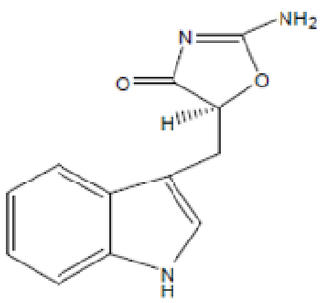
(xviii)



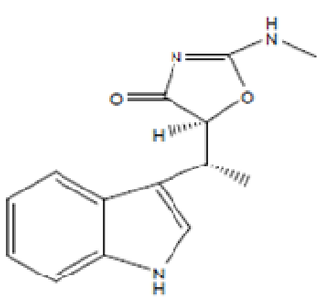
(xix)



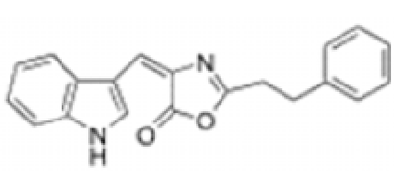
(xx)



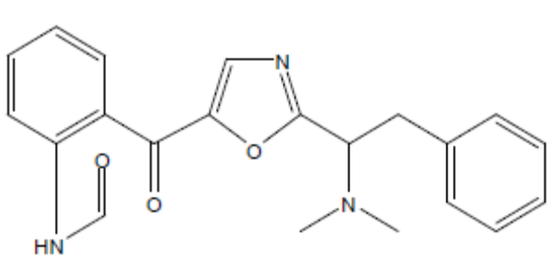
(xxi)

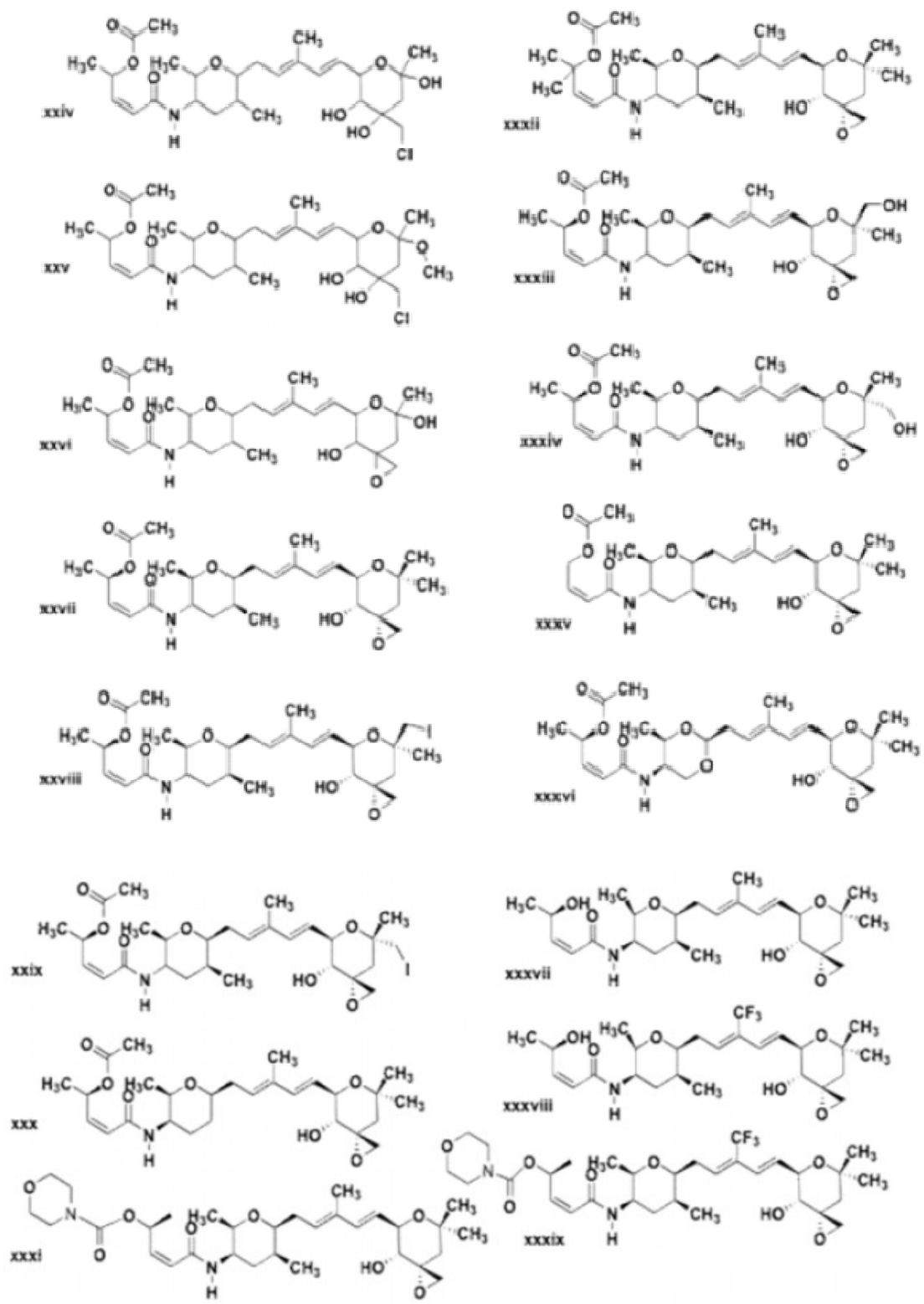


(xxii)



(xxiii)





(XL) FR901465

También se proporcionan métodos para obtener los compuestos expuestos anteriormente. En particular, el método comprende cultivar la cepa de *Burkholderia* descrita en la

presente y producir el compuesto. Además se proporciona un método para aislar estos compuestos aislando el(los) compuesto(s) producido(s) por la cepa de *Burkholderia* que comprende aislar compuestos producidos a partir de un sobrenadante de un cultivo de la cepa de *Burkholderia*.

Además se proporciona una combinación que comprende (a) una primera sustancia seleccionada a partir del grupo que consiste de (i) un cultivo puro, fracción celular o sobrenadante derivado de la cepa de *Burkholderia* expuesta anteriormente o extracto de la misma para uso opcionalmente como un pesticida; (ii) uno o más de los compuestos expuestos anteriormente (b) opcionalmente una segunda sustancia, en donde la segunda sustancia es un pesticida químico o biológico y (c) opcionalmente al menos uno de un portador, diluyente, tensoactivo, adyuvante o pesticida. En una modalidad particular, la combinación es una composición. En un aspecto relacionado, proporcionada en la presente está una semilla recubierta con la composición.

En un aspecto relacionado, descrito está un método para modular la infestación de plagas en una planta que comprende aplicar a la planta y/o semillas de la misma y/o sustrato usado para hacer crecer la planta y/o un método para modular la emergencia y/o crecimiento de monocotiledóneas, malezas de dicotiledóneas o juncias que comprende aplicar a la maleza o suelo una cantidad de

(I) (a) los compuestos aislados expuestos anteriormente y (b) opcionalmente otra sustancia, en donde la sustancia es un pesticida (por ejemplo, nematicida, herbicida, fungicida, insecticida) o

(II) la composición o combinación expuestos

anteriormente

en una cantidad efectiva para modular infestación de plagas y/o emergencia o crecimiento de monocotiledóneas, malezas de dicotiledóneas o juncias.

En oro aspecto relacionado, se proporciona el uso de las cepas, cultivos, extractos, sobrenadantes, combinaciones, compuestos expuestos anteriormente para modular infestaciones de plagas en una planta que comprende aplicar a la planta y/o semillas de la mismo y/o sustrato usado para hacer crecer la planta y/o un método para modular la emergencia y/o crecimiento de crecimiento de monocotiledóneas, malezas de dicotiledóneas o juncias.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1 muestra la comparación de la velocidad de crecimiento de *Burkholderia* A396 *a Burkholderia multivorans* ATCC 17616.

La Figura 2 muestra el efecto del extracto de *Burkholderia* A396 en enredadera.

La Figura 3 muestra el efecto del extracto de *Burkholderia* A396 en bledo.

La Figura 4 muestra el efecto del extracto de *Burkholderia* A396 en Falso medidor de la col (*Tricoplusia ni*).

La Figura 5 muestra el efecto del caldo de cultivo de *Burkholderia* A396 en Gusano soldado de la remolacha (*Spodoptera exigua*).

La Figura 6 muestra el efecto del caldo de cultivo de *Burkholderia* A396 en la motilidad de nemátodos juveniles del nódulo de la raíz (*Meloidogyne incognita*).

La Figura 7 es una representación esquemática del esquema de purificación para obtener los compuestos templazol y templamida.

La Figura 8 muestra resultados de un ensayo *in vitro* para probar el efecto fungicida de FR90128 en *Botrytis cinerea* (izquierda) y *Phytophtora* sp. (derecha).

La Figura 9 muestra el efecto del caldo de cultivo de *Burkholderia* A396 en el índice de vesícula promedio (% de control) de raíces de pepino contra Toschka inoculadas con 3000 huevos de *Meloidogyne sp.* 14 días después de la inoculación y aplicación.

La Figura 10 Efecto del caldo de cultivo de *Burkholderia* A396 en el índice de vesícula promedio de raíces de pepino contra Toschka inoculadas con 3000 huevos de *Meloidogyne sp.* 14 días después de la inoculación y aplicación.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

Mientras las composiciones y métodos hasta ahora son susceptibles a varias modificaciones y formas alternativas, modalidades ejemplares serán aquí descritas en detalle. Se debe entender, sin embargo, que no se pretende limitar la invención a las formas particulares descritas, sino por el contrario, la invención es para cubrir todas las modificaciones, equivalentes y alternativas que caen dentro del espíritu y alcance de la invención como se define por las reivindicaciones adjuntas.

En donde se proporciona un intervalo de valores, se entiende que cada valor de intervención, a la décima parte de la unidad del límite inferior a menos que el contexto claramente lo dicte de otro modo, entre el límite superior e inferior de tal

intervalo y cualquier otro valor de intervención o declarado en tal intervalo declarado, está incluido aquí. Intervalos más pequeños están también incluidos. Los límites superior e inferior de estos intervalos más pequeños también están incluidos aquí, sometidos a cualquier límite específicamente excluido en el intervalo declarado.

A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y específicos usados aquí tienen el mismo significado como se entiende comúnmente por uno de habilidad ordinaria en la técnica a la cual pertenece esta invención. Aunque cualquiera de los métodos y materiales similares o equivalentes a aquellos descritos en la presente también pueden ser usados en la práctica o prueba de la presente invención, los métodos y materiales preferidos son ahora descritos.

Se debe notar que como se usa en la presente y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares “un”, “y” y “el”, incluyen referencias plurales al menos que el contexto claramente lo dicte de otro modo.

Como se define en la presente, “derivado de” significa directamente aislado u obtenido de una fuente particular o alternativamente que tienen características de identificación de una sustancia u organismo aislado u obtenido de una fuente particular.

Como se define en la presente, un “compuesto aislado” está esencialmente libre de otros compuestos o sustancias, por ejemplo, al menos aproximadamente 20% puro, preferiblemente al menos aproximadamente 40% puro, más preferiblemente aproximadamente 60% puro, aún más preferiblemente aproximadamente 80% puro, muy preferiblemente aproximadamente 90% puro, y aún muy

preferiblemente aproximadamente 95% puro, como se determina por métodos analíticos, que incluyen pero no se limitan a métodos cromáticos, métodos electroforéticos.

Como se usa en la presente, el término “alquilo” se refiere a un grupo hidrocarburo de cadena recta o ramificada monovalente que tienen de uno hasta aproximadamente 12 átomos de carbono, que incluyen metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, terc-butilo, n-hexilo, y similares.

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

Como se usa en la presente, “alquenilo” se refiere a grupos hidrocarbilo de cadena recta o ramificada que tienen uno o más enlaces doble carbono-carbono, y que tienen en el intervalo de aproximadamente 2 hasta 12 átomos de carbono, y “alquenilo sustituido” se refiere a grupos alquenilo que además portan uno o más sustituyentes como se exponen anteriormente.

Como se usa en la presente, “alquinilo” se refiere a grupos hidrocarbilo de cadena recta o ramificada que tienen al menos un triple enlace carbono-carbono, y que tienen en el intervalo de aproximadamente 2 hasta 12 átomos de carbono, y “alquinilo sustituido” se refiere a grupos alquinilo que además portan uno o más sustituyentes como se exponen anteriormente.

Como se usa en la presente, “arilo” se refiere a grupos

aromáticos que tienen en el intervalo de 6 hasta 14 átomos de carbono y “arilo sustituido” se refiere a grupos arilo que además portan uno o más sustituyentes como se exponen anteriormente.

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

Como se usa en la presente, “alcoxi” se refiere a la porción --O-alquilo-, en donde alquilo es como se define anteriormente, y “alcoxi sustituido” se refiere a grupos alcoxi que además portan uno o más sustituyentes como se exponen anteriormente.

Como se usa en la presente, “tioalquilo” se refiere a la porción --S-alquilo-, en donde alquilo es como se define anteriormente, y “tioalquilo sustituido” se refiere a grupos tioalquilo que además portan uno o más sustituyentes como se exponen anteriormente.

Como se usa en la presente, “cicloalquilo” se refiere un anillo que contiene grupos alquilo que contienen en el intervalo de aproximadamente 3 hasta 8 átomos de carbono, y “cicloalquilo sustituido” se refiere a grupos cicloalquilo que además portan uno o más sustituyentes como se exponen anteriormente.

Como se usa en la presente, “heterocíclico”, se refiere a grupos cíclicos (es decir, que contienen anillos) que contienen uno o más heteroátomos (por ejemplo, N, O, S, o similares) como parte de la estructura del anillo, y que tienen en el intervalo

de 3 hasta 14 átomos de carbono y “heterocíclico sustituido” se refiere a grupos heterocíclico que además portan uno o más sustituyentes como se exponen anteriormente.

La cepa de *Burkholderia*

La cepa de *Burkholderia* expuesta en la presente es un complejo no *Burkholderia cepacia,* no *Burkholderia plantari,* no *Burkholderia gladioli*, *Burkholderia sp* y no patogénica a vertebrados, tales como aves, mamíferos y peces. Esta cepa puede ser aislada de una muestra de suelo usando procedimientos conocidos en la técnica y descritos por Lorch et al., 1995. La cepa de *Burkholderia* puede ser aislada de diferentes tipos de medios de crecimiento o suelo. La muestra es entonces plaqueada sobre agar de dextrosa de papa (PDA). Las bacterias son gram negativas, y forman redondas coloreadas de crema opacas, redondas, que cambian a rosa y rosado marrón en color y mucoide o babosas con el tiempo.

Las colonias son aisladas de las placas de agar de dextrosa de papa y seleccionadas por aquellas que tienen características biológicas, genéticas, bioquímicas y/o enzimáticas de la cepa de *Burkholderia* de la presente invención expuestas en los Ejemplos siguientes. En particular, la cepa de *Burkholderia* tiene un gen 16S ARNr que comprende una secuencia delantera que es al menos aproximadamente 99.0%, preferiblemente aproximadamente 99.5%, más preferiblemente aproximadamente 99.9% y muy preferiblemente aproximadamente 100% idéntica a las secuencias expuestas en la SEC ID NO: 8, 11 y 12 y una secuencia delantera que es al menos aproximadamente 99.0, preferiblemente aproximadamente 99.5%, más preferiblemente aproximadamente 99.9% y muy preferiblemente aproximadamente 100% idéntica a las secuencias expuestas en la SEC ID NO: 9, 10, 13, 14 y 15 como se determina por análi-

sis grupal. Además, como se expone abajo, esta cepa de *Burkholderia* puede, como se expone abajo, tener actividad pesticida, particularmente, virucida, herbicida, germicida, fungicida, nematicida, bactericida e insecticida y más particularmente, actividad herbicida, insecticida, fungicida y nematicida. No es patogénica a animales vertebrados, tales como mamíferos, aves y peces.

Adicionalmente, la cepa de *Burkholderia* produce al menos los compuestos pesticidas expuestos en la presente descripción.

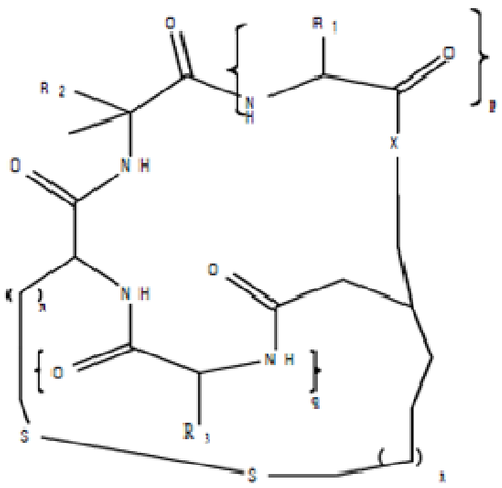
La cepa de *Burkholderia* es susceptible a canamicina, cloranfenicol, ciprofloxacina, piperacilina, imipenem, y una combinación de sulfametoxazol y trimetoprim y contiene los ácidos grasos 16:0, ciclo 17:0, 16:0 3- OH, 14:0, ciclo 19:0, 18:0.

Esta cepa de *Burkholderia* se puede obtener cultivando un microorganismo que tiene las características de identificación of *Burkholderia* A396 (NRRL Acceso No. B-50319) en Agar de Dextrosa de Papa (PDA) o en un medio de fermentación que contiene fuentes de carbono definidas tales como glucosa, maltosa, fructuosa, galactosa, y fuentes de nitrógeno no definidas tales como peptona, triptona, soytona y amina NZ.

Compuestos Pesticidas

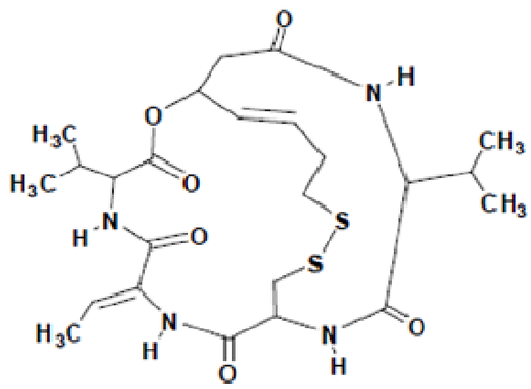
El compuesto pesticida descrito en la presente puede tener las siguientes propiedades: (a) es obtenible de una nueva especie de *Burkholderia*, p.ej., A396; (b) es, en particular, tóxico a plagas de insectos agrícolas muy comunes; (c) tiene un peso molecular de aproximadamente 525-555 y más particularmente, 540 como se determina por Cromatografía Líquida/Espectroscopia de Masas (LC/MS); (d) tiene ^{1}H NMR con valores de 6.22, 5.81, 5.69, 5.66, 5.65, 4.64, 4.31, 3.93, 3.22, 3.21, 3.15, 3.10, 2.69, 2.62,

2.26, 2.23. 1.74, 1.15, 1.12, 1.05, 1.02; (d) tiene ^{13}C NMR con valores de 172.99, 172.93, 169.57, 169.23, 167.59, 130.74, 130.12, 129.93, 128.32, 73.49, 62.95, 59.42, 57.73, 38.39, 38.00, 35.49, 30.90, 30.36, 29.26, 18.59, 18.38, 18.09, 17.93, 12.51 (e) tiene un tiempo de retención de Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC) de aproximadamente 10–15 minutos, más específicamente aproximadamente 12 minutos y aún más específicamente aproximadamente 12.14 min en una columna de HPLC C–18 de fase inversa (Phenomenex, Luna 5µ C18 (2) 100A, 100 x 4.60 mm) usando agua:acetonitrilo (CH_3CN) con un sistema de solvente gradiente (0–20 min 90–0% CH_3CN acuoso, 20–24 min 100% CH_3CN, 24–27 min, 0–90% CH_3CN acuoso, 27–30 min 90% CH_3CN acuoso) a velocidad de flujo de 0.5 mL/min y detección UV de 210 nm (f) tiene una fórmula molecular, $C_{24}H_{36}N_4O_6S_2$, la cual es determinada por interpretación de datos ^1H, ^{13}C NMR y LC/MS (g) un espectro ^{13}C NMR con señales para los 24 carbonos, que incluyen 5 metilo, 4 metileno, 9 metina, y 6 carbonos cuaternarios y (g) espectro de ^1H NMR que despliega características de un depsipéptido típico, que ilustra tres protones amino [4.63, 4.31, 3.93], y un protón éster carbinol [5.69]. En una modalidad particular, el compuesto tiene la estructura ##STR001##:

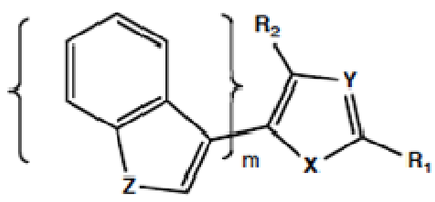


o una sal pesticídicamente aceptable o estereoisómeros de la misma, en donde M es 1, 2, 3 ó 4; n es 0, 1, 2, ó 3; p y q son independientemente 1 ó 2; X es O, NH o NR; R1, R2 y R3 son los mismos o diferentes e independientemente una porción de cadena lateral de aminoácido o un derivado de cadena lateral de aminoácido y R es una porción de alquilo, arilo o arilalquilo de cadena inferior.

En una modalidad aún más particular, el compuesto tiene la estructura de FR90128:



Proporcionada con esta están compuestos expuestos en ##STR002##:

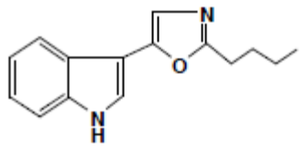


##STR002##

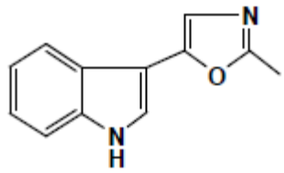
en donde: X, Y y Z son cada uno independientemente --O, --NR_1, o --S, en donde R_1 es --H o alquilo C_1–C_{10}; R_1, R_2 y m son cada uno independientemente --H, alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterocíclico, heterocíclico sustituido, cicloalquilo,

cicloalquilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, tioalquilo, tioalquilo sustituido, hidroxi, halógeno, amino, amido, carboxilo, --C(O)H, acilo, oxiacilo, carbamato, sulfonilo, sulfonamida, o sulfurilo.

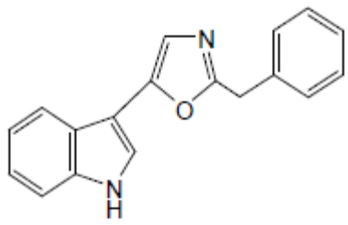
En aún otra modalidad particular, Los compuestos de la Familia ##STR002## pueden ser los compuestos expuestos en (vi)-(xix).



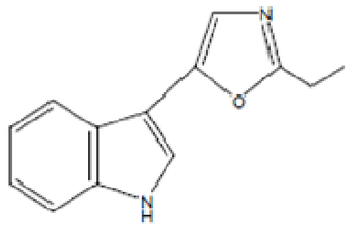
(vii)



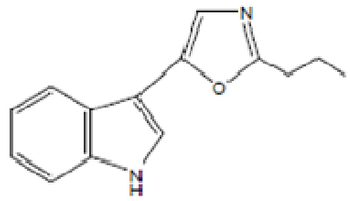
(viii)



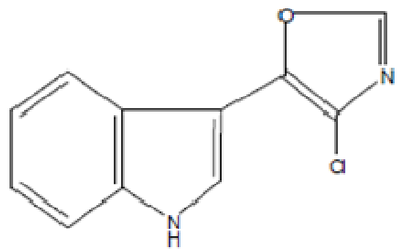
(ix)



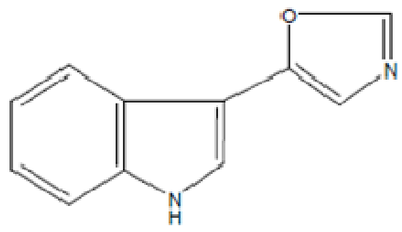
(x)



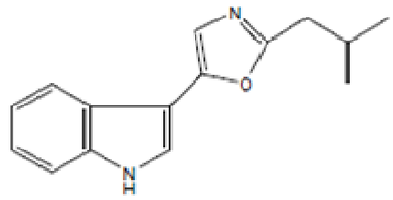
(xi)



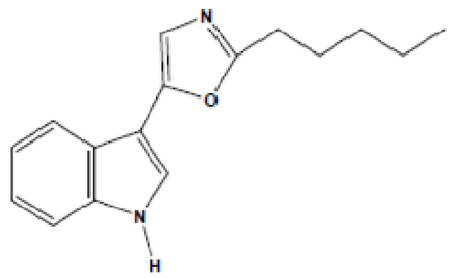
(xii)



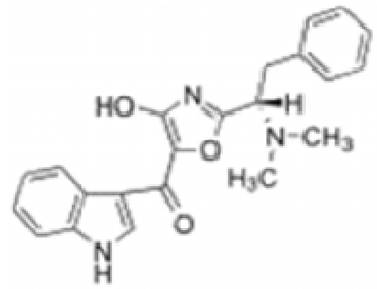
(xiii)



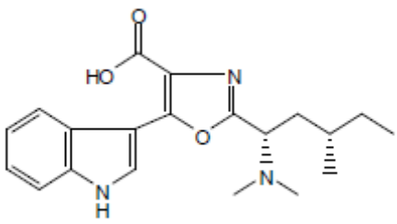
(xiv)



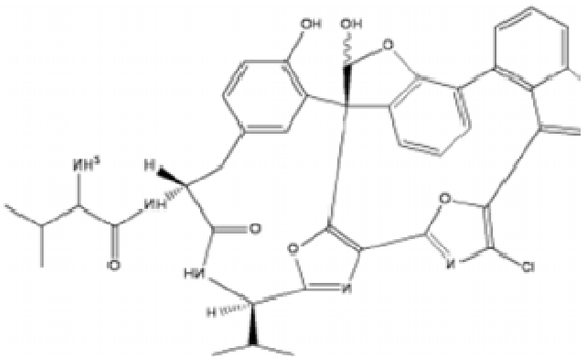
(xv)



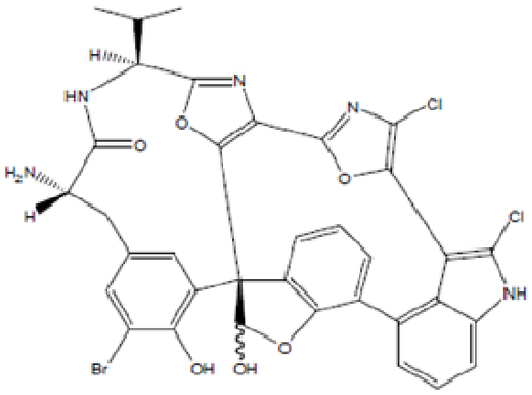
(xvi)



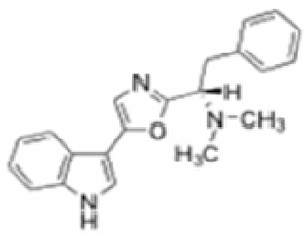
(xvii)



(xviii)



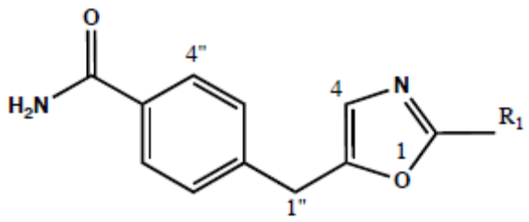
(xix)



Estos son de ya sea materiales o compuestos naturales obtenidos de fuentes comerciales o por síntesis química. Las fuentes naturales de los compuestos de la Familia ##STR002## incluyen, pero no se limitan a, microorganismos, algas y esponjas. En una modalidad más particular, microorganismos los cuales incluyen los compuestos de la Familia ##STR002## incluyen pero no se limitan a, o alternativamente, los compuestos de la Familia ##STR002## se pueden derivar de especies tales como *Streptoverticillium waksmanii* (compuesto vi) (Umehara, et al., 1984), *Streptomyces pimprina* (compuesto vii) (Naiket al., 2001),

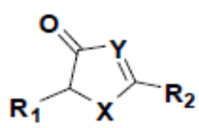
Streptoverticillium olivoreticuli (compuestos viii, ix, x) (Koyama Y., et al., 1981), *Streptomyces* sp (compuestos xi, xii) (Watabe et al., 1988), *Pseudomonas syringae* (compuestos xiii, xiv) (Pettit et al., 2002). Los compuestos de la Familia ##STR002## se pueden derivar de algas que incluyen pero no se limitan a algas rojas (compuesto xv) (N'Diaye, et al., 1996), algas rojas *Martensia fragilis* (compuesto xvi) (Takahashi S. et al., 1998), *Diazona chinensis* (compuestos xvii & xviii) (Lindquist N. et al., 1991), *Rhodophycota haraldiophyllum* sp (compuesto xix) (Guella et al., 1994).

También se proporciona ##STR003##:



en donde: X y Y son cada uno independientemente --OH, --NR_1, o --S, en donde R_1 es --H o alquilo C_1–C_{10}; R_1, R_2 y m, un sustituyente en el anillo oxazol, son cada uno independientemente --H, alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterocíclico, heterocíclico sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, tioalquilo, tioalquilo sustituido, hidroxi, halógeno, amino, amido, carboxilo, --C(O)H, acilo, oxiacilo, carbamato, sulfonilo, sulfonamida, o sulfurilo.

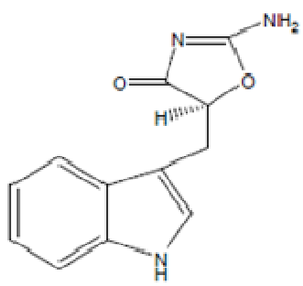
Además se proporciona ##STR005##:



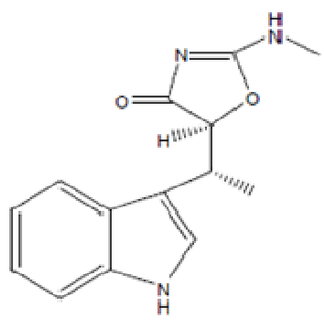
en donde X y Y son cada uno independientemente --OH, --NR_1, o --S, en donde R_1, R_2 son cada uno independientemente --H, alquilo (por ejemplo, alquilo C_1-C_{10}), alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterocíclico, heterocíclico sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, tioalquilo, tioalquilo sustituido, hidroxi, halógeno, amino, amido, carboxilo, --C(O)H, acilo, oxiacilo, carbamato, sulfonilo, sulfonamida, o sulfurilo.

En una modalidad particular, compuestos de la Familia ##STR005## tales como compuestos de xx-xxiii expuestos abajo se pueden derivar de fuentes naturales o comerciales o por síntesis química.

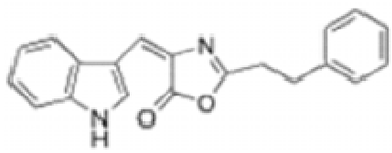
(xx)



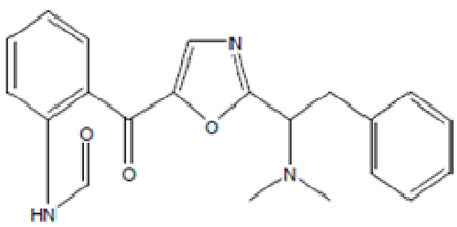
(xxi)



(xxii)



(xxiii)



Fuentes naturales de compuestos de la Familia ##STR005## incluyen, pero no se limitan a plantas, corales, microorganismos, y esponjas. Los microorganismos incluyen, pero no se limitan a *Streptomyces griseus* (compuesto xx) (Hirota et al., 1978), *Streptomyces albus* (compuesto xxi) (Werner et al., 1980). Los compuestos de la Familia STR004 se pueden derivar de algas que incluyen pero no se limitan a *Haraldiophyllum sp* (compuesto xxii (Guella et al., 2006), y algas rojas (compuesto xxiii) (N'Diaye et al., 1994).

En una modalidad, el compuesto se puede derivar de o es obtenible de un microorganismo, y en particular de especies de *Burkholderia* y caracterizar porque tiene una estructura que comprende al menos un éster, al menos una amida, al menos tres grupos metileno, al menos una porción tetrahidropiranosa y al menos tres enlaces dobles olefínicos, al menos seis grupos metilo, al menos tres grupos hidroxilo, al menos veinticinco carbonos y al menos ocho oxígenos y un nitrógeno. El compuesto además comprende al menos una de las siguientes características:

(a) propiedades pesticidas y en particular, propiedades nematicida, fungicida, insecticida y herbicida;

(b) un peso molecular de aproximadamente 530-580 y más

particularmente, 555 como se determina por Cromatografía Líquida/Espectroscopia de Masas (LC/MS);

(c) ^{1}H NMR con valores de δ 6.40, 6.39, 6.00, 5.97, 5.67, 5.54, 4.33, 3.77, 3.73, 3.70, 3.59, 3.47, 3.41, 2.44, 2.35, 2.26, 1.97, 1.81, 1.76, 1.42, 1.37, 1.16, 1.12, 1.04;

(d) ^{13}C NMR con valores de δ 173.92, 166.06, 145.06, 138.76, 135.71, 129.99, 126.20, 123.35, 99.75, 82.20, 78.22, 76.69, 71.23, 70.79, 70.48, 69.84, 60.98, 48.84, 36.89, 33.09, 30.63, 28.55, 25.88, 20.37, 18.11, 14.90, 12.81, 9.41;

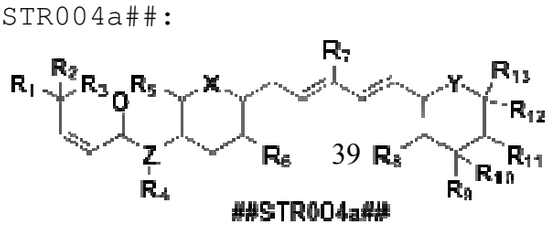
(e) un tiempo de retención de Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC) de aproximadamente 7–12 minutos, más específicamente aproximadamente 10 minutos y aún más específicamente aproximadamente 10.98 min en una columna de HPLC C–18 de fase inversa (Phenomenex, Luna 5µ C18(2) 100 A, 100 x 4.60 mm) usando agua:acetonitrilo (CH_3CN) con un sistema de solvente gradiente (0–20 min; 90–0% CH_3CN acuoso, 20–24 min; 100% CH_3CN, 24–27 min; 0–90% CH_3CN acuoso, 27–30 min; 90% CH_3CN acuoso) a velocidad de flujo de 0.5 mL/min y detección UV de 210 nm;

(f) espectro ^{13}C NMR el cual exhibe 28 señales de carbono discretas las cuales pueden ser atribuidas a seis metilos, cuatro carbonos metileno, y trece metinas que incluyen cinco sp^2, cuatro carbonos cuaternarios;

(g) una fórmula molecular de $C_{28}H_{45}NO_{10}$ la cual se determina por interpretación del análisis de datos ESIMS y NMR;

(h) bandas de absorción UV entre aproximadamente 210–450 nm y muy particularmente a aproximadamente 234 nm.

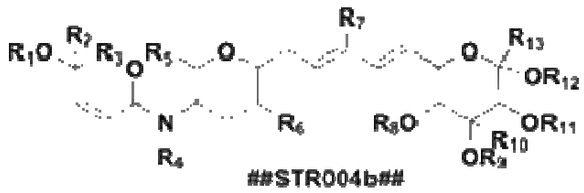
También se proporcionan compuestos que tienen la estructura ##STR004a##:



##STR004a##

En donde X, Y y Z son cada uno independientemente –O, –NR, o –S, en donde R es H o alquilo C_1–C_{10}; R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8, R_9, R_{10}, R_{11}, R_{12}, y R_{13} son cada uno independientemente H, alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterocíclico, heterocíclico sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, tioalquilo, tioalquilo sustituido, hidroxi, halógeno, amino, amido, carboxilo, –C(O)H, acilo, oxiacilo, carbamato, sulfonilo, sulfonamida, o sulfurilo.

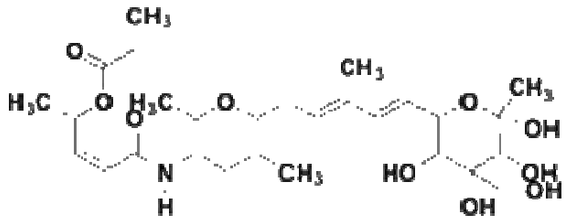
En una modalidad particular, el compuesto tiene la estructura expuesta en ##STR004b##:



##STR004b##

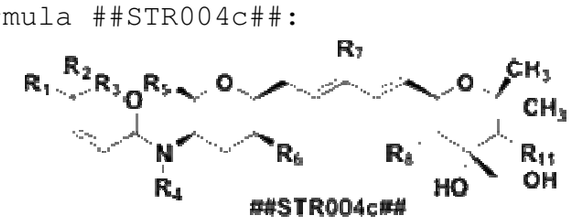
en donde R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8, R_9, R_{10}, R_{11}, R_{12}, y R_{13} son como se definen previamente para ##STR004a##.

En una modalidad más particular, el compuesto es Templamida A con la siguiente estructura:



Templamida A

En otra modalidad, se proporciona un compuesto que tiene formula ##STR004c##:



##STR004c##

En donde R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8, y R_{11} son como se definen previamente para ##STR004a##.

En otra modalidad, se proporciona un compuesto el cual se puede derivar de especies de *Burkholderia* y caracterizar porque tiene una estructura que comprende al menos un éster, al menos una amida, un grupo metileno epóxido, al menos una porción tetrahidropiranosa y al menos tres enlaces dobles olefínicos, al menos seis grupos metilo, al menos tres grupos hidroxilo, al menos 25 carbonos y al menos 8 oxígenos y 1 nitrógeno, y actividad pesticida. El compuesto además comprende al menos una de las siguientes características:

(a) propiedades pesticidas y en particular, propiedades insecticida, fungicida, nematocida y herbicida;

(b) un peso molecular de aproximadamente 520-560 y particularmente 537 como se determina por Cromatografía Líquida/Espectroscopia de Masas (LC/MS);

(c) ^{1}H NMR δ valores a aproximadamente 6.41, 6.40, 6.01, 5.97, 5.67, 5.55, 4.33, 3.77, 3.75, 3.72, 3.64, 3.59, 3.54, 3.52, 2.44, 2.34, 2.25, 1.96, 1.81, 1.76, 1.42, 1.38, 1.17, 1.12, 1.04;

(d) ^{13}C NMR con valores de δ 174.03, 166.12, 143.63, 137.50, 134.39, 128.70, 126.68, 124.41, 98.09, 80.75, 76.84, 75.23, 69.87, 69.08, 68.69, 68.60, 48.83, 41.07, 35.45, 31.67, 29.19, 27.12, 24.55, 19.20, 18.95, 13.48, 11.39, 8.04;

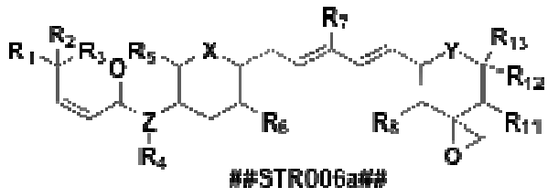
(e) Tiempo de retención de Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC) de aproximadamente 6-15 minutos, más específicamente aproximadamente 8 minutos en una columna de HPLC C-18 de fase inversa usando un gradiente de agua:acetonitrilo (CH3CN), particularmente, un tiempo de retención de Cromatografía

Líquida de Alta Presión (HPLC) de aproximadamente 8–15 minutos, más específicamente aproximadamente 11 minutos y aún más específicamente aproximadamente 11.73 min en una columna de HPLC C–18 de fase inversa (Phenomenex, Luna 5µ C18(2) 100 A, 100 x 4.60 mm) usando agua:acetonitrilo (CH_3CN) con un sistema de solvente gradiente (0–20 min; 90–0 % CH_3CN acuoso, 20–24 min; 100% CH_3CN, 24–27 min; 0–90 % CH_3CN acuoso, 27–30 min; 90 % CH_3CN acuoso) a velocidad de flujo de 0.5 mL/min y detección UV de 210 nm;

(f) una fórmula molecular de $C_{28}H_{43}NO_9$ la cual se determina por interpretación del análisis de datos ESIMS y NMR;

(g) banda de absorción de UV a aproximadamente 210–450 nm y muy particularmente a aproximadamente 234 nm.

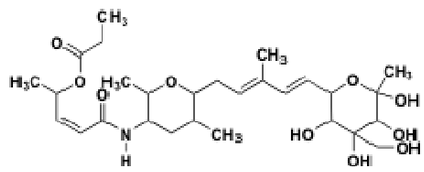
En una modalidad particular, el compuesto tiene la estructura ##STR006a##:



##STR006a##

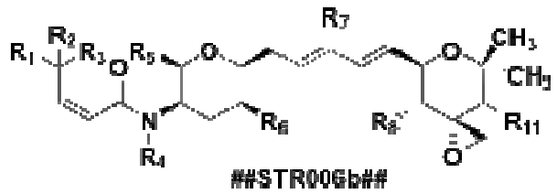
En donde X, Y y Z son cada uno independientemente –O, –NR, o –S, en donde R es H o alquilo C_1–C_{10}; R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8, R_{11}, R_{12}, y R_{13} son cada uno independientemente H, alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterocíclico, heterocíclico sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, tioalquilo, tioalquilo sustituido, hidroxi, halógeno, amino, amido, carboxilo, –C(O)H, acilo, oxiacilo, carbamato, sulfonilo, sulfonamida, o sulfurilo.

En una modalidad particular, el compuesto tiene la estructura:



Templamida A

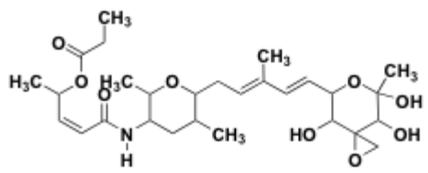
En otra modalidad, se proporciona un compuesto que tiene formula ##STR006b##:



##STR006b##

En donde R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8, y R_{11} son como se definen previamente para ##STR006a##.

En una modalidad más particular, el compuesto es Templamida B con la siguiente estructura:



Templamida B

En todavía otra modalidad particular, el compuesto se pueden derivar de especies de *Burkholderia* y caracterizar porque tiene una estructura que comprende al menos un éster, al menos una amida, un grupo metileno epóxido, al menos una porción tetrahidropiranosa y al menos tres enlaces dobles olefínicos, al menos seis grupos metilo, al menos tres grupos hidroxilo, al menos 25 carbonos y al menos 8 oxígenos y al menos 1 nitrógeno. El compuesto además comprende al menos una de las siguientes características:

(a) propiedades pesticidas y en particular, propiedades insecticida, fungicida, nematicida y herbicida;

(b) un peso molecular de aproximadamente 510–550 y particularmente aproximadamente 523 como se determina por Cromatografía Líquida/Espectroscopia de Masas (LC/MS);

(c) ^{1}H NMR valores δ a aproximadamente 6.41, 6.40, 6.01, 5.98, 5.68, 5.56, 4.33, 3.77, 3.75, 3.72, 3.65, 3.59, 3.55, 3.50, 2.44, 2.26, 2.04, 1.96, 1.81, 1.75, 1.37, 1.17, 1.04;

(d) ^{13}C NMR con valores δ de 172.22, 167.55, 144.98, 138.94, 135.84, 130.14, 125.85, 123.37, 99.54, 82.19, 78.28, 76.69, 71.31, 70.13, 69.68, 48.83, 42.52, 36.89, 33.11, 30.63, 25.99, 21.20, 20.38, 18.14, 14.93, 12.84;

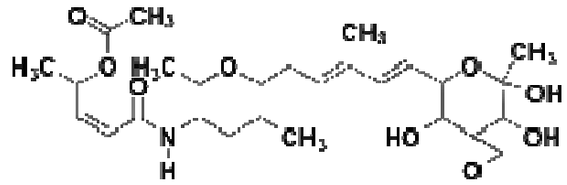
(e) un tiempo de retención de Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC) de aproximadamente 6–15 minutos, más específicamente aproximadamente 8 minutos en una columna de HPLC C–18 de fase inversa usando un gradiente de agua:acetonitrilo (CH_3CN), particularmente, un tiempo de retención de Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC) de aproximadamente 8–15 minutos, más específicamente aproximadamente 10 minutos y aún más específicamente aproximadamente 10.98 min en una columna de HPLC C–18 de fase inversa (Phenomenex, Luna 5µ C18(2) 100 A, 100 x 4.60 mm) usando agua:acetonitrilo (CH_3CN) con un sistema de solvente gradiente (0–20 min; 90–0% CH_3CN acuoso, 20–24 min; 100% CH_3CN, 24–27 min; 0–90% CH_3CN acuoso, 27–30 min; 90% CH_3CN acuoso) a velocidad de flujo de 0.5 mL/min y detección UV de 210 nm;

(f) una fórmula molecular de $C_{27}H_{41}NO_9$ la cual se determina por interpretación del análisis de datos ESIMS y NMR;

(g) banda de absorción de UV a aproximadamente 210–450 nm y muy

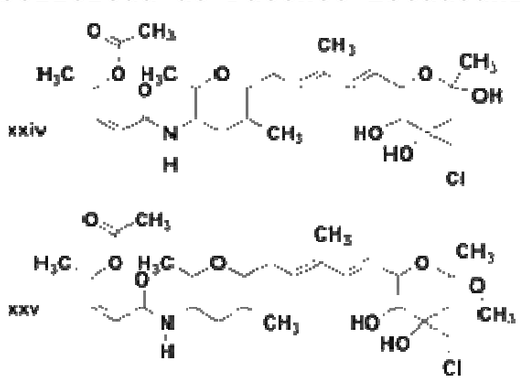
particularmente a aproximadamente 234 nm.

En una modalidad más particular, el compuesto es un compuesto conocido FR901465 el cual se aisló anteriormente del caldo de cultivo de una bacteria de *Pseudomonas* sp. No. 2663 (Nakajima et al. 1996) y se ha reportado por tener actividad anticancerígena con la siguiente estructura:

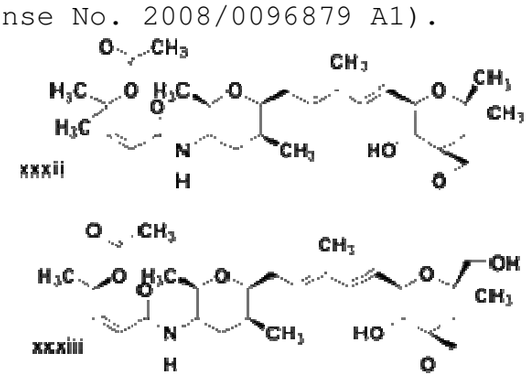


FR901465

En aún otra modalidad particular, compuestos de la Familia ##STR006a## pueden ser los compuestos expuestos en xxiv a xxxix. Son de ya sea materiales naturales o compuestos obtenidos de fuentes comerciales o por síntesis química. Fuentes naturales de compuestos de la Familia ##STR006a## incluyen, pero no se limitan a, microorganismos, algas y esponjas. En una modalidad más particular, microorganismos los cuales incluyen los compuestos de la Familia ##STR006a## los cuales se pueden derivar de especies tales como *Pseudomonas* sp. No. 2663 (compuestos xxiv-xxvi) (Nakajima et al., 1996). Los análogos sintéticos de FR901464 (xxvii-xxxix) los cuales han sido sintetizados y patentados como compuestos anticancerígenos (véase Koide et al., Solicitud de Patente Estadounidense No. 2008/0096879 A1).



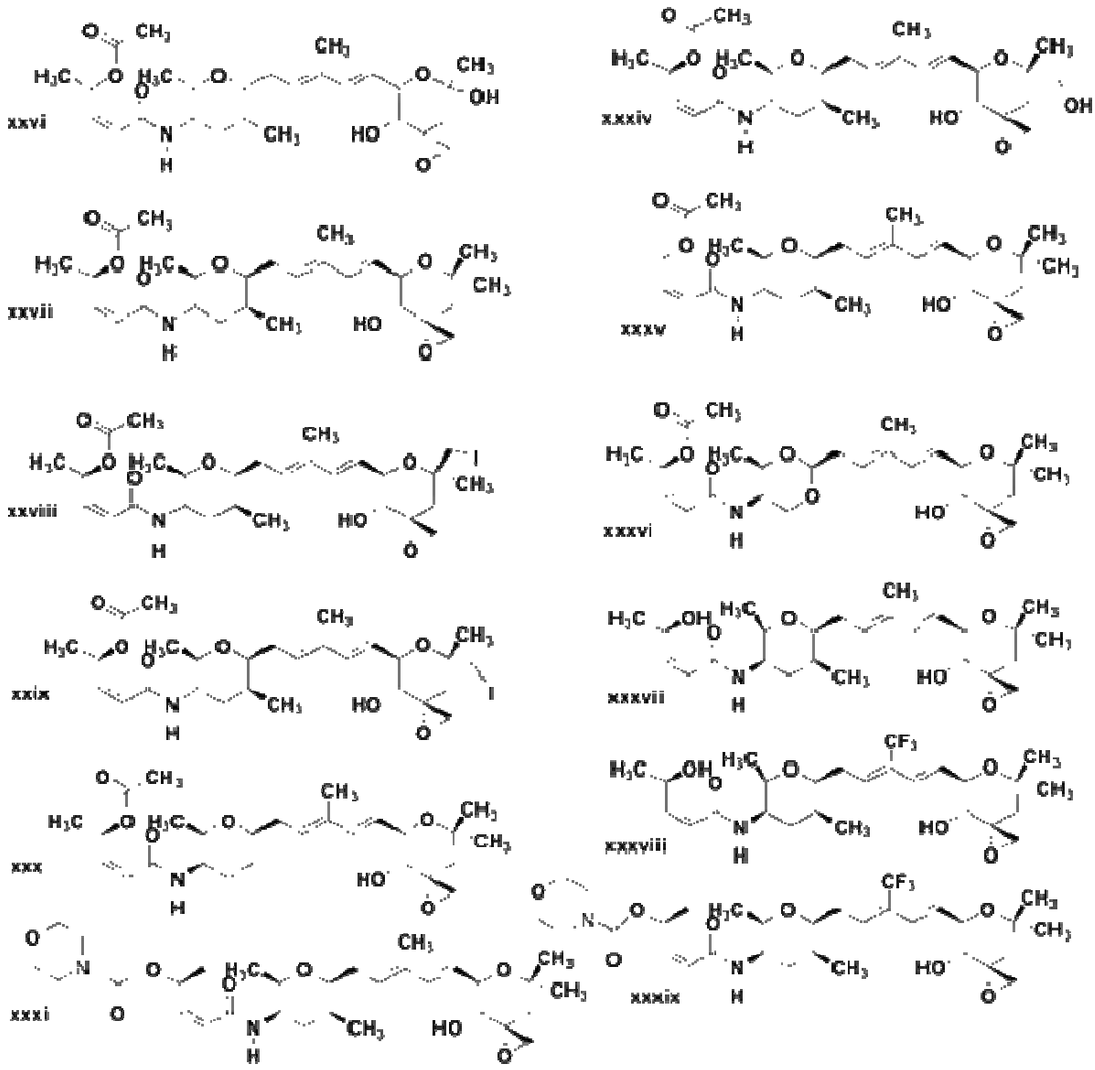
xxiv



xxxii

xxv

xxxiii



Composiciones

Un cultivo sustancialmente puro, fracción celular o sobrenadante y compuestos producidos por la cepa de Burkholderia de la presente invención, pueden ser formulados en composiciones pesticidas.

Las sustancias expuestas anteriormente pueden ser formuladas en cualquier manera. Ejemplos de formulación no limitantes incluyen pero no se limitan a concentrados emulsificables (EC), polvos humectables (WP), líquidos solubles (SL), aerosoles, soluciones de concentrados de ultra bajo volumen (ULV), polvos solubles (SP), microencapsulación, gránulos dispersados en agua, fluibles (FL), microemulsiones (ME), nano-

emulsiones (NE), etc. En particular, el concentrado, polvos, gránulos y emulsiones pueden ser secados por congelamiento. En cualquier formulación descrita en la presente, el porcentaje del ingrediente activo está dentro de un intervalo de 0.01% a 99.99%.

Las composiciones pueden estar en la forma de un líquido, gel o sólido. Composiciones líquidas comprenden compuestos pesticidas derivados de la cepa de *Burkholderia*, por ejemplo, una cepa que tienen las características de identificación de *Burkholderia* A396 (NRRL Acceso No. B-50319).

Una composición sólida se puede preparar suspendiendo un portador sólido en una solución de compuestos pesticidas y secando la suspensión bajo condiciones leves, tales como evaporación a temperatura ambiente o evaporación a vacío a 65°C o menos.

Una composición de la invención puede comprender compuestos encapsulados en gel derivados de la cepa de *Burkholderia* de la presente invención. Tales materiales encapsulados en gel se pueden preparar mezclando un agente que forma gel (por ejemplo, gelatina, celulosa o lignina) con una solución de compuestos pesticidas usados en el método de la invención; e induciendo la formación de gel del agente.

La composición puede comprender adicionalmente un tensoactivo a ser usado para el propósito de emulsificación, dispersión, humectación, dispersión, integración, desintegración, control, estabilización de ingredientes activos, y mejoramiento de fluidez o inhibición de moho. En una modalidad particular, el tensoactivo es un tensoactivo no iónico no fitotóxico el cual preferiblemente pertenece al EPA Lista 4B. En otra modalidad particular, el tensoactivo no iónico es monolaurato de polioxietileno (20). La concentración de tensoactivos puede

variar entre 0.1–35% de la formulación total, el intervalo preferido es 5–25%. La elección de agentes emulsificantes y de dispersión, tales como agentes emulsificantes y dispersantes no iónicos, aniónicos, anfotéricos y catiónicos, y la cantidad empleada, se determina por la naturaleza de la composición y la capacidad del agente para facilitar la dispersión de estas composiciones.

La composición puede comprender además otros microorganismos y/o pesticidas (por ejemplo nematicida, fungicida, insecticida). El microorganismo puede incluir pero no se limita a un agente derivado de *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Brevabacillus sp., Lecanicillium* sp., no *Ampelomyces* sp., *Pseudozyma* sp., *Streptomyces* sp, *Burkholderia* sp, *Trichoderma* sp, *Gliocladium* sp. Alternativamente, el agente puede ser un producto de aceite o aceite natural que tiene actividad fungicida y/o insecticida (por ejemplo, aceite parafínico, aceite del árbol del té, aceite de zacate limón, aceite de clavo, aceite de canela, aceite de cítricos, aceite de romero).

La composición, en particular, puede comprender además un insecticida. El insecticida puede incluir pero no se limita a avermectina, *Bacillus thuringiensis*, aceite de neem y azadirac-tina, espinosad, *Chromobacterium subtsugae*, extracto de euca-lipto, bacteria entomopatogénica u hongo tal como *Beauveria ba-ssiana, y Metarrhizium anisopliae* e insecticidas químicas que incluyen pero no se limitan a compuestos organoclorados, compues-tos organofosforosos, carbamatos, piretroides, y neonicotinoides.

La composición puede comprender además un nematicida. El nematicida puede incluir, pero no se limita a nematicidas químicos tales como fenamifos, aldicarb, oxamilo, carbofurano,

nematicida de producto natural, avermectina, los hongos *Paecilomyces lilacinas y Muscodor spp.*, las bacterias *Bacillus firmus y* otros *Bacillus spp.* y *Pasteuria penetrans*.

La composición puede comprender además un biofungicida tal como extracto de *R. sachalinensis* (Regalia) o un fungicida. Tales fungicidas incluyen, pero no se limitan a, un agente antifúngico de sitio único el cual puede incluir pero no se limita a bencimidazol, un inhibidor de desmetilación (DMI) (por ejemplo, imidazol, piperazina, pirimidina, triazol), morfolina, hidroxipirimidina, anilinopirimidina, fosforotiolato, inhibidor exterior de quinona, quinolina, dicarboximida, carboximida, fenilamida, anilinopirimidina, fenilpirrol, hidrocarburo aromático, ácido cinámico, hidroxianilida, antibiótico, polioxina, acilamina, ftalimida, benzenoide (xililalanina). En aún una modalidad adicional, el agente antifúngico es un inhibidor de desmetilación seleccionado a partir del grupo que consiste de imidazol (p.ej., triflumizol), piperazina, pirimidina y triazol (por ejemplo, bitertanol, miclobutanilo, penconazol, propiconazol, triadimefon, bromuconazol, ciproconazol, diniconazol, fenbuconazol, hexaconazol, tebuconazol, tetraconazol, propiconazol).

El agente antimicrobiano también puede ser un fungicida química, de sitio múltiple no inorgánico, seleccionado a partir del grupo que consiste de un nitrilo (p.ej., cloronitrilo o fludioxonilo), quinoxalina, sulfamida, fosfonato, fosfito, ditiocarbamato, cloralquiltio, fenilpiridin-amina, oxima de cianoacetamida.

Las composiciones se pueden aplicar usando métodos conocidos en la técnica. Específicamente, estas composiciones se pueden aplicar a plantas o partes de plantas. Las plantas se

entienden por significar en el presente contexto todas las plantas y poblaciones de plantas tales como plantas de cultivo o plantas silvestres deseadas e indeseadas (que incluyen plantas de cultivo que se originan naturalmente). Las plantas de cultivo pueden ser plantas las cuales se pueden obtener por reproducción vegetal convencional y métodos de optimización o por métodos de ingeniería genética y biotecnológica o combinaciones de estos métodos, que incluyen las plantas transgénicas y que incluyen los cultivares vegetales protegidos o no protegidos por derechos de reproductores de plantas. Las partes vegetales se entienden por significar todas las partes y órganos de plantas arriba y abajo de la tierra, tales como brotes, hojas, flores y raíces, ejemplos los cuales pueden ser mencionados son hojas, acículas, tallos, troncos, flores, órganos fructíferos, frutos, semillas, raíces, tubérculos y rizomas. Las partes vegetales también incluyen material cosechado y material de propagación vegetativo y generativo, p.ej. esquejes, tubérculos, rizomas, retoños y semillas.

El tratamiento de las plantas y partes vegetales con las composiciones expuestas anteriormente se puede llevar a cabo directamente o permitiendo a las composiciones actuar en sus alrededores, hábitats o espacio de almacenaje mediante, por ejemplo, inmersión, atomización, evaporación, neblina, dispersión, pintura en, inyección. En el caso de que la composición se aplique a una semilla, la composición puede ser aplicada a la semilla como uno o más recubrimientos previo a plantar la semilla usando uno o más recubrimientos usando métodos conocidos en la técnica.

Como se indicó anteriormente, las composiciones pueden ser composiciones herbicidas. La composición puede comprender

además uno o más herbicidas. Estos pueden incluir, pero no se limitan a, un bioherbicida y/o un herbicida químico. El bioherbicida puede ser seleccionado a partir del grupo que consiste de clavo, canela, zacate limón, aceites cítricos, aceite de cáscara de naranja, tentoxina, cornexistina, toxina AAL, leptospermona, taxtomina, sarmentina, momilactona B, sorgoleona, ascaulatoxina y ascaulatoxina aglicona. El herbicida químico puede incluir, pero no se limita a, diflufenzopir y sales de los mismos, topramezona, tembotriona, S-metolaclor, atrazina, mesotriona, primisulfuron-metilo, ácido 2,4-diclorofenoxiacético, nicosulfurona, tifensulfuron-metilo, asulam, metribuzina, diclofop-metilo, fluazifop, fenoxaprop-p-etilo, asulam, oxifluorfeno, rimsulfuron, mecoprop, y quinclorac, tiobencarb, clomazona, cihalofop, propanilo, bensulfuron-metilo, penoxsulam, triclopir, imazetapir, halosulfuron-metilo, pendimetalina, biespiribac-sódico, carfentrazonetilo, bentazon sódico/acifluorfen sódico, glifosato, glufosinato y ortosulfamurona.

Las composiciones herbicidas pueden ser aplicadas en forma sólida o líquida como formulaciones pre-emergencia o post-emergencia.

Para formulaciones secas pre-emergencia, el tamaño del gránulo del portador es típicamente 1-2 mm (diámetro) pero los gránulos pueden ser ya sea más pequeño o más grande dependiendo de la cobertura de tierra requerida. Los gránulos pueden comprender partículas porosas o no porosas.

Para formulaciones post-emergencias, los componentes de formulación usados pueden contener arcillas esmectitas, arcillas atapulgitas y arcillas de expansión similares, espesantes tales como gomas de xantano, goma arábiga y otros espesantes de

polisacárido así como también estabilizadores de dispersión tales como tensoactivos no iónicos (por ejemplo monolaurato de polioxietileno (20).

Usos

Las composiciones y compuestos pesticidas derivados de la cepa de *Burkholderia* expuesta en la presente se pueden usar como pesticidas, particularmente como insecticidas, nematicidas, fungicidas y herbicidas.

Específicamente, los nemátodos que pueden ser controlados usando los métodos expuestos anteriormente incluyen pero no se limitan a nemátodos parasíticos tales como nemátodos nodulares de la raíz, anulares, picadura, lanza, quiste y lesión, que incluyen pero no se limitan a *Meloidogyne, Heterodera* y *Globodera* spp; particularmente *Meloidogyne incognita* (nemátodos nodulares de la raíz), así como también *Globodera rostochiensis* y *globodera pailida* (nemátodos de quiste de papa); *Heterodera glycines* (nemátodo de quiste de soya); *Heterodera schachtii* (nemátodo de quiste de remolacha); y *Heterodera avenae* (nemátodo de quiste de cereal).

Insecto fitopatogénicos controlados por el método de la presente invención incluyen pero no se limitan a insectos del orden (a) Lepidoptera, p.ej., *Acleris spp., Adoxophyes spp., Aegeria spp., Agrotis spp., Alabama argillaceae, Amylois spp., Anticarsia gemmatalis, Archips spp., Argyrotaenia spp., Autographa spp., Busseola fusca, Cadra cautella, Carposina nipponensis, Chilo spp., Choristoneura spp., Clysia ambiguella, Cnaphalocrocis spp., Cnephasia spp., Cochylis spp., Coleophora spp., Crocidolomia binotalis, Cryptophlebia leucotreta, Cydia spp., Diatraea spp., Diparopsis castanea, Earias spp., Ephestia*

spp., Eucosma spp., Eupoecilia ambiguella, Euproctis spp., Euxoa spp., Grapholita spp., Hedya nubiferana, Heliothis spp., Hellula undalis, Hyphantria cunea, Keiferia lycopersicella, Leucoptera scitella, Lithocollethis spp., Lobesia botrana, Lymantria spp., Lyonetia spp., Malacosoma spp., Mamestra brassicae, Manduca sexta, Operophtera spp., Ostrinia nubilalis, Pammene spp., Pandemis spp., Panolis flammea, Pectinophora gossypiella, Ftorimaea operculella, Pieris rapae, Pieris spp., Plutella xylostella, Prays spp., Scirpophaga spp., Sesamia spp., Sparganothis spp., Spodoptera spp., Synanthedon spp., Thaumetopoea spp., Tortrix spp., Trichoplusia ni y Yponomeuta spp.;

(b) Coleóptera, por ejemplo, *Agriotes spp., Anthonomus spp., Atomaria linearis, Chaetocnema tibialis, Cosmopolites spp., Curculio spp., Dermestes spp., Diabrotica spp., Epilachna spp., Eremnus spp., Leptinotarsa decemlineata, Lissorhoptrus spp., Melolontha spp., Orycaephilus spp., Otiorhynchus spp., Phlyctinus spp., Popillia spp., Psylliodes spp., Rhizopertha spp-, Scarabeidae, Sitophilus spp., Sitotroga spp., Tenebrio spp., Tribolium spp. y Trogoderma spp.; (c) Ortóptera, por ejemplo, Blatta spp., Blattella spp., Gryllotalpa spp., Leucophaea maderae, Locusta spp., Periplaneta spp. y Schistocerca spp.; (d) esóptera, por ejemplo, Reticulitermes spp.; (e) Psocóptera, por ejemplo, Liposcelis spp.; (f) Anoplura, por ejemplo, Haematopinus spp., Linognathus spp., Pediculus spp., Pemphigus spp. y Phylloxera spp.; (g) Malofaga, por ejemplo, Damalinea spp. y Trichodectes spp.; (h) Tisanóptera, por ejemplo, Frankliniella spp., Hercinotnrips spp., Taeniothrips spp., Thrips palmi, Thrips tabaci y Scirtothrips aurantii; (i) Heteróptera, por ejemplo,*

Cimex spp., Distantiella theobroma, Dysdercus spp., Euchistus spp., Eurygaster spp., Leptocorisa spp., Nezara spp., Piesma spp., Rhodnius spp., Sahlbergella singularis, Scotinophara spp. y Tniatoma spp.; (j) Homóptera, por ejemplo, Aleurothrixus floccosus, Aleyrodes brassicae, Aonidiella spp., Aphididae, Aphis spp., Aspidiotus spp., Bemisia tabaci, Ceroplaster spp., Chrysomphalus aonidium, Chrysomphalus dictyospermi, Coccus hesperidum, Empoasca spp., Eriosoma larigerum, Erythroneura spp., Gascardia spp., Laodelphax spp., Lecanium corni, Lepidosaphes spp., Macrosiphus spp., Myzus spp., Nephotettix spp., Nilaparvata spp., Paratoria spp., Pemphigus spp., Planococcus spp., Pseudaulacaspis spp., Pseudococcus spp., Psylla spp., Pulvinaria aetiopica, Quadraspidiotus spp., Rhopalosiphum spp., Saissetia spp., Scaphoideus spp., Schizaphis spp., Sitobion spp., Trialeurodes vaporariorum, Trioza erytreae y Unaspis citri; (k) Himenóptera, por ejemplo, Acromyrmex, Atta spp., Cephus spp., Diprion spp., Diprionidae, Gilpinia polytoma, Hoplocampa spp., Lasius spp., Monomorium pharaonis, Neodiprion spp., Solenopsis spp. y Vespa spp.; (l) Díptera, por ejemplo, Aedes spp., Antherigona soccata, Bibio hortulanus, Calliphora erythrocephala, Ceratitis spp., Chrysomyia spp., Culex spp., Cuterebra spp., Dacus spp., Drosophila melanogaster, Fannia spp., Gastrophilus spp., Glossina spp., Hypoderma spp., Hyppobosca spp., Liriomyza spp., Lucilia spp., Melanagromyza spp., Musca spp., Oestrus spp., Orseolia spp., Oscinella frit, Pegomyia hyoscyami, Phorbia spp., Rhagoletis pomonella, Sciara spp., Stomoxis spp., Tabanus spp., Tannia spp. y Tipula spp.; (m) Sifonaptera, por ejemplo, Ceratophyllus spp. und Xenopsylla cheopis y (n) del orden Tisanura, por ejemplo, *Lepisma saccharina*. Los ingredientes

activos de conformidad con la invención se pueden usar además para controlar pulgón de crucíferas (*Phyllotreta* spp.), gusanos de la raíz (*Delia* spp.), picudo de la col (*Ceutorhynchus* spp.) y áfidos en cultivos de semillas para aceite tales como canola (colza), semilla de mostaza, e híbridos de los mismos, y también arroz y maíz.

En una modalidad particular, el insecto puede ser un miembro de la *Spodoptera*, más particularmente, *Spodoptera exigua, Myzus persicae, Plutella xylostella o Euschistus* sp.

Las sustancias y composiciones también pueden ser usadas para modular la emergencia en ya sea una formulación pre-emergente o post-emergente de monocotiledóneas, malezas de dicotiledóneas o juncias. En una modalidad particular, las malezas pueden ser *Chenopodium album, Abutilon theophrasti, Helianthus annuus, Ambrosia artemesifolia, Amaranthus retroflexus, Convolvulus arvensis, Brassica kaber, Taraxacum officinale, Solanum nigrum, Malva neglect, Setaria lutescens, Bromus tectorum, Poa annua, Poa pratensis*, *Lolium perenne* L. var. Pace, *Festuca arundinaceae Schreb*. var. Aztec II, Anthem II, LS1100, *Echinochloa crus-galli*, *Lactuca sativa.* La cepa de *Burkholderia*, compuestos y composiciones expuestos anteriormente también pueden ser usados como un fungicida. Los hongos dirigidos pueden ser un *Fusarium* sp., *Botrytis* sp., *Monilinia* sp., *Colletotrichum sp, Verticillium sp.*; *Microphomina* sp., *Phytophtora sp*, *Mucor* sp., *Podosphaera* sp.__*Rhizoctonia sp., Peronospora sp., Geotrichum sp., Phoma, y Penicillium.* En otra modalidad muy particular, las bacterias son *Xanthomonas*.

La invención será ahora descrita en mayor detalle por referencia a los siguientes ejemplos no limitantes.

EJEMPLOS

Las composiciones y métodos expuestos anteriormente serán mejor ilustrados en los siguientes Ejemplos no limitantes. Los ejemplos son ilustrativos de varias modalidades solamente y no limitan la invención reivindicada con respecto a los materiales, condiciones, relaciones en peso, parámetros de proceso y similares mencionados aquí.

1. Ejemplo 1. Aislamiento e identificación del microbio

1.1 Aislamiento del microorganismo

El microbio es aislado usando técnicas establecidas conocidas en la técnica a partir de una muestra de suelo recolectada bajo un árbol de hoja perene en el Rinnoji Temple, Nikko, Japón. El aislamiento se hace usando agar de dextrosa de papa (PDA) usando un procedimiento descrito en detalle por Lorch et al., 1995. En este procedimiento, la muestra de suelo es primero diluida en agua estéril, después de lo cual es plaqueada en un medio de agar sólido tal como agar de dextrosa de papa (PDA). Las placas se hacen crecer a 25°C por cinco días, después de lo cual las colonias microbianas individuales son aisladas en placas de PDA separadas. La bacteria aislada es gram negativa, y forma colonias de color crema opacas, redondas que cambian a rosa y rosado marrón en color y mucoides o babosas con el tiempo.

1.2. Identificación en el microorganismo

El microbio se identifica con base en el secuenciamiento del gen usando cebadores bacterianos universales para amplificar la región de 16S ARNr. Se usa el siguiente protocolo: *Burkholderia sp* A396 se cultiva en placas de agar de dextrosa de papa. El crecimiento de una placa de 24 horas se raspa con un bucle estéril y re-suspende en amortiguador de

extracción de ADN. El ADN se extrae usando el kit de extracción de ADN Microbiano MoBio Ultra Clean. El extracto de ADN es verificado por calidad/cantidad corriendo 5µl en un gel de agarosa al 1%.

Las reacciones de PCR se establecieron como sigue: 2 µl de extracto de ADN, 5 µl de amortiguador de PCR, 1 µl de dNTP (10 mM cada uno), 1.25 µl de cebador delantero (27F; 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' (SEC ID NO:1), 1.25 µl de cebador inverso (907R; 5'-CCGTCAATTCCTTTGAGTTT-3' (SEC ID NO:2)) y 0.25 µl de enzima Taq. El volumen de reacción se hace hasta 50 µl usando agua libre de nucleasa estéril. La reacción de PCR incluye una etapa de desnaturalización inicial a 95°C por 10 minutos, seguida por 30 ciclos de 94°C/30 seg, 57°C/20 seg, 72°C/30 seg, y una etapa de extensión final a 72°C por 10 minutos.

La concentración y tamaño aproximado del producto se calcula corriendo un volumen de 5 µl en un gel de agarosa al 1% y comparando la banda del producto a una escalera de masa.

Cebadores de exceso, dNTPs y enzimas son removidos del producto de PCR con el kit limpiador de PCR MoBio. El producto de PCR se limpia directamente secuenciado usando cebadores 27F (los mismos como anteriormente), 530F (5'-GTGCCAGCCGCCGCGG-3' (SEC ID NO:3)), 1114F (5'-GCAACGAGCGCAACCC (SEC ID NO:4)) y 1525R (5'-AAGGAGGTGWTCCARCC-3' (SEC ID NO:5)), 1100R (5'-GGGTTGCGCTCGTTG-3' (SEC ID NO:6)), 519R (5'- GWATTACCGCGGCKGCTG-3' (SEC ID NO:7).

La secuencia del gen 16S ARNr de la cepa A396 es comparada con las secuencias del gen 16s ARNr disponibles de representantes de la β-proteobacteria usando BLAST. La cepa A395 A396 es estrechamente relacionada a miembros del complejo de *Burkholderia cepacia*, con 99% o superior similitud a varios

aislados de *Burkholderia multivorans*, *Burkholderia vietnamensis*, y *Burkholderia cepacia*. Una búsqueda BLAST que excluye el complejo de *B. cepacia*, mostró 90% de similitud a aislados de *B. plantarii, B. gladioli* y *Burkholderia sp*.

Un árbol de la distancia de resultados usando el método de unión vecino, mostró que A396 está relacionada con *Burkholderia multivorans* y otros aislados de complejos de *Burkholderia cepacia*. *Burkholderia plantarii* y *Burkholderia glumae* se agruparon en una rama separada del árbol.

La cepa de aislado de *Burkholderia* se encontró por contener las siguientes secuencias:

secuencia delantera, secuencia de ADN con cebador 27F, 815 nucleótidos (SEC ID NO:8); secuencia inversa, 1453 bp, usando cebadores 1525R, 1100R, 519R (SEC ID NO:9); secuencia inversa 824 bp usando cebador 907R (SEQ NO: 10); secuencia delantera 1152 bp usando cebador 530F (SEC ID NO:11); secuencia delantera 1067 bp usando cebador 1114F (SEC ID NO:12); secuencia inversa 1223 bp usando cebador 1525R (SEC NO:13); secuencia inversa 1216 bp usando cebador 1100R (SEC ID NO:14); secuencia inversa 1194 bp usando cebador 519R (SEC ID NO:15).

1.3. Prueba de que Burkholderia A396 no pertenece al complejo de Burkholderia cepacia.

1.3.1 Trabajo de Biología Molecular usando cebadores de PCR específicos

Para confirmar la identificación de *Burkholderia A396* como *Burkholderia multivorans*, se realizó secuenciamiento adicional de genes de mantenimiento. *Burkholderia multivorans* es un miembro conocido del complejo de *Burkholderia cepacia*. Se enfocaron esfuerzos en PCR de genes recA, como se describe por

Mahenthiralingam et al., 2000. Se usaron los siguientes cebadores: (a) BCR1 y BCR2 expuesto en Mahenthiralingam et al., 2000 para confirmar el igualamiento del complejo *B. cepacia* y (b) BCRBM1 y BCRBM2 expuesto en Mahenthiralingam et al, 2000 para confirmar el igualamiento de *B. multivorans*. Una reacción de PCR que proporciona el producto para el primer cebador establecido podría confirmar que el microbio pertenece al complejo de *B. cepacia*. Una reacción de PCR para proporcionar el producto para el segundo cebador establecido podría confirmar que el microbio es sin embargo *B. multivorans*.

No se obtiene producto de PCR para cualquier par de cebadores. El desempeño de la reacción de PCR y cebadores se prueba usando *Burkholderia multivorans* ATCC 17616 (control positivo) y *Pseudomonas fluorescens* (control negativo). Se observaron bandas fuertes ambas para *B. multivorans* usando ambas series de cebadores. No se observaron bandas para *Pseudomonas fluorescens*. Los resultados indican que A396 es una *Burkholderia*, pero no un miembro del complejo *B. cepacia*, y no *Burkholderia multivorans*. Esto también se demuestra en un experimento de cultivo comparativo en el cual tanto A396 como un tipo de cultivo de *B. multivorans* se hacen crecer lado por lado en un cultivo sacudido, y el crecimiento se monitorea diariamente usando mediciones de densidad óptica a 600 nm. Bajo las condiciones establecidas, las nuevas especies de A396 crecen mucho más rápido que la cepa de tipo *B. multivorans* (Figura 1).

1.3.2 Hibridación de ADN-ADN

Para confirmar que el aislado A396 es una nueva especie de *Burkholderia*, se conduce un experimento de hibridización de ADN-ADN con *Burkholderia multivorans* (el apareamiento de

secuencia de 16S ARNr más cercana). La biomasa para tanto A396 como *B. multivorans* se produce en caldo de ISP2, crece durante 48 horas a 200 rpm/25°C en matraces Fernbach. La biomasa es asépticamente recolectada por centrifugación. El caldo es decantado y la pelotilla celular es resuspendida en una solución 1:1 de agua:isopropanol. Se realizaron experimentos de hibridización de ADN-ADN por el DSMZ, la Colección Germana de Microorganismos y Cultivos Celulares en Alemania. El ADN es aislado usando una celda de presión French (Thermo Spectronic) y es purificado por cromatografía en hidroxiapatito como se describe por Cashion et al., 1977. La hibridización de ADN-ADN se lleva a cabo como se describe por De Ley et al., 1970 bajo consideración de las modificaciones descritas por Huss et al., 1983 usando un espectrofotómetro UV/VIS modelo Cary 100 Bio equipado con un cambiador multicélulas 6x6 de termostato Peltier y un controlador de temperatura con una sonda de temperatura *in situ* (Varian). El DSMZ reportó % de similitud de ADN-AD entre A396 y *Burkholderia multivorans* de 37.4%. Los resultados indican que la cepa A396 de *Burkholderia sp* no pertenece a la especie *Burkholderia multivorans* cuando se consideran las recomendaciones de un valor umbral de 70% de similitud de ADN-ADN para la definición de especies bacterianas y el comité para esto (Wayne et al., 1987).

1.4. Perfil bioquímico usando placas Biolog GN2

Para el perfil de utilización de fuente de carbono, A396 se hace crecer en Agar de Dextrosa de Papa (PDA). El cultivo es transferido a agar BUG para producir un cultivo adecuado para experimentos Biolog como se recomienda por el fabricante (Biolog, Hayward, CA).

El perfil bioquímico del microorganismo se determina inoculando en una placa Biolog GN2 y leyendo la placa después de una incubación de 24 horas usando el sistema de microestación 4-automatizada MicroLog. La identificación de la bacteria desconocida se intenta comparando su patrón de utilización de carbono con la base de datos Gram Negativa de Microlog 4.

No se encontraron apareamientos definitivos transparentes al perfil Biolog. Los apareamientos más cercanos todos tienen menos de 35% de similitud con A396: *Pseudomonas spinosa (Burkholderia), Burkholderia cepacia, y Burkholderia pseudomallei.* Los resultados se muestran en la Tabla I.

Tabla 1. Perfil Bioquímico de A396

Sustrato	Resultado	Sustrato	Resultado
Ciclodextrina	-	L-arabinosa	-
Dextrina	-	D-arabitol	-
Glicógeno	-	D-celobiosa	-
Tween 40	+	Eritritol	-
Tween 80	+	D-Fructosa	-
N-acetil-D-Galactosamina	-	L-Fucosa	-
N-acetil-D-glucosamina	-	D-Galactosa	+/-
Adonitol	-	Gentibiosa	-
Monometiléster del ácido succínico	-	D-Glucosa	+
Ácido acético	-	m-Inositol	-
Ácido Cis-aconítico	-	D-Lactosa	-
Ácido cítrico	-	Lactulosa	-
Ácido fórmico	+	Maltosa	-
Lactona de ácido D-Galactónico	-	D-Manitol	-
Ácido D-Galacturónico	-	D-Manosa	-
Ácido D-Glucónico	-	D-Melibiosa	-
Ácido D-Glucosamínico	-	β-metil-D-glucósido	-
Ácido D-Glucurónico	-	D-Psicosa	-

Sustrato	Resultado	Sustrato	Resultado
Ácido α-hidroxiburtírico	-	D-Rafinosa	-
Ácido β-hidroxibutírico	+	L-Ramonosa	-
Ácido γ-hidroxibutírico	-	D-Sorbitol	-
Ácido p-hidroxifenilacético	-	Sucrosa	-
Ácido Itacónico	-	D-Trehalosa	+
Ácido α-ceto butírico	-	Turanosa	-
ácido α-ceto glutárico	-	Xilitol	-
ácido α-ceto valérico	-	Éster metílico del ácido Pirúvico	-
ácido D,L-Láctico	-	Uridina	-
ácido Malónico	-	Timidina	-
ácido propiónico	+	Fenietil-amina	-
ácido quínico	-	Putrescina	-
ácido D-Sacárico	-	2-aminoetanol	-
ácido sebácico	-	2,3-Butandiol	-
ácido succínico	+	Glicerol	+/-
ácido Bromosuccínico	-	fosfato de D,L-a-glicerol	+/-
ácido Succinámico	-	α-D-Glucosa-1-fosfato	-
Glucuronamida	-	D-glucosa-6-fosfato	+
L-alaninamida	+	ácido γ-amino butírico	+
D-Alanina	-	ácido Urocánico	-
L-alanina	+	Inosina	-
L-alanil-glicina	-	L-fenilalanina	+
L-asparagina	+	L-prolina	-
ácido L-aspártico	+/-	ácido L-piroglutámico	

Sustrato	Resultado	Sustrato	Resultado
ácido L-glutámico	+	D-serina	-
ácido Glicil-L-Aspártico	-	L-serina	-
ácido Glicil-L-glutámico	-	L-treonina	-
L-histidina	-	D,L-carnitina	-
Hidroxi-L-prolina	+	L-ornitina	-
L-leucina	-		

1.5. Composición de ácido graso

Después de la incubación por 24 horas a 28°C, asas de células que crecen en cavidad se recolectaron y se prepararon ésteres metílicos del ácido graso, separaron e identificaron

usando el Sistema de Identificación Microbiana de Sherlock (MIDI) como se describe (véase Vandamme et al., 1992). Los ácidos grasos predominantes presentes en la *Burkholderia* A396 son como siguen: 16:0 (24.4%), ciclo 17:0 (7.1%), 16:0 3- OH (4.4%), 14:0 (3.6%), 19:0 ω8*c* (2.6%) ciclo, 18:0 (1.0%). La característica resumida 8 (que comprende 18:1 ω7*c*) y característica resumida 3 (que comprende de 16:1 ω7c y 16:1 ω6*c*) corresponde a 26.2% y 20.2 % del área de pico total, respectivamente. La característica resumida 2 que comprende 12:0 ALDE, 16:1 iso I, y 14:0 3-OH) corresponde a 5.8% del área de pico total mientras la característica resumida 5 que comprende 18:0 ANTE y 18:2 ω6,9c corresponde a 0.4%. Otros ácidos grasos detectados en A396 en cantidades menores incluyen: 13:1 a 12-13 (0.2%), 14:1 ω5c (0.2%), 15:0 3-OH (0.13%), 17:1 ω7c (0.14%), 17:0 (0.15%), 16:0 iso 3-OH (0.2%), 16:0 2-OH (0.8%), 18:1 ω7c 11-metilo (0.15%), y 18:1 2-OH (0.4%).

Una comparación de la composición de ácido graso de A396 con aquella de cepas microbianas conocidas en la base de datos MIDI sugiere que los ácidos grasos en la nueva cepa A396 fueron muy similares con aquellos de *Burkholderia cenocepacia.*

1.6 Resistencia a Antibióticos

La susceptibilidad antibiótica de *Burkholderia A396* es probada usando discos antibióticos en medio Muller-Hinton como se describe en la hoja de datos técnicos Microbiológicos PML #535. Los resultados obtenidos después de 72 horas de incubación a 25°C se presentan en la Tabla 2 abajo.

Tabla 2: Susceptibilidad de MBI-206 a varios antibióticos. +++ muy susceptible, ++ susceptible, - resistente

	Concentración (ug)	Susceptible
Tetraciclina	30	-
Canamicina	30	+++
Eritromicina	15	-
Estreptomicina	10	-
Penicilina	10	-
Ampicilina	10	-
Oxitetraciclina	30	-
Cloranfenicol	30	++
Ciprofloxacina	5	++
Gentamicina	10	-
Piperacilina	100	+++
Cefuroxima	30	-
Imipenem	10	+++
Sulfametoxazol-Trimetoprim	23.75/ 25	++

Los resultados indican que el espectro de susceptibilidad antibiótica de *Burkholderia A396* es casi diferente de cepas del complejo patogénico de *B. cepacia*. *Burkholderia A396* es susceptible a canamicina, cloranfenicol, ciprofloxacina, piperacilina, imipenem, y una combinación de sulfametoxazol y trimetoprim. Como una comparación, Zhou et al., 2007 probó la susceptibilidad de 2,621 cepas diferentes en el complejo de *B. cepacia* aislado de pacientes con fibrosis quística, y encontró que solamente 7% y 5% de todas las cepas fueron susceptibles a imipenem o ciprofloxacina, respectivamente. También se encontró que 85% de todas las cepas son resistentes a cloranfenicol (15% susceptible), y 95% son resistentes (5% susceptible) a la combinación de sulfametoxazol y trimetoprim. Los resultados de Zhou et al., 2007 son similares a aquellos de Pitt et al., 1996 quién determinó la resistencia antibiótica entre 366 aislados de *B. cepacia* y reportó que muchos de ellos son resistentes a ciprofloxacina, cefuroxima, imipenem,

cloranfenicol, tetraciclina, y sulfametoxacol.

2. Ejemplo 2. Burkholderia sp. como un Herbicida

2.1 Estudio #1

Para confirmar la actividad encontrada en la selección inicial de herbicida, se condujo un estudio *in vivo* usando el extracto de resina Amberlite 7 XAD de un caldo de células completo de 5 días de la nueva especie de *Burkholderia*. El extracto crudo seco se resuspendió en 4% de etanol y 0.2% de tensoactivo no iónico (glicospersa) a una concentración de 10 mg/mL, y además se diluyó a una concentración de 5.0 mg/mL. Las dos muestras se rociaron en plantas de enredadera de 4 semanas (*Convolvulus arvensis*), y las plantas se mantienen bajo luces de crecimiento a 25°C por 2 semanas, en tal punto, se realizaron las evaluaciones de fitotoxicidad. En el mismo estudio, plantas de bledo de raíz roja de 2 semanas se rociaron con concentraciones incrementadas del extracto crudo derivado del cultivo bacteriano. Las concentraciones de prueba son de 1.25, 2.5, 5.0 y 10.0 mg/mL, y las plantas se incuban como se describe arriba antes de las evaluaciones de fitotoxicidad.

Los resultados presentados en las Figuras 2 (enredadera) y 3 (bledo) muestran el efecto fitotóxico de extracto crudo de Burkholderia a diferentes concentraciones, y muestran buen efecto herbicida en bledo aún a bajas concentraciones de tratamiento. Ambos tratamientos de extractos (5 y 10 mg/mL) resultan en retraso del crecimiento en enredadera.

2.2 Estudio #2

Una nueva cepa de *Burkholderia sp.* A396 se hace crecer en un medio mineral no definido por 5 días (25°C, 200 rpm). El caldo celular completo es extraído usando resina XAD7. El

extracto crudo seco se resuspendió en 4% de etanol y 0.2% de tensoactivo no iónico a una concentración de 10 mg/mL, y además se diluyó a concentraciones de 5.0, 2.5, y 1.25 mg/mL. Todas las cuatro soluciones de prueba son entonces probadas en las siguientes especies de malezas y hierbas de hoja ancha listadas en la Tabla 3:

Tabla 3. Especies de malezas y hierbas de hoja ancha Probadas

Nombre común	Nombre científico
Cenizo blanco común	*Chenopodium album*
Junco	*Conyza canadensis*
Lengua de vaca	*Rumex crispus*
Pasto colchón	*Digitaria sanguinalis*
Pasto azul	*Poa annua*
Diente de león	*Taraxacum officinale*
Hierba mora	*Solanum nigrum*
Mostaza	*Brassica kaber*
Malva	*Malva neglecta*
Acacia	*Xanthium pensylvanicum*
Zacate Bermuda	*Cynodon dactylon*
Cola de zorro	*Setaria lutescens*
Cardo	*Sonchus oleraceus*

Una solución de 0.2% de glicospersa y Roundup a relación de 6 fl oz por galón (177.441 ml/litro) se usa como controles negativo y positivo, respectivamente.

Todas las especies de plantas se probaron en macetas de plástico de 4”x4” (10.16cmsx10.16cms) en tres réplicas. Las plantas de control no tratadas se rociaron con la solución portadora (4% de Etanol, 0.2% de glicospersa) y las plantas de control positivo con el Roundup a una velocidad que corresponde a 6 fl. oz/acre (177.441 ml/hectárea). Las plantas tratadas se mantienen en un invernadero bajo condiciones de 12 horas luz/12 horas oscuridad. Los datos de fitotoxicidad tomados 22 días

después del tratamiento para las especies #1-8 y 12 días para las especies #9-12 se presentan en las Tablas 5 y 6, respectivamente. La escala de clasificación para ambas tablas se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4. Escala de

Escala Clasif.	% de Control
0	0
1	<10
2	25
3	50
4	75
5	100

Tratamiento	Junco	Cenizo blanco común	diente de león	lengua de vaca	pasto colchón	mostaza	hierba mora	pasto azul
UTC	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.7	0.0	0.0
1.25 mg/mL	0.0	4.7	0.0	0.0	0.0	4.3	0.0	0.0
2.5 mg/mL	0.7	4.5	0.0	0.0	0.0	4.7	0.0	0.0
5.0 mg/mL	4.3	5.0	0.0	0.0	0.0	5.0	0.0	0.0
10.0 mg/mL	4.7	5.0	0.0	0.*0	0.0	5.0	1.5	0.0
Roundup	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0

*retraso en el crecimiento que resulta en plantas de aproximadamente la mitad del tamaño de plantas no tratadas.

Tabla 6. Datos de Fitotoxicidad para Especies #9-12

Tratamiento	Acacia	Cola de zorro	Zacate Bermuda	Cardo	Malva
UTC	0.0	0.7	0.0	0.0	2.8
1.25 mg/mL	0.5	0.3	0.3	0.0	2.0
2.5 mg/mL	0.5	0.7	0.5	0.0	2.7
5.0 mg/mL	0.8	0.3	0.2	0.0	2.2
10.0 mg/mL	0.7	0.7	0.3	0.2	1.7
Roundup	4.7	4.8	4.7	5.0	5.0

Basados en los resultados obtenidos en estos estudios, se probaron los compuestos extraídos de caldos de fermentación de los aislados de especies de *Burkholderia* tienen actividad herbicida contra varias especies de malezas. De las doce especies tratadas, el Cenizo blanco común y mostaza son muy susceptibles,

seguidos por malva y junco. La concentración del extracto tan baja como 1.25 mg/mL es capaz de proporcionar casi control completo de Cenizo blanco común y mostaza, mientras concentraciones superiores son requeridas para la malva y junco.

En un experimento separado, usando el mismo diseño como se describe arriba, se probó la actividad sistémica. 10 mg/ml de sobrenadante de extracto crudo de *Burkholderia sp. A396* se pinta sobre primeras hojas verdaderas de Ambrosía, Mostaza, Hierba mora, Pasto colchón, Trigo y Pasto Pata de Gallo. Las plántulas se evaluaron 7 días después del tratamiento. Los síntomas observados incluyen: quema, deformación. La actividad herbicida de blanqueado se observa en la siguiente hoja arriba de la hoja tratada en Ambrosía, Mostaza y Hierba mora. No se observa actividad sistémica en los pastos probados. En un segundo experimento, cinco fracciones del mismo extracto crudo (10 mg/ml) se evaluaron usando el mismo diseño experimental como se describe arriba. Plántulas de Mostaza, Trigo y Pasto colchón se trataron. Siete y 20 días después del tratamiento, se observaron síntomas de actividad herbicida en Mostaza de cuatro de las cinco fracciones (091113B4F6, 091113B4F7, 091113B4F8 y 091113B4F9) usando una columna C-18 (Phenomenex Sepra C18-E, 50 µm, 65Å). Se observaron síntomas en la siguiente hoja arriba de la hoja tratada. No se observa actividad sistémica en los pastos probados.

3. Ejemplo 3. *Burkholderia* sp. como un insecticida

3.1. Estudios de Actividad de Contacto

Se usó el siguiente ensayo en la fase de selección inicial para determinar si los compuestos derivados de un cultivo de la nueva especie de *Burkholderia* tienen actividad de contacto contra una plaga de Lepidóptero (larvas). Además se usa como una

herramienta para el fraccionamiento guiado por bioensayo para determinar las fracciones activas y picos derivados del extracto de caldo celular completo. La prueba se conduce en tazas de plástico individuales de 1.25 oz (35.52 mililitros) usando ya sea larvas de tercer estadio tardías de Falso medidor de la col (*Tricoplusia ni*) o larvas de tercer estadio tempranas del Gusano soldado de la remolacha (*Spodoptera exigua*). Una pieza de 1cm x 1cm de dieta sólida de Gusano soldado de la remolacha se coloca en el centro de cada taza junto con una larva. Una alícuota de 1ml de cada tratamiento (caldo celular completo o extracto de un cultivo de 5 días de *Burkholderia* A396) se inyecta en cada tórax de larva (lado dorsal) usando una Jeringa de Precisión Hamilton. Cada tratamiento es replicado diez veces. Se usa agua como un tratamiento de control negativo y malatión como el tratamiento de control positivo. Después de la inyección, cada taza es cubierta con película de parafina con un agujero para aire, y las tazas se incuban por tres días a 26°C. Las evaluaciones de mortalidad de hacen diariamente, partiendo 24 horas después del tratamiento.

Las Figuras 4 y 5 presentan los resultados de pruebas de actividad de contacto. De conformidad con los resultados, el caldo esterilizado por filtración de un cultivo de *Burkholderia* sp eliminó aproximadamente 40% de todos los insectos de la prueba dentro de 3 días. El caldo diluido (50%) tiene actividad inferior, resultando en aproximadamente 10% de control en ambos insectos probados.

3.2. Actividad Contra Larvas A través de Alimentación

La toxicidad directa vía alimentación se prueba usando las pruebas de superposición de dieta con el siguiente formato de ensayo de placa de 96 cavidades usando placas microtituladoras

con 200 ml de dieta artificial sólida de Gusano soldado de la remolacha en cada cavidad. Cien (100) microlitros de cada muestra de prueba se pipetean en la parte superior de la dieta (una muestra en cada cavidad), y la muestra se deja secar bajo un flujo de aire hasta que la superficie se seca. Cada muestra (esterilizada por filtración a través de un filtro de 0.2 micrones) se prueba en seis réplicas, y agua y el producto comercial de Bt (*B. thuringiensis*) se usan como controles negativos y positivos, respectivamente. Larvas del tercer estadio del insecto de prueba (Falso medidor de la col-*Trichoplusia ni*; Gusano soldado de la remolacha – *Spodoptera exiqua*; Polilla diamante negro – *Plutella xylostella*) se coloca en cada cavidad, y la placa se cubre con cubierta de plástico con agujeros para aire. Las placas con insectos se incuban a 26°C por 6 días con evaluaciones de mortalidad diarias.

La Figura 5 representa datos de un estudio de sobreposición de dieta con larvas de tercer estadio temprano de Gusano soldado de la remolacha (*Spodoptera exigua*) probadas a cuatro diferentes concentraciones de caldo:1x (100%), 1/4x (25%), 1/8x (12.5%), 1/16x (6.125%). Los datos muestran que el caldo esterilizado por filtración, no diluido, es capaz de dar 100% de control al final del periodo de incubación de 7 días. Se obtiene control similar con una dilución de 4 veces del caldo, y en el final del estudio, ambos caldos diluidos 4 veces y no diluidos son comparables con Bt usado como un control positivo. Sin embargo, el efecto de Bt es significantemente más rápido que aquel de los caldos de *Burkholderia*. La eficacia contra las larvas de gusano soldado es dependiente de la concentración del caldo, y las dos concentraciones del caldo más bajas (12.5% y

6.125%) proporcionan menos control que las dos más altas. Sin embargo, el desempeño de la dilución al 12.5% no es mucho más baja que la dilución al 25%. La dilución de 16 veces del caldo claramente no es bastante eficiente, y solamente proporciona control parcial (33%) de larvas de gusano soldado durante este estudio de 7 días. Las tasas de mortalidad correspondientes para la misma dilución de caldo usado en larvas de falso medidor de la col y polilla diamante negro son un poco superior con 6.125% de caldo que elimina 80% y 50% de larvas, respectivamente.

3.3. Actividad in vitro contra insectos chupadores

Cinco adultos de chinches (*Euschistus* sp.) se colocaron en cada contenedor de plástico de 16 oz (473.18 ml) forrado con una pieza de papel secante. Un tubo microcentrífugo que contiene 2 mL de cada prueba de muestra (caldo completo esterilizado con filtro) se cubre con una bola de algodón, y se deja en el fondo del contenedor de plástico. Una semilla de girasol se coloca después en el tubo como cebo. Se usan agua y producto comercial como una mezcla de piretrina y PBO a una tasa recomendada como controles negativo y positivo, respectivamente. Cada contenedor se cierra con una tapa, y se incuba a 25°C por 7 días con verificaciones de mortalidad diariamente.

Los resultados son presentados abajo en la Tabla 7 y muestran aproximadamente 80% de control de insecto chupador (chinche) por el día 7 en este sistema *in vitro* con 50% de caldo diluido. En este estudio, el caldo de fermentación diluido de *Burkholderia* A396 es más efectivo en controlar chinches que el producto comercial usado como un control positivo. De manera interesante, el caldo no diluido resultó en control de insecto inferior, lo cual podría ser una indicación de propiedades

antialimentarias (inhibición de alimentación) de los metabolitos activos secundarios producidos por esta nueva especie de *Burkholderia*.

tratamiento	% de control (día 3)	% de control (día 5)	% de control (día 7)
caldo no dl. A396 (1x)	0	0	40
50% de caldo dl. A396 (0.5x)	20	20	80
Piretrina + PBO (control pos)	0	0	40
Agua (control neg)	0	0	0

4. Ejemplo 4. Prueba *in vivo* de insecto chupador

La eficacia *in vivo* del caldo celular filtrado completo se prueba en un ensayo de planta con plantas de mostaza y áfido de durazno verde (*Myzus persicae*) como el insecto de prueba. Se rocían plantas de mostaza de hoja ancha Florida (*Brassica* sp.) de aproximadamente un mes con dos diferentes concentraciones (1x y 0.5x) del caldo celular completo esterilizado por filtración de *Burkholderia s*p. usando un cepillo de aire Paasche. Se usan agua y un producto comercial de avermectina (Avid) como controles negativos y positivos, respectivamente. Las plantas se dejan secar en la mesa de trabajo, después de lo cual se colocan en un contenedor de plástico de 6 tazas con una tapa con agujeros para aire. Diez áfidos en varias etapas de desarrollo se colocan en cada planta de prueba, y las plantas se incuban bajo lámparas de crecimiento por 7 días a 25°C. Evaluaciones diarias para el número de áfidos en cada planta (resumida en la Tabla 8 abajo) se hacen y registran en un cuaderno de notas.

Tabla 8. Eficacia *in vivo* de A396 en Áfidos de Durazno Verde

Tratamiento	# de áfidos vivos Día 0	# de áfidos vivos Día 2	# de áfidos vivos Día 4	# de áfidos vivos Día 7
caldo no diluido A396 (1x)	10	36	88	145
caldo diluido A396 (0.5x)	10	47	138	217
Avermectina (control pos)	10	0	0	0
Agua (control neg)	10	140	364	393

De conformidad con los resultados, ambas concentraciones del caldo esterilizado por filtración derivadas de un cultivo de una nueva especie de *Burkholderia* son capaces de controlar el crecimiento de población de un insecto chupador, *M. persicae*.

5. Ejemplo 5. Actividad Nematocida

5.1 Estudio #1

Para valorar el efecto de caldo de cultivo de *Burkholderia* sp A396 esterilizado por filtración en la motilidad (y recuperación subsecuente) de nemátodos del nódulo de la raíz juveniles (J2) (*Meloidogyne incognita* VW6), se condujo la siguiente prueba en placas de cultivo de células de plástico de 24 cavidades:

Una alícuota de 300-ul de cada solución de prueba (ya sea 1x o 0.5x de caldo esterilizado por filtración) se agrega en cavidades apropiadas después de lo cual, quince nemátodos dispensados en 10 µl de agua DI se agregan en cada cavidad, la placa se cierra con una tapa, e incuba a 25°C por 24 horas. Se usan agua y Avid a dilución de 20,000x como controles negativos y positivos, respectivamente. El efecto de cada compuesto en la movilidad del nemátodo se verifica después de 24 horas probando cada nemátodo con una aguja, y la proporción de nemátodos móviles en cada tratamiento se registró en una libreta de notas usando una escala en %. Para valorar la recuperación de movilidad en cada tratamiento, un volumen de 200 ml se remueve de cada cavidad, y la solución restante en cada cavidad se diluye agregando 2 mL de agua DI. Las placas son nuevamente incubadas por 24 horas como se describe arriba, después de lo cual se realiza la segunda evaluación de movilidad.

Los resultados presentados en la Figura 6 muestran que el caldo esterilizado por filtración a ambas concentraciones de prueba puede inmovilizar los nemátodos de vida libre juveniles del nódulo de la raíz. Este efecto dura al menos por 24-horas, lo cual sugiere que el caldo de Burkholderia A396 se puede usar para prevenir plantas de infección de nemátodos.

5.2 Estudio #2

Materiales y Métodos

Prueba de Mini Empapado: Caldo celular completo de *Burkholderia A396* se prueba en un ensayo de invernadero conducido en macetas de 45 ml. Semillas de pepino contra Toshka se muestran directamente en macetas llenas con un suelo franco arenoso. Diez días después, las macetas fueron cada una tratadas con 5 ml de una suspensión. Cantidades específicas usadas se muestran en la Tabla 9:

Tabla 9

Compuestos	Cepa A396 de *Burkholderia* Fostiazato (Estándar, EC 150) (control pos)
especies de prueba	*Meloidogyne sp.* Aplicado a 3000 huevos por mini maceta mini empapada (en 2 ml)
plantas de prueba	*Cucumis sativus* (pepino cv. Toschka)
formulación de prueba	100% de formulación líquida
concentración de prueba	100, 50, 25, 12.5, 6, 3, 1.5 ml/L
aplicación de prueba	aplicación de humedad

Como se indica en la Tabla 9, las macetas son inoculadas con 3000 huevos de *M. incognita*. Cuatro réplicas se prepararon para cada tratamiento y relación. El ensayo se

recolectó catorce días después de la aplicación del ensayo e inoculación. El agallamiento de la raíz se valoró de conformidad con el índice de agallamiento Zeck (Zeck, 1971). La fitotoxicidad se midió como una reducción de agallamiento de la raíz en comparación con el control. Los resultados se muestran en las Figuras 9 y 10.

En la *Prueba de Mini Empapado no. 1* (véase Figura 9), la actividad del tratamiento fue muy alta y una reducción de al menos 100% se observó cuando se aplicó a una concentración de 100 ml/L de *Burkholderia A396*. El fostiazato funcionó como es usual (100% de control a 20 ppm).

En la Prueba de Mini Empapado no. 2 (véase Figura 10) se observó 100% de reducción de agallamiento de la raíz a la concentración más alta de 100 ml/L cayendo a aproximadamente 50% a 1.5 ml/L. El fostiazato funcionó como es usual (100% de control a 20 ppm).

5.3 Estudio #3

Para demostrar la actividad nematicida de *Burkholderia A396*, se realizó un estudio de invernadero en pepino (*Cucumis sativus*) usando un caldo celular completo de *Burkholderia A396* como el producto de prueba para controlar nemátodos nodulares de la raíz (*Meloidogyne incognita*). Una planta de pepino por maceta se panta en el suelo y se hace crecer en un invernadero bajo luces artificiales a 28°C. Cada maceta con una planta es tratada con una alícuota (aproximadamente 80 mL) de ya sea el producto de prueba no diluido o un producto de prueba diluido a 5% con agua. Cada tratamiento de *Burkholderia* A396 así como también un tratamiento de control positivo con Temik (en una relación de etiqueta) y un control negativo sin adiciones consiste de cinco

réplicas. Las plantas se hacen crecer en un invernadero por 60 días, después de lo cual cada planta se recolectó y evaluó por pesos de raíz y brotes frescos. El número de huevos de nemátodos en cada maceta se registró y se calculó un parámetro que indica el número de huevos por un gramo de masa de raíz. Se realizó análisis estadístico (ANOVA), y se calculó la diferencia estadística entre medios de tratamiento a $p<0.1$. Los datos presentados en la Tabla 10 abajo muestran que aún aunque no fue estadísticamente diferente del control no tratado, las macetas tratadas con caldo celular completo de A396 contienen menos huevos de nemátodos que las macetas de control no tratadas. El efecto calculado como número de huevos por masa de raíz es más claro cuando se usa caldo no diluido como un tratamiento.

Tabla 10. El efecto de caldo celular completo A396 en el peso de raíz y brotes de pepino, número total de huevos de *M. incognita* por maceta y el número de huevos por gramo de masa de raíz.

	peso de brote fresco		peso de raíz fresco		# de huevos		# de huevos/g de raíz	
no tratado	15.22	b	11.76	bc	67693	a	5252.0	ab
A396 5% v/v	11.89	b	6.914	c	56084	a	8419.4	a
A396 no diluido	15.66	b	11.09	bc	40463	a	3929.2	ab
Temik 15 G 5 lb/a	29.54	a	29.74	a	68907	a	2604.4	b
LSD a p < 0.1	5.34		6.9879		36509.2		3317.07	

6. Ejemplo 6. Aislamiento de Templazol A y B

Métodos y Materiales

Se usó el siguiente procedimiento para la purificación de Templazol A y B extraído de cultivo celular de *Burkholderia sp* (véase Figura 7):

El caldo de cultivo derivado de la fermentación 10-L *Burkholderia* (A396) en medio de crecimiento de soya Hy es extraído con resina Amberlite XAD-7 (Asolkar et al., 2006) sacudiendo la suspensión celular con la resina a 225 rpm por dos horas a temperatura ambiente. La resina y masa celular se recolectaron por filtración a través de una estopilla y se lavó con agua DI para remover las sales. La resina, masa celular y estopilla se empaparon entonces por 2h en acetona después de lo cual la acetona es filtrada y secada bajo vacío usando evaporador rotatorio para dar el extracto crudo. El extracto crudo es entonces dividido usando Cromatografía Líquida a vacío C18 de fase inversa (H_2O/CH_3OH; gradiente 90:20 a 0:100%) para dar 10 fracciones. Estas fracciones entonces se concentraron a sequedad usando evaporador rotatorio y los residuos secos resultantes son seleccionados para determinar actividad biológica usando ensayo de plántulas de lechuga en placas de 96 cavidades. Las fracciones activas son entonces sometidas a HPLC de fase inversa (Spectra System P4000 (Thermo Scientific) para dar compuestos puros, los cuales son entonces seleccionados en bioensayos mencionados anteriormente para localizar/identificar los compuestos activos. Para confirmar la identidad del compuesto, los datos espectroscópicos adicionales tales como LC/MS y NMR son registrados.

La fracción activa 4 se purifica además usando una columna C-18 de HPLC (Phenomenex, Luna 10u C18(2) 100 A, 250 x 30), sistema solvente de gradiente agua:acetonitrilo (0-10 min; 80% de CH_3CN acuoso, 10-25 min; 80-65% de CH_3CN acuoso, 25-50 min; 65-50% de CH_3CN acuoso, 50-60 min; 50-70% de CH_3CN, 60-80 min; 70-0% de CH_3CN acuoso, 80-85 min; 0-20% de CH_3CN acuoso) a 8 mL/min

de velocidad de flujo y detección UV de 210 nm, para dar templazol B, tiempo de retención 46.65 min. La otra fracción activa 6 también se purifica usando una columna C-18 de HPLC (Phenomenex, Luna 10u C18(2) 100 A, 250 x 30), sistema solvente de gradiente agua:acetonitrilo (0-10 min; 80% de CH_3CN acuoso, 10-25 min; 80-60% de CH_3CN acuoso, 25-50 min; 60-40% de CH_3CN acuoso, 50-60 min; 40% de CH_3CN, 60-80 min; 40-0% de CH_3CN acuoso, 80-85 min; 0-20% de CH_3CN acuoso) a 8 mL/min de velocidad de flujo y detección UV de 210 nm, para dar templazol A, tiempo de retención 70.82 min.

Análisis de Espectroscopia de Masas de compuestos puros se realiza en un instrumento de electrorrocío Thermo Finnigan LCQ Deca XP Plus (ESI) usando modos de ionización tanto positivos como negativos en un modo de exploración completo (m/z 100-1500 Da) en un Espectrómetro de Masas LCQ DECA XP^{plus} (Thermo Electron Corp., San Jose, CA). Instrumento de Cromatografía Líquida de Alta Presión Thermo equipado con un detector Finnigan Surveyor PDA plus, automuestreador plus, bomba MS y una columna de 5 µm 4.6 mm x 100 mm Luna C18 (Phenomenex). El sistema solvente consiste de agua (solvente A) y acetonitrilo (solvente B). La fase móvil comienza a 10% de solvente B y se incrementa linealmente a 100% de solvente B durante 20 min y después se mantiene por 4 min, y finalmente se regresa a 10% de solvente B durante 3 min y se mantiene por 3 min. La velocidad de flujo es 0.5 mL/min. El volumen de inyección fue 10 µL y las muestras se mantuvieron a temperatura ambiente en un automuestreador. Los compuestos se analizaron por LC-MS utilizando la cromatografía de fase inversa y LC. El análisis de espectroscopia de masas de los presentes compuestos se realiza bajo las siguientes condiciones:

La velocidad de flujo del gas de nitrógeno se fija a 30 y 15 arb para la vaina y aux/velocidad de flujo de barrido de gas, respectivamente. Se realizó ionización por electrorrocío con un voltaje atomizador ajustado a 5000 V y un voltaje capilar a 35.0 V. La temperatura capilar se ajustó a 400°C. El dato se analizó un software Xcalibur. El compuesto activo templazol A tiene una masa molecular de 298 y mostró ión *m/z* a 297.34 en modo de ionización negativo. El cromatograma de LC–MS para templazol B sugiere una masa molecular de 258 y exhibe ión *m/z* a 257.74 en modo de ionización negativo.

Los espectros ^{1}H, ^{13}C y 2D NMR se midieron en un espectrómetro de campo gradiente Bruker de 500 MHz y 600 MHz. La referencia se ajusta en el tetrametilsilano estándar interno (TMS, 0.00 ppm).

Para elucidar la estructura de templazol A, el compuesto purificado con un peso molecular 298 es además analizado usando un instrumento NMR de 500 MHz, y tiene ^{1}H NMR valores δ a 8.44, 8.74, 8.19, 7.47, 7.31, 3.98, 2.82, 2.33, 1.08 y tiene ^{13}C NMR con valores δ de 163.7, 161.2, 154.8, 136.1, 129.4, 125.4, 123.5, 123.3, 121.8, 121.5, 111.8, 104.7, 52.2, 37.3, 28.1, 22.7, 22.7. El Templazol A tiene bandas de absorción UV a 226, 275, 327 nm, lo cual sugiere la presencia de anillos indol y oxazol. La fórmula molecular, $C_{17}H_{18}N_2O_3$, es como se determina por interpretación de datos ^{1}H, ^{13}C NMR y HRESI MS *m/z* 299.1396 $(M+H)^+$ (Calcd para $C_{17}H_{19}N_2O_3$, 299.1397), lo cual implica un alto grado de insaturación se mostró por 10 equivalentes de enlace doble. El espectro ^{13}C NMR reveló señales para los 17 carbonos, que incluyen dos metilos, un metoxi, un carbono de metileno, una metina alifática, un éster de carbonilo, y once

carbonos aromáticos. La presencia de indol 3'-sustituido se reveló de los datos espectrales ^{1}H-^{1}H COSY y HMBC. El ^{1}H-^{1}H COSY y HMBC también indica la presencia de un grupo de éster metílico del ácido carboxílico y una cadena lateral $-CH_2-CH-(CH_3)_2$. Del análisis detallado de los datos ^{1}H-^{1}H COSY, ^{13}C, y HMBC se deriva que el compuesto contiene un núcleo oxazol. Del análisis 2D se encontró que la cadena lateral iso-butilo se unió en la posición C-2, un éster metílico del ácido carboxílico en la posición C-4 y la unidad indol en la posición C-5 para dar templazol A.

El segundo compuesto herbicidamente activo, templazol B, con un peso molecular 258 es además analizado usando un instrumento NMR de 500 MHz, y tiene ^{1}H NMR valores δ a 7.08, 7.06, 6.75, 3.75, 2.56, 2.15, 0.93, 0.93 y ^{13}C NMR con valores de δ 158.2, 156.3, 155.5, 132.6, 129.5, 129.5, 127.3, 121.8, 115.2, 115.2, 41.2, 35.3, 26.7, 21.5, 21.5. La fórmula molecular, es asignada como $C_{15}H_{18}N_2O_2$, la cual es determinada por interpretación de ^{1}H, ^{13}C NMR y datos de masa. El espectro ^{13}C NMR reveló señales para todos los 15 carbonos, que incluyen dos metilos, dos carbonos de metileno, una metina alifática, una amida carbonilo, y nueve carbonos aromáticos. La naturaleza general de la estructura se deduce del espectro ^{1}H y ^{13}C NMR que mostró un anillo *para*-aromático sustituido [δ 7.08 (2H, d, *J* = 8.8 Hz), 6.75 (2H, d, *J* = 8.8 Hz), y 132.7, 129.5, 115.2, 127.3, 115.2, 129.5]. El espectro de ^{1}H NMR de esta estructura junto con el espectro ^{1}H-^{1}H COSY y HSQC, que exhibe señales características para una porción isobutilo [δ 0.93 (6H, d, *J* = 6.9 Hz), 2.15 (1H, sept., *J* = 6.9 Hz), 2.57 (2H, d, *J* = 6.9 Hz). Además, un protón olefínico/aromático a (δ 7.06, s), y un grupo carbono de carbonilo (δ 158.9) se encontraron también en el espectro ^{1}H y ^{13}C

NMR. En la inspección del espectro de HMBC, la señal H-1' en la porción isobutilo se correlaciona con el carbono olefínico (C-2, δ 156.3), y el protón olefínico H-4 se correlaciona con (C-5, δ 155.5; C-2, 156.3 & C-1'', 41.2). La señal de metileno a δ 3.75 se correlaciona con C-5, C-4 así como también el C-2'' de la porción aromática para-sustituida. Todas estas correlaciones observadas sugieren la conectividad entre el isobutilo, y las porciones bencilo para-sustituidas para el esqueleto de la estructura como se muestra. Además, el grupo carboxamida es asignado a la posición para de la porción bencilo con base en la correlación HMBC del protón aromático en la posición H-4''& H-6''. De este modo, con base en los datos anteriores, la estructura se diseñó como templazol B.

7. Ejemplo 7. aislamiento de FR90128

El caldo celular completo de la fermentación de *Burkholderia sp.* En un medio de crecimiento no definido es extraído con resina Amberlite XAD-7 (Asolkar et al., 2006) sacudiendo la suspensión celular con resina a 225 rpm por dos horas a temperatura ambiente. La resina y masa celular se recolectaron por filtración a través de una estopilla y lavaron con agua DI para remover las sales. La resina, masa celular y estopilla se remojaron entonces por 2 h en acetona después de lo cual la acetona se filtró y secó bajo vacío usando evaporador rotatorio para dar el extracto crudo. El extracto crudo es entonces fraccionado usando cromatografía líquida a vacío C18 de fase inversa (H_2O/CH_3OH; gradiente 90:20 a 0:100%) para dar 10 fracciones. Estas fracciones son entonces concentradas a sequedad usando evaporador rotatorio y los residuos secos resultantes son seleccionados por actividad biológica usando tanto bioensayos de

insectos así como también bioensayos herbicidas. Las fracciones activas son entonces sometidas a HPLC de fase inversa/normal (Spectra System P4000; Thermo Scientific) para dar compuestos puros, los cuales son entonces seleccionados en bioensayos herbicidas, insecticidas y nematicidas descritos abajo para localizar/identificar los compuestos activos. Para confirmar la identidad del compuesto, se registraron datos espectroscópicos adicionales tales como LC/MS y NMR.

El análisis de espectroscopia de masas de picos activos se realiza en un instrumento de electrorrocío Thermo Finnigan LCQ Deca XP Plus (ESI) usando modos de ionización tanto positivos como negativos en un modo de exploración completo (m/z 100-1500 Da) en un Espectrómetro de masas LCQ DECA XP^{plus} (Thermo Electron Corp., San Jose, CA). Instrumento de Cromatografía Líquida de Alta Presión Thermo equipado con un detector Finnigan Surveyor PDA plus, automuestreador plus, bomba MS y una columna de 5 µm 4.6 mm x 100 mm Luna C18 (Phenomenex). El sistema solvente consiste de agua (solvente A) y acetonitrilo (solvente B). La fase móvil comienza a 10% de solvente B y se incrementa linealmente a 100% de solvente B durante 20 min y después se mantiene por 4 min, y finalmente se regresa a 10% de solvente B durante 3 min y se mantiene por 3 min. La velocidad de flujo es 0.5 mL/min. El volumen de inyección es 10 µL y las muestras se mantuvieron a temperatura ambiente en un automuestreador. Los compuestos se analizaron por LC-MS utilizando la cromatografía de fase inversa y LC. El análisis de espectroscopia de masas de los presentes compuestos se realiza bajo las siguientes condiciones: La velocidad de flujo del gas de nitrógeno se fija a 30 y 15 arb para la vaina y aux/velocidad de flujo de barrido de gas,

respectivamente. Se realiza ionización de electrorrocío con un voltaje atomizador ajustado a 5000 V y un voltaje capilar a 35.0 V. La temperatura capilar se ajusta a 400°C. Los datos se analizan en software Xcalibur. Con base en el análisis de LC-MS, el compuesto insecticida activo de la fracción 5 tiene una masa molecular de 540 en modo de ionización negativo.

Para elucidar la estructura, el compuesto insecticida purificado de la fracción 5 con peso molecular de 540 es además analizado usando un instrumento NMR de 500 MHz, y tiene ^{1}H NMR valores a 6.22, 5.81, 5.69, 5.66, 5.65, 4.64, 4.31, 3.93, 3.22, 3.21, 3.15, 3.10, 2.69, 2.62, 2.26, 2.23. 1.74, 1.15, 1.12, 1.05, 1.02; y tiene ^{13}C NMR con valores de 172.99, 172.93, 169.57, 169.23, 167.59, 130.74, 130.12, 129.93, 128.32, 73.49, 62.95, 59.42, 57.73, 38.39, 38.00, 35.49, 30.90, 30.36, 29.26, 18.59, 18.38, 18.09, 17.93, 12.51. Los datos de NMR indican que el compuesto contiene grupos amino, éster, ácido carboxílico, metilo alifático, etilo, metileno, oximetileno, metina, oximetina y azufre. El análisis NMR 1D y 2D detallado confirma la estructura para el compuesto tan FR90128 como un compuesto conocido.

8. Ejemplo 8. Actividad herbicida de FR90128

La actividad herbicida del compuesto activo FR90128 (MW 540) se probó en un ensayo de laboratorio usando plántulas de Pasto Pata de Gallo (*Echinochloa crus-galli*) de una semana en una plataforma de placa de 96 cavidades. Se colocó una plántula de pasto en cada una de las cavidades que contiene 99 microlitros de agua DI. Una alícuota de microlitros del compuesto puro en etanol (10 mg/mL) se agrega en cada cavidad, y la placa se sella con una tapa. Un microlitro de etanol en 99 microlitros de agua se usa como un control negativo. Los tratamientos se hacen en ocho

réplicas, y la placa sellada se incuba en un invernadero bajo luces artificiales (ciclo de 12 horas de luz/oscuridad). Después de cinco días, se leen los resultados. Las plántulas de pasto en todas las ocho cavidades que reciben el compuesto activo se leen sin dejar tejido verde, mientras las plántulas en las cavidades de control negativo se hicieron crecer activamente.

9. Ejemplo 9. Actividad insecticida de FR90128

La actividad insecticida del compuesto activo FR90128 (MW 540) se probó en un ensayo de laboratorio usando un sistema de bioensayo de contacto. El compuesto es disuelto en 100% de etanol a concentraciones de 0.001, 0.005, 0.01, 0.025, 0.05, 0.1, 0.25, y 0.5 µg/µL. Larvas individuales del tercer estadio temprano del Gusano soldado de la remolacha, *Spodoptera exigua*, se colocaron en tazas de plástico 1.25 onzas (35.52 mililitros) con una pieza de 1 cm^2 de dieta artificial (Bio-Serv). Se usa una Micropipeta Hamilton para aplicar 1 µL del compuesto al tórax de cada larva. Las tazas son cubiertas con película de parafina estirada y un agujero único se corta en la película de parafina para aireación. Se trataron diez larvas por concentración. El ensayo se incuba a 25°C, 12h luz/12h oscuridad. Las larvas se registran a 48 y 72 horas después de la aplicación. Se realiza análisis probit para valorar el valor LC_{50} el cual se encuentra para el compuesto (MW 540) como 0.213.

10. Ejemplo 10. Aislamiento de Templamida A, B, FR901465 y FR90128

Métodos y Materiales

Se usa el siguiente procedimiento para la purificación de compuestos extraídos del cultivo celular de *Burkholderia sp* (véase Figura 7):

El caldo de cultivo derivado de la fermentación 10-L de *Burkholderia* (A396) en medio de crecimiento de soya Hy es extraído con resina Amberlite XAD-7 (Asolkar et al., 2006) sacudiendo la suspensión celular con resina a 225 rpm por dos horas a temperatura ambiente. La resina y masa celular se recolectaron por filtración a través de una estopilla y lavaron con agua DI para remover las sales. La resina, masa celular y estopilla se remojaron entonces por 2 h en acetona después de lo cual la acetona se filtró y secó bajo vacío usando evaporador rotatorio para dar el extracto crudo. El extracto crudo es entonces fraccionado usando cromatografía líquida a vacío C18 de fase inversa (H_2O/CH_3OH; gradiente 90:20 a 0:100%) para dar 10 fracciones. Estas fracciones son entonces concentradas a sequedad usando evaporador rotatorio y los residuos secos resultantes son seleccionados por actividad biológica usando plántulas de lechuga en placa de 96 cavidades (herbicida) y ensayo de 3er. estadio temprana del Gusano soldado de la remolacha (insecticida). Las fracciones activas son entonces sometidas repetidamente para separación de HPLC por fase inversa (Spectra System P4000 (Thermo Scientific) para dar compuestos puros, los cuales son entonces seleccionados en bioensayos mencionados anteriormente para localizar/identificar los compuestos activos. Para confirmar la identidad del compuesto, se registraron datos espectroscópicos adicionales tales como LC/MS, HRMS y NMR.

La fracción activa 5 se purifica además usando una columna C-18 de HPLC (Phenomenex, Luna 10u C18(2) 100 A, 250 x 30), sistema solvente de gradiente agua:acetonitrilo (0-10 min; 80% de CH_3CN acuoso, 10-25 min; 80-65% de CH_3CN acuoso, 25-50 min; 65-50% de CH_3CN acuoso, 50-60 min; 50-70% de CH_3CN acuoso, 60-80

min; 70 – 0% de CH_3CN acuoso, 80–85 min; 0 – 20% de CH_3CN acuoso) a 8 mL/min de velocidad de flujo y detección UV de 210 nm, para dar templamida A, tiempo de retención 55.64 min y FR901465, tiempo de retención 63.59 min y FR90128, tiempo de retención 66.65 min respectivamente. La otra fracción activa 6 también se purifica usando una columna C–18 de HPLC (Phenomenex, Luna 10u C18(2) 100 A, 250 x 30), sistema solvente de gradiente agua:acetonitrilo (0–10 min; 70–60% de CH_3CN acuoso, 10–20 min; 60–40% de CH_3CN acuoso, 20–50 min; 40–15% de CH_3CN acuoso, 50–75 min; 15–0% de CH_3CN, 75–85 min; 0–70% de CH_3CN acuoso) a 8 mL/min de velocidad de flujo y detección UV de 210 nm, para dar templamida B, tiempo de retención 38.55 min.

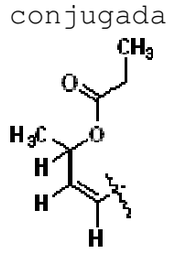
El análisis de espectroscopia de masas de compuestos puros se realiza en un instrumento de electrorrocío Thermo Finnigan LCQ Deca XP Plus (ESI) usando modos de ionización tanto positivos como negativos en un modo de exploración completo (*m/z* 100–1500 Da) en un Espectrómetro de Masas LCQ DECA XP^{plus} (Thermo Electron Corp., San Jose, CA). Se usan un Instrumento de Cromatografía Líquida de Alta Presión Thermo equipado con un detector Finnigan Surveyor PDA plus, automuestreador plus, bomba MS y una columna de 5 µm 4.6 mm x 100 mm Luna C18 (Phenomenex). El sistema solvente consiste de agua (solvente A) y acetonitrilo (solvente B). La fase móvil comienza a 10% de solvente B y se incrementa linealmente a 100% de solvente B durante 20 min y después se mantiene por 4 min, y finalmente regresa a 10% de solvente B durante 3 min y se mantiene por 3 min. La velocidad de flujo es 0.5 mL/min. El volumen de inyección es 10 µL y las muestras se mantuvieron a temperatura ambiente en un automuestreador. Los compuestos se analizaron por LC–MS

utilizando la cromatografía de fase inversa y LC. El análisis de espectroscopia de masas de los presentes compuestos se realiza bajo las siguientes condiciones: La velocidad de flujo del gas de nitrógeno se fija a 30 y 15 arb para la vaina y aux/velocidad de flujo de barrido de gas, respectivamente. Se realiza ionización de electrorrocío con un voltaje atomizador ajustado a 5000 V y un voltaje capilar a 45.0 V. La temperatura capilar se ajusta a 300°C. Los datos se analizan en software Xcalibur. El compuesto activo templamida A tiene una masa molecular de 555 con base en el pico *m/z* a 556.41 $[M + H]^+$ y 578.34 $[M + Na]^+$ en modo de ionización positiva. El análisis de LC/MS en ionización en modo positivo para templamida B sugiere una masa molecular de 537 con base en iones *m/z* a 538.47 $[M + H]^+$ y 560.65 $[M + Na]^+$. El peso molecular para los compuestos FR901465 y FR90128 se asigna como 523 y 540 respectivamente con base en el análisis de LCMS.

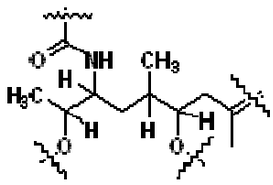
Los espectros ^1H, ^{13}C y 2D NMR se miden en un espectrómetro de campo gradiente Bruker de 600 MHz. La referencia se ajusta en el tetrametilsilano estándar interno (TMS, 0.00 ppm).

Para elucidar la estructura de templamida A, el compuesto purificado con peso molecular de 555 es además analizado usando un instrumento NMR de 600 MHz, y tiene ^1H NMR valores δ a 6.40, 6.39, 6.00, 5.97, 5.67, 5.54, 4.33, 3.77, 3.73, 3.70, 3.59, 3.47, 3.41, 2.44, 2.35, 2.26, 1.97, 1.81, 1.76, 1.42, 1.37, 1.16, 1.12, 1.04 y tiene ^{13}C NMR con valores de δ 173.92, 166.06, 145.06, 138.76, 135.71, 129.99, 126.20, 123.35, 99.75, 82.20, 78.22, 76.69, 71.23, 70.79, 70.48, 69.84, 60.98, 48.84, 36.89, 33.09, 30.63, 28.55, 25.88, 20.37, 18.11, 14.90, 12.81, 9.41. El espectro de ^{13}C NMR exhibe 28 señales de carbono discretas las cuales son atribuidas a seis metilos, cuatro

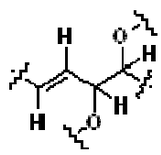
metileno carbonos, y trece metinas que incluyen cinco *sp*^{2}, cuatro carbonos cuaternarios. La fórmula molecular, $C_{28}H_{45}NO_{10}$, es determinada por interpretación de datos ^1H, ^{13}C NMR y HRESI MS. El análisis detallado de datos espectrales ^1H-^1H COSY, HMBC y HMQC revela las siguientes estructuras (I–IV) y dos grupos metileno aislados y metilo único. Estas subestructuras son conectadas después usando la correlación clave HMBC para dar las estructuras más plana para el compuesto, las cuales no han sido aún reportadas en la literatura y se designan como templamida A. Esta molécula de policétido contiene dos anillos tetrahidropiranosa, y una amida conjugada.



I



II



III



IV

Las subestructuras I–IV son asignadas por análisis de datos espectroscópicos de NMR 1D y 2D.

El análisis (+) ESIMS para el segundo compuesto herbicida, muestra iones *m/z* a 538.47 $[M + H]^+$ y 560.65 $[M + Na]^+$ que corresponden al peso molecular de 537. La fórmula molecular de $C_{28}H_{43}NO_9$ se determina por interpretación del análisis de datos ESIMS y NMR. El ^1H y ^{13}C NMR de este compuesto es similar a aquel de templamida A excepto que aparece un nuevo aislado de $-CH_2-$ en lugar del grupo metileno no acoplado en templamida A. La constante de acoplamiento germinal pequeña de 4.3 Hz es característica de la presencia de un grupo metileno epóxido. La presencia de este epóxido además se confirma a partir del cambio de ^{13}C NMR de 60.98 en templamida A a 41.07 en el compuesto con MW 537. La diferencia molecular de la fórmula entre estos dos

compuestos es razonablemente explicada por eliminación de la molécula de agua seguida por formación de epóxido. De este modo, con base en el análisis de base NMR y MS, se asigna la estructura para el nuevo compuesto y se designa como templamida B.

Para elucidar la estructura, el compuesto purificado de la fracción 5 con peso molecular de 523 es además analizado usando un instrumento NMR de 600 MHz, y tiene ^{1}H NMR valores δ a 6.41, 6.40, 6.01, 5.98, 5.68, 5.56, 4.33, 3.77, 3.75, 3.72, 3.65, 3.59, 3.55, 3.50, 2.44, 2.26, 2.04, 1.96, 1.81, 1.75, 1.37, 1.17, 1.04; y tiene ^{13}C NMR con valores δ de 172.22, 167.55, 144.98, 138.94, 135.84, 130.14, 125.85, 123.37, 99.54, 82.19, 78.28, 76.69, 71.31, 70.13, 69.68, 48.83, 42.52, 36.89, 33.11, 30.63, 25.99, 21.20, 20.38, 18.14, 14.93, 12.84. El análisis detallado de ^{1}H y ^{13}C NMR del compuesto sugiere que este compuesto fue casi similar al compuesto templamida B; la única diferencia fue en la cadena lateral de éster; una porción de acetato estuvo presente en lugar de una porción de propionato en la cadena lateral. El análisis NMR 1D y 2D detallado confirma la estructura para el compuesto como FR901465 como un compuesto conocido.

Con base en el análisis de LC-MS, el otro compuesto de la fracción 5 tiene una masa molecular de 540 en modo de ionización negativo. Para elucidar la estructura, el compuesto purificado de la fracción 5 con peso molecular de 540 es además analizado usando un instrumento NMR de 500 MHz, y tiene ^{1}H NMR valores δ a 6.22, 5.81, 5.69, 5.66, 5.65, 4.64, 4.31, 3.93, 3.22, 3.21, 3.15, 3.10, 2.69, 2.62, 2.26, 2.23. 1.74, 1.15, 1.12, 1.05, 1.02; y tiene ^{13}C NMR con valores de 172.99, 172.93, 169.57, 169.23, 167.59, 130.74, 130.12, 129.93, 128.32, 73.49, 62.95, 59.42, 57.73, 38.39, 38.00, 35.49, 30.90, 30.36, 29.26, 18.59,

18.38, 18.09, 17.93, 12.51. Los datos de NMR indican que el compuesto contiene grupos amino, éster, ácido carboxílico, metilo alifático, etilo, metileno, oximetileno, metina, oximetina y azufre. El análisis NMR 1D y 2D detallado confirma la estructura para el compuesto como FR90128 como un compuesto conocido.

11. Ejemplo 11. Actividad herbicida de Templamida A, Templamida B, FR901465 y FR90128

La actividad herbicida de templamida A, B, FR901465 y FR90128 se prueba en un ensayo de laboratorio usando plántulas de Pasto Pata de Gallo (*Echinochloa crus-galli*) y lechuga (*Lactuca sativa* L.) de una semana en una plataforma de placa de 96 cavidades. Una plántula se coloca en cada una de las cavidades que contienen 99 microlitros de agua DI. En cada cavidad, a una alícuota de microlitros del compuesto puro en etanol (10 mg/mL) se agrega, y la placa se sella con una tapa. Un microlitro de etanol en 99 microlitros de agua se usa como un control negativo. Los tratamientos se hacen en ocho réplicas, y la placa sellada se incuba en un invernadero bajo luces artificiales (ciclo de 12 horas de luz/oscuridad). Después de cinco días, se leen los resultados. Las plántulas de pasto en todas las ocho cavidades que reciben el compuesto activo se leen sin dejar tejido verde, mientras las plántulas en las cavidades de control negativo se hacen crecer activamente. La actividad herbicida de templamida A contra plántulas de lechuga es ligeramente inferior que para el pasto. Por otro lado, la templamida B proporciona un mejor control (100%) de plántulas de lechuga (usadas como un sistema modelo para malezas de hoja ancha) que la templamida A (Tabla 11).

Tabla 11: Datos de Bioensayos herbicidas para Templamida A, B,

FR901465 y FR90128

Compuestos[1]	Plántulas de pasto (% de mortalidad)	Plántulas de lechuga (% de mortalidad)
Templamida A	100	88
Templamida B	0	75
FR901465	88	100
FR90128	100	88
Control	0	0

[1]10 µg/mL de concentración por cavidad

12. Ejemplo 12. Actividad insecticida de active compuestos

La actividad insecticida de templamida A, B, FR901465 y FR90128 se probó en un ensayo de laboratorio usando un ensayo de sobre posición de dieta de 96 cavidades con larvas de 1er estadio de Gusano soldado de la remolacha usando placas microtituladoras con 200 µl de dieta sólida artificial para Gusano soldado de la remolacha en cada cavidad. Cien (100) µl de cada muestra de prueba se pipetearon en la parte superior de la dieta (una muestra en cada cavidad), y la muestra se dejó secar bajo flujo de aire hasta que la superficie se seca. Cada muestra se probó en seis réplicas, y agua y producto comercial de Bt (*B. thuringiensis*) se usan como controles negativos y positivos, respectivamente. Una larva de primer estadio del insecto de prueba (Gusano soldado de la remolacha – *Spodoptera exiqua)* se colocó en cada cavidad, y la placa se cubrió con cubierta de plástico con agujeros de aire. Las placas con insecto se incubaron a 26°C por 6 días con evaluaciones de mortalidad diarias. Con base en los resultados presentes en la Tabla 12, templamida A y B resultan en 40% y 80% de mortalidad, respectivamente.

Tabla 12: Datos de Bioensayo Insecticida para Templamida A, B, FR901465 y FR90128 contra 1er. estadio de Gusano Soldado de la Remolacha (*Spodoptera exigua*)

Compuestos[1]	(% de mortalidad)
Templamida A	40
Templamida B	80
FR901465	50
FR90128	90
Bt	100
Control	0

[1]10 µg/mL de concentración por cavidad

Ejemplo 11. Actividad fungicida de FR90128 (MW 540)

La actividad fungicida de FR90128 (MW 540) contra tres hongos patogénicos de planta (*Botrytis cinerea, Phytophtora* sp., *Monilinia fructicola*) se probó en un ensayo de placa de PDA (agar de dextrosa de papa) *in vitro*. Las placas son inoculadas en el hongo usando un método de obturación. Después que los hongos se han establecido y comenzado a crecer en el medio de crecimiento, se colocan ocho discos de papel filtro estériles en cada placa de aproximadamente 1 cm desde el borde en un círculo. Diez microlitros de solución de etanol que contienen 20, 15, 10, 7.5, 5, 2.5 1.25 mg FR90128/mL se agregan en los discos de papel filtro, y la solución se deja evaporar. Un disco empapado con 10 mL de etanol puro se usa como un control negativo. El ensayo se hace con tres réplicas. Las placas se incuban a temperatura ambiente por 5 días, después de lo cual la actividad fungicida se registra midiendo la zona de inhibición alrededor de cada disco de papel filtro que corresponden a diferentes concentraciones de FR90128. De conformidad con los resultados, FR90128 no tiene efecto en el crecimiento de *Monilinia* pero es efectivo en controlar el crecimiento de hifas de tanto *Botrytis* y *Phytophtora*. Parece haber una clara respuesta de dosis en inhibición con concentraciones umbrales de 10 mg/mL y 1.25 mg/mL para *Botrytis* y *Phytophtora*, respectivamente (Figura 8).

DEPÓSITO DE MATERIAL BIOLÓGICO

El siguiente material biológico ha sido depositado bajo los términos del Tratado de Budapest con la Colección de Cultivos de Investigación Agrícola (NRRL), 1815 N. University Street, Peoria, Illinois 61604 USA, y proporciona el siguiente número:

Depósito	Número de Acceso	Fecha del Depósito
Burkholderia sp A396	NRRL B-50319.	15 Septiembre 2009

La cepa se ha depositado bajo condiciones que aseguran que el acceso al cultivo estará disponible durante la tramitación de esta solicitud de patente a una determinada por el Comisionado de Patentes y Marcas para tener derecho a la misma bajo el C37 C.F.R. §1.14 y 35 U.S.C. § 122. El depósito representa un cultivo sustancialmente puro de la cepa depositada. El depósito está disponible como se requiere por las leyes de patente extranjera en países donde las contrapartes de la solicitud objeto, o su progenie son presentadas. Sin embargo, se debe entender que la disponibilidad de un depósito no constituye una licencia para practicar la invención objeto en la derogación de derechos de patente otorgados por la acción gubernamental.

La invención descrita y reivindicada en la presente no está siendo limitada en alcance por los aspectos específicos aquí descritos, puesto que estos aspectos están propuestos como ilustraciones de varios aspectos de la invención. Cualesquiera aspectos equivalentes están propuestos para estar dentro del alcance de esta invención. Sin embargo, varias modificaciones de la invención además de aquellas mostradas y descritas en la presente llegarán a ser aparentes para aquellos expertos en la técnica a partir de la descripción mencionada anteriormente. Tales modificaciones también están propuestas para caer dentro

del alcance de las reivindicaciones adjuntas. En el caso de conflicto, la presente descripción incluyendo definiciones regirán.

Se citan varias referencias en la presente, las descripciones de las cuales están incorporadas por referencia en sus totalidades.

LITERATURA CITADA

Anderson, et al. "The structure of thiostrepton," Nature 225: 233-235. 1970.

Andra, "Endotoxin-like properties of a rhamnolipid exotoxin from *Burkholderia (Pseudomonas) plantarii*: immune cell stimulation and biophysical characterization." Biol. Chem. 387: 301-310. 2006.

Arena, et al. "The mechanism of action of avermectins in *Caenorhabditis elegans* - correlation between activation of glutamate-sensitive chloride current, membrane binding and biological activity." J Parasitol. 81: 286-294. 1995.

Asolkar, et al., "Weakly cytotoxic polyketides from a marine-derived Actinomycete of the genus *Streptomyces* strain CNQ-085." J. Nat. Prod. 69:1756-1759. 2006.

Burkhead, et al., "Pyrrolnitrin production by biological control agent *Pseudomonas cepacia* B37w in culture and in colonized wounds of potatoes." Appl. Environ. Microbiol. 60: 2031-2039. 1994.

Burkholder, W. H "Sour skin, a bacterial rot of onion bulbs." Phytopathology 40: 115-117. 1950.

Caballero-Mellado et al., "*Burkholderia unamae* sp. nov., an N2-fixing rhizospheric and endophytic species." Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 54: 1165-1172. 2004.

Cashion et al. “Rapid method for base ratio determination of bacterial DNA.” Anal. Biochem. 81: 461-466. 1977.

Casida, et al., US Patent No. 6,689,357.

Chen et al., “*Burkholderia nodosa* sp. nov., isolated from root nodules of the woody Brazilian legumes *Mimosa bimucronata* and *Mimosa scabrella* “ Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 57: 1055-1059. 2007.

Cheng, A. C. and Currie, B. J. “Melioidosis: epidemiology, pathophysiology, and management.” Clin. Microbiol. 18: 383-416. 2005.

Coenye, T. and P. Vandamme, P. “Diversity and significance of Burkholderia species occupying diverse ecological niches.” Environ. Microbiol. 5: 719-729. 2003.

Compant, et al. “Diversity and occurence of *Burkholderia* spp. in the natural environment.” FEMS Microbiol. Rev. 32: 607-626. 2008.

De Ley et al. “The quantitative measurement of DNA hybridization from renaturation rates.” Eur. J. Biochem. 12: 133-142. 1970.

Duke et al. “Natural products as sources for herbicides: current status and future trends.” Weed Res 40: 99-111. 2000.

Gerwick et al., US Patent No. 7,393,812.

Gottlieb et al., US Patent No. 4,808,207.

Gouge et al., US Patent Application Pub. No. 2003/0082147.

Guella et al. “Almazole C, a new indole alkaloid bearing an unusually 2,5-disubstituted oxazole moiety and its putative biogenetic precursors, from a Senegalese Delesseriacean

sea weed." Helv. Chim. Acta 77: 1999–2006. 1994.

Guella et al. "Isolation, synthesis and photochemical properties of almazolone, a new indole alkaloid from a red alga of Senegal." Tetrahedron. 62: 1165–1170. 2006.

Henderson, P. J. and Lardy H. A. "Bongkrekic acid. An inhibitor of the adenine nucleotide translocase of mitochondria." J. Biol. Chem. 245: 1319–1326. 1970.

Hirota et al. "Isolation of indolmycin and its derivatives as antagonists of L-tryptophan." Agri. Biol Chem. 42: 147–151. 1978.

Hu, F.-P. and Young, J. M. "Biocidal activity in plant pathogenic *Acidovorax, Burkholderia*, *Herbaspirillum, Ralstonia*, and *Xanthomonas* spp." J. Appl. Microbiol. 84: 263–271. 1998.

Huss et al. "Studies of the spectrophotometric determination of DNA hybridization from renaturation rates." System. Appl. Microbiol. 4: 184–192. 1983.

Jansiewicz, W. J. and Roitman J. "Biological control of blue mold and gray mold on apple and pear with *Pseudomonas cepacia*." Phytopathology 78: 1697–1700. 1988.

Jeddeloh et al., WO2001/055398.

Jansen et al. "Thiangazole: a novel inhibitor of HIV-1 from Polyangium Spec." Liebigs Ann. Chem. 4: 357–3359. 1992.

Jeong et al. "Toxoflavin produced by *Burkholderia glumae* causing rice grain rot is responsible for inducing bacterial wilt in many field crops." Plant Disease 87: 890–895. 2003.

Knudsen, G. R. and Spurr, J. "Field persistence and efficacy of five bacterial preparations for control of peanut leaf spot." Plant Disease 71: 442–445. 1987.

Koga-Ban et al. "cDNA sequences of three kinds of beta-

tubulins from rice." DNA Research 2: 21-26. 1995.

Koide et al. US Patent Application Pub. No. 2008/0096879.

Koyama et al. "Isolation, characterization, and synthesis of pimprinine, pimrinrthine, and pimprinaphine, metabolites of *Streptoverticillium olivoreticuli*." Agri. Biol. Chem. 45: 1285-1287. 1981.

Krieg et al. "*Bacillus thuringiensis* var. tenebrionis: Ein neuer, gegenuber Larven von Coleopteren wirksamer Pathotyp." Z. Angew. Entomol. 96:500-508. 1983.

Kunze et al. "Thiangazole, a new thiazoline antibiotic from *Polyangium* sp (Myxobacteria Production, antimicrobial activity and mechanism of action." J. Antibiot., 46: 1752-1755. 1993.

Leahy et al. "Comparison of factors influencing trichloroethylene degradation by toluene-oxidizing bacteria." Appl. Environ. Microbiol. 62: 825-833. 1996.

Lessie et al. "Genomic complexity and plasticity of *Burkholderia cepacia*." FEMS Microbiol. Lett. 144: 117-128. 1996.

Lindquist, N. et al. "Isolation and structure determination of diazonamides A and B, unusual cytotoxic metabolites from the marine ascidian *Diazona chinensis*." J. Am Chem. Soc. 113: 2303-2304. 1991.

Lorch, H et al. "Basic methods for counting microoganisms in soil and water. In Methods in applied soil microbiology and biochemistry. K. Alef and P. Nannipieri. Eds. San Diego, CA, Academic Press: pp. 146-161. 1995.

Ludovic et al. "Burkholderia diveristy and versatility: An inventory of the extracellular products." J. Microbiol.

Biotechnol. 17: 1407-1429. 2007.

Lydon, J. and Duke, S. "Inhibitors of glutamine biosynthesis." in Plant amino acids: Biochemistry and Biotechnology. B. Singh., Ed. New York, USA, Marcel Decker. pp. 445-464. 1999.

Mahenthiralingam et al. "DNA-based diagnostic approaches for identification of *Burkholderia cepacia* complex, *Burkholderia vietnamiensis*, *Burkholderia multivorans*, *Burkholderia stabilis*, and *Burkholderia cepacia* genomovars I and III." J.Clin. Microbiol. 38: 3165-3173. 2000.

Ming, L.-J. and Epperson. "Metal binding and structure-activity relationship of the metalloantibiotic peptide bacitracin." Biochemistry 91: 46-58. 2002.

Morita et al. "Biological activity of tropolone." Biol. Pharm. Bull. 26: 1487-1490. 2003.

Nagamatsu, T. "Syntheses, transformation, and biological activities of 7-azapteridine antibiotics: toxoflavin, fervenulin, reumycin, and their analogs". Recent Res. Devel. Org. Bioorg. Chem. 4: 97 -121. 2001.

Naik et al., "Pimprine, an extracellular alkaloid produced by *Streptomyces* CDRIL-312: fermentation, isolation and pharmacological activity." J. Biotech. 88: 1-10. 2001.

Nakajima et al., "Antitumor Substances, FR901463, FR901464 and FR901465. I. Taxonomy, Fermentation, Isolation, Physico-chemical Properties and Biological Activities." J. Antibiot. 49: 1196-1203. 1996.

Nakajima et al. US Patent No. 5,545,542.

Nakajima et al., "Hydantocidin: a new compound with herbicidal activity." J Antibiot. 44: 293-300. 1991.

N'Diaye, I. et al., "Almazole A and amazole B, unusual marine alkaloids of an unidentified red seaweed of the family *Delesseriaceae* from the coasts of Senegal." Tet Lett. 35: 4827-4830. 1994.

N'Diaye, I. et al., "Almazole D, a new type of antibacterial 2,5-disubstituted oxazolic dipeptide from a red alga of the coast of Senegal." Tet Lett. 37: 3049-3050. 1996.

Nierman et al., "Structural flexibility in the *Burkholderia mallei* genome." Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101: 14246-14251. 2004.

Okazaki et al., "Rhizobial strategies to enhance symbiotic interaction: Rhizobitoxine and 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase." Microbes Environ. 19: 99-111. 2004.

Parke, J. L. and D. Gurian-Sherman, D. 2001. "Diversity of the Burkholderia cepacia complex and implications for risk assessment of biological control strains." Annual Reviews in Phytopathology 39: 225-258. 2001.

Parke, et al. US Patent No. 6,077,505.

Pettit, G. et al. "Isolation of Labradorins 1 and 2 from *Pseudomonas syringae*." J. Nat. Prod. 65: 1793-1797. 2002.

Pitt, et al., "Type characterization and antibiotic susceptibility of *Burkholderia* (*Pseudomonas*) *cepacia* isolates from patients with cystic fibrosis in the United Kingdom and the Republic of Ireland." J. Med. Microbiol. 44: 203-210. 1996.

Ramette et al., "Species abundance and diversity of *Burkholderia cepacia* complex in the environment." Appl. Environ. Microbiol. 71: 1193-1201. 2005.

Resi et al., "Burkholderia tropica sp. nov., a novel nitrogen-fixing, plant-associated bacterium."Int. J. Syst. Evol.

Microbiol. 54: 2155–2162. 2004.

Salama et al. “Potency of spore-gamma-endotoxin complexes of *Bacillus thuringiensis* against some cotton pests.” Z. Angew. Entomol. 91: 388–398. 1981.

Selva et al., “Targeted screening for elongation factor Tu binding antibiotics.” J. Antibiot. 50: 22–26. 1997.

Takahashi, S. et al. “Martefragin A, a novel indole alkaloid isolated from a red alga, inhibits lipid peroxidation.” Chem Pharm. Bull. 46: 1527–1529. 1998.

Thompson et al. “Spinosad – a case study: an example from a natural products discovery programme.” Pest Management Science 56: 696–702. 2000.

Takita et al., “Chemistry of Bleomycin. XIX Revised structures of bleomycin and phleomycin.” J. Antibiot. 31: 801–804. 1978.

Tran Van et al., “Repeated beneficial effects of rice inoculation with a strain of *Burkholderia vietnamiensis* on early and late yield component in low fertility sulphate acid soils of Vietnam.” Plant and Soil 218: 273–284. 2000.

Tsuruo et al., “Rhizoxin, a macrocyclic lactone antibiotic, as a new antitumor agent against human and murine tumor cells and their vincristine-resistant sublines.” Cancer Res. 46: 381–385. 1986.

Ueda et al., US Patent No. 7,396,665.

Umehara, K. et al. “Studies of new antiplatelet agents WS-30581 A and B.” J. Antibiot. 37: 1153–1160. 1984.

Vandamme et al. Polyphasic taxonomic study of the emended genus *Arcobacter* with *Arcobacter butzleri* comb. nov. and *Arcobacter skirrowii* sp. nov., an aerotolerant bacterium

isolated from veterinary specimens." Int. J. Syst. Bacteriol. 42: 344-356. 1992.

Vanderwall et al., "A model of the structure of HOO-Co•bleomycin bound to d(CCAGTACTGG): recognition at the d(GpT)site and implications for double-stranded DNA cleavage, Chem. Biol. 4: 373-387. 1997.

Vermis K., et al. "Evaluation of species-specific recA-based PCR tests for genomovar level identification within the *Burkholderia cepacia* complex." J. Med. Microbiol 51: 937-940. 2002.

Watanabe, H. et al. "A new antibiotic SF2583A, 4-chloro-5-(3'indoly)oxazole, produced by *Streptomyces*." Meiji Seika Kenkyu Nenpo 27: 55-62. 1988.

Wayne et al., "Report of the Ad Hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics." Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 37: 463-464. 1987.

Werner et al., "Uptake of indolmycin in gram-positive bacteria." Antimicrob Agents Chemotherapy 18: 858-862. 1980.

Wilson et al. "Toxicity of rhizonin A, isolated from *Rhizopus microsporus*, in laboratory animals." Food Chem. Toxicol. 22: 275-281. 1984.

Zeck W.M. "Ein Bonitierungsschema zur Feldauswertung von Wurzelgallenbefall. Pflanzenschutznachrichten." Bayer 24,1: 144-147. 1971.

Zhang et al., US Patent No. 7,141,407.

Zhou et al., "Antimicrobial susceptibility and synergy studies of *Burkholderia cepacia* complex isolated from patients with cystic fibrosis." Antimicrobial Agents and Chemotherapy 51: 1085-088. 2007

REIVINDICACIONES

1. Una cepa aislada de una no *Burkholderia cepacia*, no *Burkholderia plantari*, no *Burkholderia gladioli*, *Burkholderia sp.* No *Burkholderia cepacia*, no *Burkholderia multivorans*, *Burkholderia sp.* la cual tiene las siguientes características:

(A) una secuencia del gen 16S ARNr que comprende la secuencia delantera que tienen al menos 99% de identidad a las secuencias expuestas en la SEC ID NO:8, 11, 12 y una secuencia inversa que tienen al menos 99% de identidad a las secuencias expuestas en la SEC ID NO:9, 10, 13, 14 y 15;

(B) actividad pesticida;

(C) produce un compuesto pesticida seleccionado a partir del grupo que consiste de:

(i) un compuesto que tiene las siguientes propiedades: (a) un peso molecular de aproximadamente 525-555 como se determina por Cromatografía Líquida/Espectroscopia de Masas (LC/MS); (b) ^{1}H NMR con valores de 6.22, 5.81, 5.69, 5.66, 5.65, 4.64, 4.31, 3.93, 3.22, 3.21, 3.15, 3.10, 2.69, 2.62, 2.26, 2.23. 1.74, 1.15, 1.12, 1.05, 1.02; (c) tiene ^{13}C NMR con valores de 172.99, 172.93, 169.57, 169.23, 167.59, 130.74, 130.12, 129.93, 128.32, 73.49, 62.95, 59.42, 57.73, 38.39, 38.00, 35.49, 30.90, 30.36, 29.26, 18.59, 18.38, 18.09, 17.93, 12.51 y (c) un tiempo de retención de Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC) de aproximadamente 10-15 minutos, en una columna de HPLC C-18 de fase inversa usando un gradiente de agua:acetonitrilo (CH3CN);

(iv) un compuesto que tiene una estructura oxazolil-indol que

comprende al menos una porción indol, al menos una porción oxazol, al menos un grupo alquilo sustituido y al menos un grupo éster carboxílico, al menos 17 carbonos, al menos 3 oxígenos y al menos 2 nitrógenos;

(v) un compuesto que tiene una estructura oxazolil-bencilo que comprende al menos una porción bencilo, al menos una porción oxazol, al menos un grupo alquilo sustituido y al menos un grupo amida, al menos 15 carbonos, al menos 2 oxígenos y al menos 2 nitrógenos;

(vi) un compuesto que tiene al menos un éster, al menos una amida, al menos tres grupos metileno, al menos una porción tetrahidropiranosa, al menos tres enlaces dobles olefínicos, al menos seis grupos metilo, al menos tres grupos hidroxilo, al menos veinticinco carbonos, al menos ocho oxígenos y al menos un nitrógeno y

(vii) un compuesto que tiene al menos un éster, al menos una amida, un grupo metileno epóxido, al menos una porción tetrahidropiranosa, al menos tres enlaces dobles olefínicos, al menos seis grupos metilo, al menos tres grupos hidroxilo, al menos 25 carbonos, al menos 8 oxígenos y al menos 1 nitrógeno;

(D) es no patogénico a animales vertebrados;

(E) es susceptible a canamicina, cloranfenicol, ciprofloxacina, piperacilina, imipenem, y una combinación de sulfametoxazol y trimetoprim y

(F) contiene los ácidos grasos 16:0, ciclo 17:0, 16:0 3-OH, 14:0, ciclo 19:0 ω8*c*, 18:0.

2. La cepa de conformidad con la reivindicación 1, CARACTERIZADA porque la especie *Burkholderia* es una cepa de

Burkholderia que tiene las características de identificación de *Burkholderia* A396 (NRRL Acceso No. B-50319).

3. Un cultivo sustancialmente puro, fracción celular o sobrenadante CARACTERIZADO porque se deriva de la cepa de conformidad con las reivindicaciones 1-2 o extracto de la misma.

4. Un compuesto pesticida aislado opcionalmente obtenible de una especie de *Burkholderia* CARACTERIZADO porque se seleccionado a partir del grupo que consiste de:

(A) un compuesto que tiene una estructura oxazolil-indol que comprende al menos una porción indol, al menos una porción oxazol, al menos un grupo alquilo sustituido y al menos un grupo éster carboxílico; al menos 17 carbonos y al menos 3 oxígenos y 2 nitrógenos; y los cuales tienen al menos uno de los siguientes: (i) un peso molecular de 275-435; (ii) ^{1}H NMR δ valores a 8.44, 8.74, 8.19, 7.47, 7.31, 3.98, 2.82, 2.33, 1.08; (iii) ^{13}C NMR con valores de δ 163.7, 161.2, 154.8, 136.1, 129.4, 125.4, 123.5, 123.3, 121.8, 121.5, 111.8, 104.7, 52.2, 37.3, 28.1, 22.7, 22.7; (iv) un tiempo de retención de Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC) de aproximadamente 10-20 minutos en una columna de HPLC C-18 de fase inversa usando agua:acetonitrilo (CH_3CN) con un sistema de solvente gradiente y detección UV de 210 nm; (v) bandas de absorción UV a 226, 275, 327 nm.;

(B) un compuesto que tiene una estructura oxazolil-bencilo que comprende al menos una porción bencilo, al menos una porción oxazol, al menos un grupo alquilo sustituido, al menos un grupo amida; al menos 15 carbonos, al menos 2 oxígenos y al menos 2 nitrógenos; y al menos una de las siguientes características: (i) un peso molecular de aproximadamente

240-290 como se determina por Cromatografía Líquida/Espectroscopia de Masas (LC/MS); (ii) ^{1}H NMR δ valores a aproximadamente 7.08, 7.06, 6.75, 3.75, 2.56, 2.15, 0.93, 0.93; (iii) ^{13}C NMR con valores de δ 158.2, 156.3, 155.5, 132.6, 129.5, 129.5, 127.3, 121.8, 115.2, 115.2, 41.2, 35.3, 26.7, 21.5, 21.5; (iv) un tiempo de retención de Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC) de aproximadamente 6-15 minutos, en una columna de HPLC C-18 de fase inversa usando un gradiente de agua:acetonitrilo (CH_3CN) y (v) bandas de absorción UV a aproximadamente 230, 285, 323 nm;

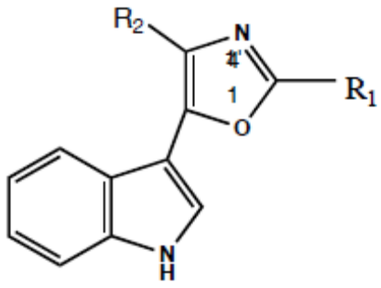
(C) un compuesto no epóxido que comprende al menos un éster, al menos una amida, al menos tres grupos metileno, al menos una porción tetrahidropiranosa, al menos tres enlaces dobles olefínicos, al menos seis grupos metilo, al menos tres grupos hidroxilo, al menos veinticinco carbonos, al menos ocho oxígenos y un nitrógeno y al menos una de las siguientes características: (i) tiene un peso molecular de aproximadamente 530-580 como se determina por Cromatografía Líquida/Espectroscopia de Masas (LC/MS); (ii) ^{1}H NMR con valores de δ 6.40, 6.39, 6.00, 5.97, 5.67, 5.54, 4.33, 3.77, 3.73, 3.70, 3.59, 3.47, 3.41, 2.44, 2.35, 2.26, 1.97, 1.81, 1.76, 1.42, 1.37, 1.16, 1.12, 1.04; (iii) ^{13}C NMR con valores de δ 173.92, 166.06, 145.06, 138.76, 135.71, 129.99, 126.20, 123.35, 99.75, 82.20, 78.22, 76.69, 71.23, 70.79, 70.48, 69.84, 60.98, 48.84, 36.89, 33.09, 30.63, 28.55, 25.88, 20.37, 18.11, 14.90, 12.81, 9.41; (iv) un tiempo de retención de Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC) de aproximadamente 7-12 minutos, en una columna de HPLC C-18 de fase inversa usando agua:acetonitrilo (CH_3CN) con un sistema

de solvente gradiente y detección UV de 210 nm; (v) tiene una fórmula molecular de $C_{28}H_{45}NO_{10}$ la cual se determina por interpretación del análisis de datos ESIMS y NMR; (vii) tiene UV bandas de absorción entre aproximadamente 210–450 nm.

(D) un compuesto que comprende (i) al menos un éster, al menos una amida, un grupo metileno epóxido, al menos una porción tetrahidropiranosa y al menos tres enlaces dobles olefínicos, al menos seis grupos metilo, al menos tres grupos hidroxilo, al menos 25 carbonos, al menos 8 oxígenos y al menos 1 nitrógeno, (ii) ^{13}C NMR con valores de δ 174.03, 166.12, 143.63, 137.50, 134.39, 128.70, 126.68, 124.41, 98.09, 80.75, 76.84, 75.23, 69.87, 69.08, 68.69, 68.60, 48.83, 41.07, 35.45, 31.67, 29.19, 27.12, 24.55, 19.20, 18.95, 13.48, 11.39, 8.04, (iii) una fórmula molecular de $C_{28}H_{43}NO_9$ y al menos uno de: (i) ^{1}H NMR δ valores a aproximadamente 6.41, 6.40, 6.01, 5.97, 5.67, 5.55, 4.33, 3.77, 3.75, 3.72, 3.64, 3.59, 3.54, 3.52, 2.44, 2.34, 2.25, 1.96, 1.81, 1.76, 1.42, 1.38, 1.17, 1.12, 1.04; (ii) un tiempo de retención de Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC) de aproximadamente 6–15 minutos, en una columna de HPLC C–18 de fase inversa usando un gradiente de agua:acetonitrilo (CH_3CN); (iii) UV bandas de absorción entre aproximadamente 210–450 nm.

5. El compuesto de conformidad con la reivindicación 4, CARACTERIZADO porque el compuesto tiene la estructura ##STR002a##

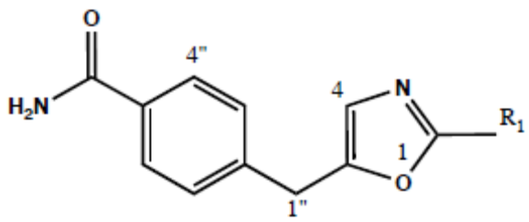
(a)



##STR002a##

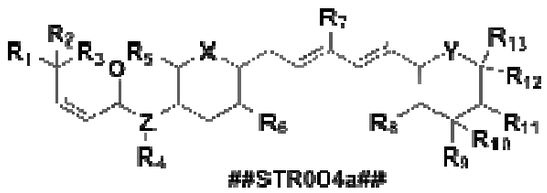
en donde R_1 es --H o alquilo C_1-C_{10}; R_2 es un alquiléster.

(b) ##STR003a##



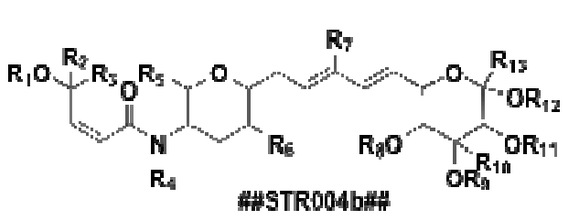
en donde R_1 es --H o alquilo C_1-C_{10}.

(c) ##STR004a##



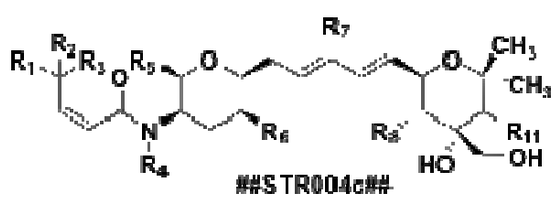
en donde X, Y y Z son cada uno independientemente -O, -NR, o -S, en donde R es H o alquilo C_1-C_{10}; R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8, R_9, R_{10}, R_{11}, R_{12}, y R_{13} son cada uno independientemente H, alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterocíclico, heterocíclico sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, tioalquilo, tioalquilo sustituido, hidroxi, halógeno, amino, amido, carboxilo, -C(O)H, acilo, oxiacilo, carbamato, sulfonilo, sulfonamida, o sulfurilo;

(d)

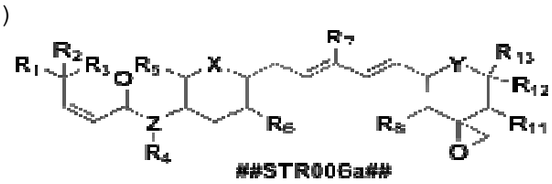


en donde R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8, R_9, R_{10}, R_{11}, R_{12}, y R_{13} son cada uno independientemente H, alquilo, alquilo sustituido,

alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterocíclico, heterocíclico sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, tioalquilo, tioalquilo sustituido, hidroxi, halógeno, amino, amido, carboxilo, -C(O)H, acilo, oxiacilo, carbamato, sulfonilo, sulfonamida, o sulfurilo;

(e) 

en donde R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8, R_{11}, son cada uno independientemente H, alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterocíclico, heterocíclico sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, tioalquilo, tioalquilo sustituido, hidroxi, halógeno, amino, amido, carboxilo, -C(O)H, acilo, oxiacilo, carbamato, sulfonilo, sulfonamida, o sulfurilo;

(f) 

en donde X, Y y Z son cada uno independientemente -O, -NR, o -S, en donde R es H o alquilo C_1-C_{10}; R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8, R_{11}, R_{12}, y R_{13} son cada uno independientemente H, alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo

sustituido, heterocíclico, heterocíclico sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, tioalquilo, tioalquilo sustituido, hidroxi, halógeno, amino, amido, carboxilo, –C(O)H, acilo, oxiacilo, carbamato, sulfonilo, sulfonamida, o sulfurilo y

en donde cuando Z es –NR, R_3 es una porción no oxiformilo.

6. El compuesto de conformidad con las reivindicaciones 4–5, CARACTERIZADO porque el compuesto es seleccionado a partir del grupo que consiste de templazol A, templazol B, templamida A y templamida B, o pesticida biológico y (c) opcionalmente al menos uno de un portador, diluyente, tensoactivo, adyuvante.

7. Un método para producir un compuesto CARACTERIZADO porque se selecciona a partir del grupo que consiste de

(A) un compuesto que tiene las siguientes propiedades: (i) un peso molecular de aproximadamente 525–555 como se determina por Cromatografía Líquida/Espectroscopia de Masas (LC/MS); (ii) ^{1}H NMR con valores de 6.22, 5.81, 5.69, 5.66, 5.65, 4.64, 4.31, 3.93, 3.22, 3.21, 3.15, 3.10, 2.69, 2.62, 2.26, 2.23. 1.74, 1.15, 1.12, 1.05, 1.02; (iii) tiene ^{13}C NMR con valores de 172.99, 172.93, 169.57, 169.23, 167.59, 130.74, 130.12, 129.93, 128.32, 73.49, 62.95, 59.42, 57.73, 38.39, 38.00, 35.49, 30.90, 30.36, 29.26, 18.59, 18.38, 18.09, 17.93, 12.51 y (iv) un tiempo de retención de Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC) de aproximadamente 10–15 minutos, en una columna de HPLC C–18 de fase inversa usando un gradiente de agua:acetonitrilo (CH_3CN);

(B) un compuesto que tiene una estructura oxazolil–indol que comprende al menos una porción indol, al menos una porción oxazol, al menos un grupo alquilo sustituido, al menos un

grupo éster carboxílico; al menos 17 carbonos, al menos 3 oxígenos y al menos 2 nitrógenos;

(C) un compuesto que tiene una estructura oxazolil-bencilo que comprende al menos una porción bencilo, al menos una porción oxazol, al menos un grupo alquilo sustituido, al menos un grupo amida, al menos 15 carbonos, al menos 2 oxígenos y al menos 2 nitrógenos;

(D) un compuesto que tiene al menos un éster, al menos una amida, al menos tres grupos metileno, al menos una porción tetrahidropiranosa, al menos tres enlaces dobles olefínicos, al menos seis grupos metilo, al menos tres grupos hidroxilo, al menos veinticinco carbonos, al menos ocho oxígenos y al menos un nitrógeno y

(E) un compuesto que tiene al menos un éster, al menos una amida, un grupo metileno epóxido, al menos una porción tetrahidropiranosa, al menos tres enlaces dobles olefínicos, al menos seis grupos metilo, al menos tres grupos hidroxilo, al menos 25 carbonos, al menos 8 oxígenos, al menos 1 nitrógeno;

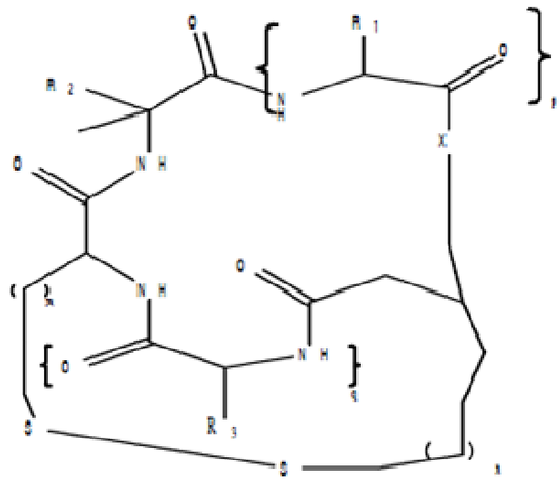
(F) el compuesto de la reivindicación 4;

en el cual el método comprende cultivar la cepa de conformidad con las reivindicaciones 1-2 y producir el compuesto.

8. El método de conformidad con la reivindicación 7, CARACTERIZADO porque el compuesto se selecciona a partir del grupo que consiste de

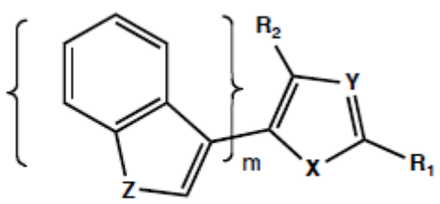
(A) el compuesto de conformidad con la reivindicación 5;

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



o una sal pesticídicamente aceptable o estereoisómeros de la misma, en donde M es 1, 2, 3 ó 4; n es 0, 1, 2, ó 3; p y q son independientemente 1 ó 2; X es O, NH o NR; R1, R2 y R3 son los mismos o diferentes e independientemente una porción de cadena lateral de aminoácido o un derivado de cadena lateral de aminoácido y R es una porción de alquilo, arilo o arilalquilo de cadena inferior;

(C) un compuesto que tiene la estructura ##STR002##

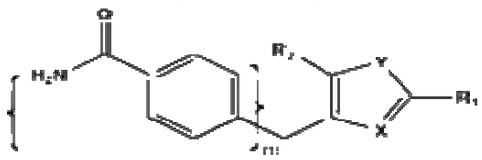


##STR002##

en donde X, Y y Z son cada uno independientemente --O, --NR_1, o --S, en donde R_1 es --H o alquilo C_1-C_{10}; R_1, R_2 y m son cada uno independientemente --H, alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterocíclico, heterocíclico sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, tioalquilo, tioalquilo sustituido, hidroxi, halógeno, amino, amido,

carboxilo, --C(O)H, acilo, oxiacilo, carbamato, sulfonilo, sulfonamida, o sulfurilo y "m" puede ser localizado en cualquier lugar en el anillo oxazol;

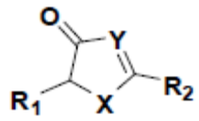
(D) un compuesto que tiene la estructura ##STR003##



##STR003##

en donde: X y Y son cada uno independientemente --OH, --NR_1, o --S, en donde R_1 es --H o alquilo C_1-C_{10}; R_1, R_2 y m, un sustituyente en el anillo oxazol, son cada uno independientemente --H, alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterocíclico, heterocíclico sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, tioalquilo, tioalquilo sustituido, hidroxi, halógeno, amino, amido, carboxilo, --C(O)H, acilo, oxiacilo, carbamato, sulfonilo, sulfonamida, o sulfurilo.

(E) un compuesto que tiene la estructura ##STR005##



##STR005##

en donde: X y Y son cada uno independientemente --OH, --NR_1, o --S, en donde R_1, R_2 son cada uno independientemente --H, alquilo (por ejemplo, alquilo C_1-C_{10}), alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterocíclico, heterocíclico sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, tioalquilo,

tioalquilo sustituido, hidroxi, halógeno, amino, amido, carboxilo, --C(O)H, acilo, oxiacilo, carbamato, sulfonilo, sulfonamida, o sulfurilo.

9. El método de conformidad con las reivindicaciones 7-8, CARACTERIZADO porque el compuesto producido es seleccionado a partir del grupo que consiste de:

(i) templazol A;

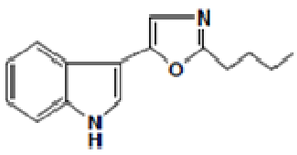
(ii) teplazol B;

(iii) templamida A;

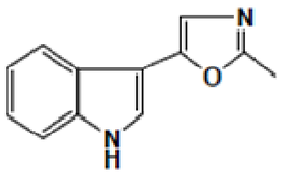
(iv) templamida B

(v) FR90128;

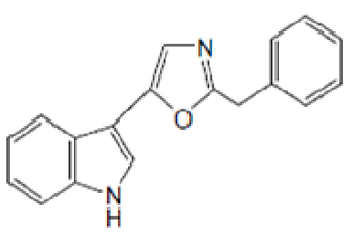
(vi)



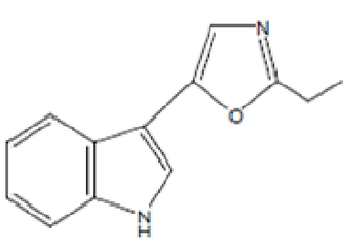
(vii)



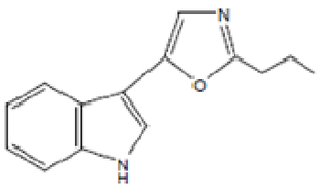
(viii)



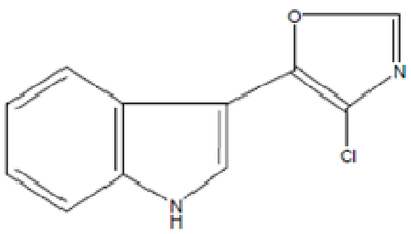
(ix)



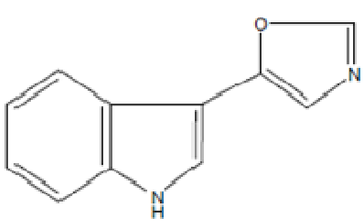
(x)



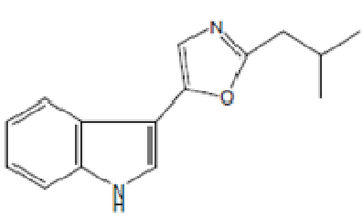
(xi)



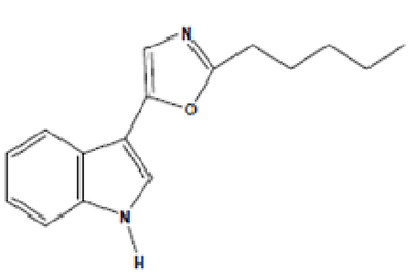
(xii)



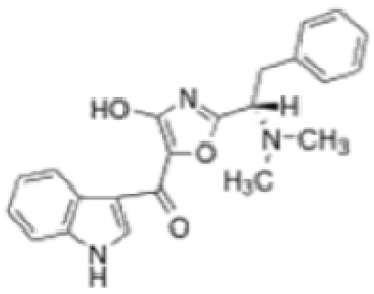
(xiii)



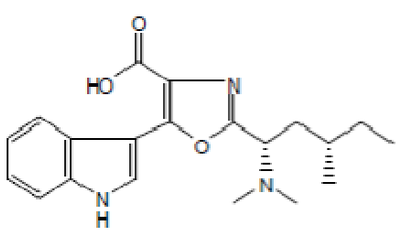
(xiv)



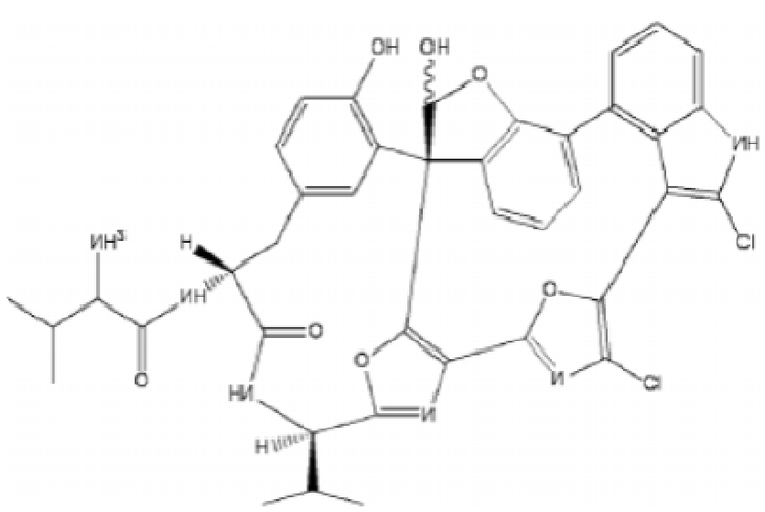
(xv)



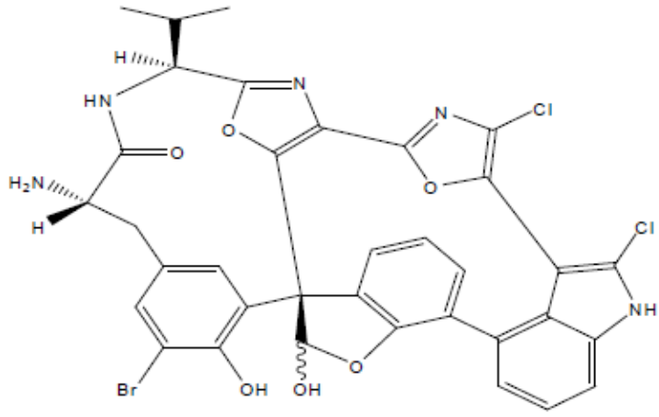
(xvi)



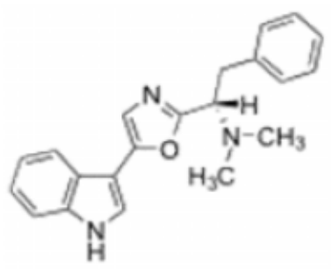
(xvii)



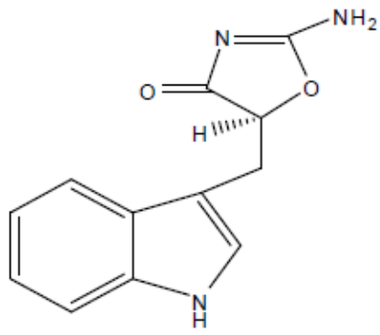
(xviii)



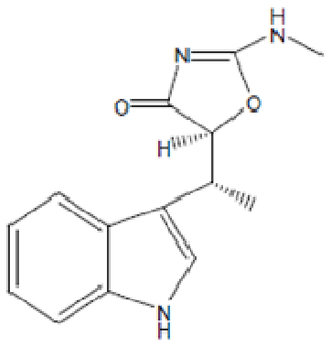
(xix)



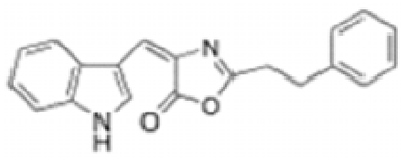
(xx)



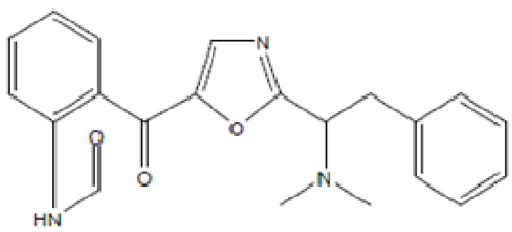
(xxi)

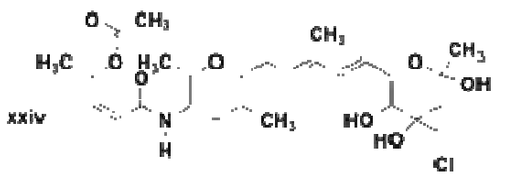


(xxii)

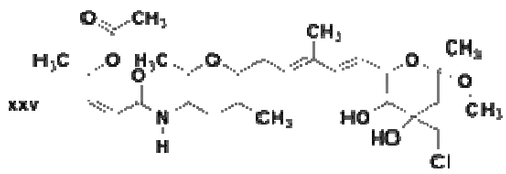


(xxiii)

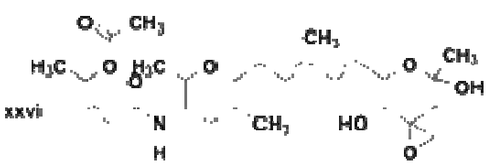




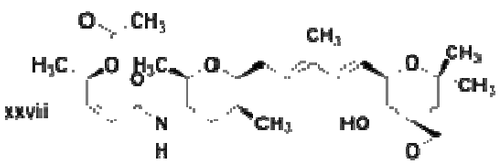
xxiv



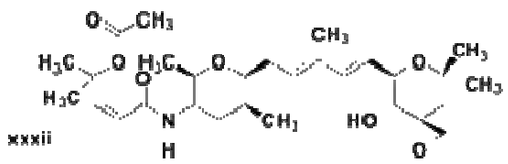
xxv



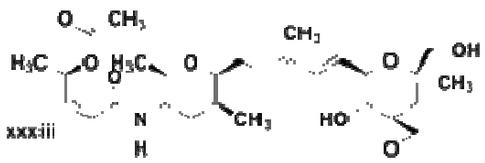
xxvi



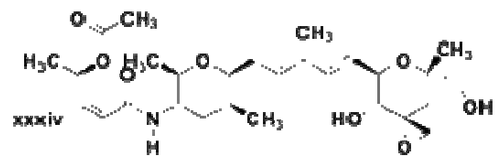
xxvii



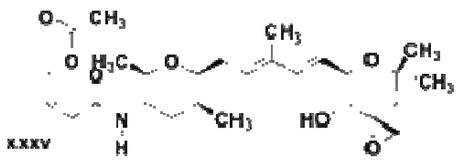
xxxii



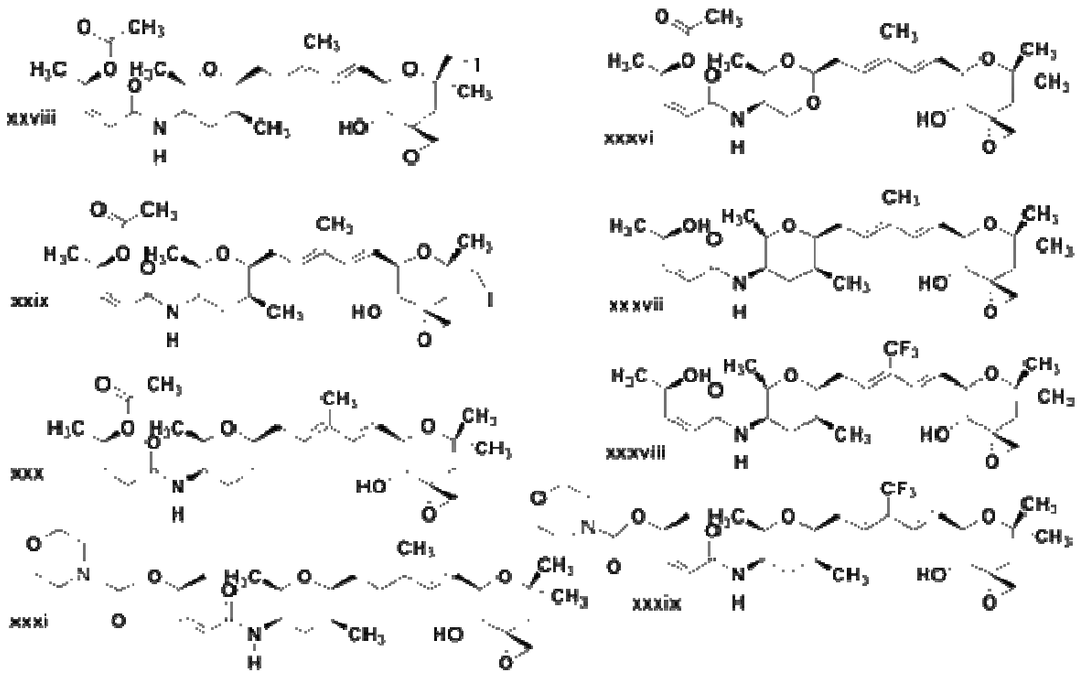
xxxiii



xxxiv



xxxv



(XL) FR901465.

10. Un método para aislar una cepa de *Burkholderia*, CARACTERIZADO porque comprende

(a) producir un compuesto de conformidad con el método de las reivindicaciones 7-9;

(b) aislar el compuesto producido en la etapa (a) del sobrenadante del cultivo.

11. Una combinación CARACTERIZADA porque comprende (a) una primer sustancia seleccionada del grupo que consiste de (i) un cultivo puro, fracción celular o sobrenadante derivado de la cepa de las reivindicaciones 1-2 o extracto de la misma; (ii) el compuesto de las reivindicaciones 4-6; (iii) un compuesto producido por la cepa de las reivindicaciones 1-2; y (iii) un compuesto aislado de conformidad con el método de la reivindicación 9; (b) opcionalmente una segunda sustancia, en donde la segunda sustancia es un pesticida químico o biológico y (c) opcionalmente al menos uno de un portador, diluyente,

tensoactivo, adyuvante.

12. La combiandción de conformidad con la reivindicación 11, CARACTERIZADA porque la segunda sustancia es un pesticida seleccionado del grupo que consiste de nematicida, herbicida, fungicida e insecticida.

13. La combinación de conformidad con las reivindicaciones 11-12, CARACTERIZADA porque la combinación es una composición.

14. Un método para modular infestación de plagas en una planta, CARACTERIZADO porque comprende aplicar a la planta y/o semillas del mismo y/o sustrato usado para hacer crecer la planta, una cantidad de la combinación de las reivindicaciones 11-13, efectiva para modular la infestación de plagas.

15. Un método para modular la emergencia y/o crecimiento de monocotiledóneas, juncias o malezas dicotiledóneas, CARACTERIZADO porque comprende aplicar a la maleza o suelo una cantidad de la combinación de las reivindicaciones 11-13, efectiva para modular la emergencia y/o crecimiento de las malezas.

16. Una semilla CARACTERIZADA porque comprende la combinación de la reivindicación 13.

17. Uso de un compuesto seleccionado del grupo que consiste de

(A) un compuesto que tiene las siguientes propiedades: (i) un peso molecular de aproximadamente 525-555 como se determina por Cromatografía Líquida/Espectroscopia de Masas (LC/MS); (ii) ^{1}H NMR con valores de 6.22, 5.81, 5.69, 5.66, 5.65, 4.64, 4.31, 3.93, 3.22, 3.21, 3.15, 3.10, 2.69, 2.62, 2.26, 2.23. 1.74, 1.15, 1.12, 1.05, 1.02; (iii) tiene ^{13}C NMR con

valores de 172.99, 172.93, 169.57, 169.23, 167.59, 130.74, 130.12, 129.93, 128.32, 73.49, 62.95, 59.42, 57.73, 38.39, 38.00, 35.49, 30.90, 30.36, 29.26, 18.59, 18.38, 18.09, 17.93, 12.51 y (iv) un tiempo de retención de Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC) de aproximadamente 10-15 minutos, en una columna de HPLC C-18 de fase inversa usando un gradiente de agua:acetonitrilo (CH_3CN);

(B) un compuesto que tiene una estructura oxazolil-indol que comprende al menos una porción indol, al menos una porción oxazol, al menos un grupo alquilo sustituido, al menos un grupo éster carboxílico; al menos 17 carbonos, al menos 3 oxígenos y al menos 2 nitrógenos;

(C) un compuesto que tiene una estructura oxazolil-bencilo que comprende al menos una porción bencilo, al menos una porción oxazol, al menos un grupo alquilo sustituido y al menos un grupo amida; al menos 15 carbonos, al menos 2 oxígenos, al menos 2 nitrógenos;

(D) un compuesto que tiene al menos un éster, al menos una amida, al menos tres grupos metileno, al menos una porción tetrahidropiranosa, al menos tres enlaces dobles olefínicos, al menos seis grupos metilo, al menos tres grupos hidroxilo, al menos veinticinco carbonos, al menos ocho oxígenos y al menos un nitrógeno y

(E) un compuesto que tiene al menos un éster, al menos una amida, un grupo metileno epóxido, al menos una porción tetrahidropiranosa y al menos tres enlaces dobles olefínicos, al menos seis grupos metilo, al menos tres grupos hidroxilo, al menos 25 carbonos, al menos 8 oxígenos, y al menos 1 nitrógeno, y opcionalmente un pesticida para

formular una composición para modular la infestación de plagas en una planta y/o modular la emergencia y/o crecimiento de monocotiledóneas, malezas de dicotiledóneas o juncias.

18. El uso de conformidad con la reivindicación 17, en donde la plaga es seleccionada a partir del grupo que consiste de nemátodos, hongos, malezas e insectos.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a especies de *Burkholderia sp* sin patogenicidad conocida a vertebrados pero con actividad pesticida (por ejemplo, plantas, insectos, hongos, malezas y nemátodos). También se proporcionan productos naturales derivados de un cultivo de las especies y métodos para controlar las plagas usando los productos naturales.

SEQUENCE LISTING

<110> Marrone Bio Innovations, Inc.

<120> ISOLATED BACTERIAL STRAIN OF THE GENUS BURKHOLDERIA

<130> MOI-42016-US

<150> 61308287
<151> 2010-02-25

<150> 61406541
<151> 2010-10-25

<160> 15

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 20
<212> DNA
<213> primer

<400> 1
agagtttgat cctggctcag 20

<210> 2
<211> 20
<212> DNA
<213> primer

<400> 2
ccgtcaattc ctttgagttt 20

<210> 3
<211> 16
<212> DNA
<213> primer

<400> 3
gtgccagccg ccgcgg 16

<210> 4
<211> 16
<212> DNA
<213> primer

<400> 4
gcaacgagcg caaccc 16

<210> 5
<211> 17
<212> DNA
<213> primer

<400> 5
aaggaggtgw tccarcc 17

<210> 6
<211> 15
<212> DNA
<213> primer

<400> 6
gggttgcgct cgttg 15

<210> 7
<211> 18
<212> DNA
<213> primer

<400> 7
gwattaccgc ggckgctg 18

<210> 8
<211> 871
<212> DNA
<213> Burkholderia A396

<400> 8
tgcagtcgaa cggcagcacg ggtgcttgca cctggtggcg agtggcgaac gggtgagtaa 60

tacatcggaa catgtcctgt agtgggggat agcccggcga aagccggatt aataccgcat 120

acgatctacg gatgaaagcg ggggatcttc ggacctcgcg ctatagggtt ggccgatggc 180

tgattagcta gttggtgggg taaaggccta ccaaggcgac gatcagtagc tggtctgaga 240

ggacgatcag ccacactggg actgagacac ggcccagact cctacgggag gcagcagtgg 300

ggaattttgg acaatggggg aaaccctgat ccagcaatgc cgcgtgtgtg aagaaggcct 360

tcgggttgta aagcactttt gtccggaaag aaatcctttg ggctaatacc ccgggggat 420

gacggtaccg gaagaataag caccggctaa ctacgtgcca gcagccgcgg taatacgtag 480

ggtgcgagcg ttaatcggaa ttactgggcg taaagcgtgc gcaggcggtt tgttaagaca 540

gatgtgaaat ccccgggctt aacctgggaa ctgcatttgt gactggcaag ctagagtatg 600

gcagaggggg gtagaattcc acgtgtagca gtgaaatgcg tagagatgtg gaggaatacc 660

gatggcgaag gcagcccccc gggccaatac tgacgctcat gcacgaaagc gtggggagca 720

aacaggatta gataccctgg tagtccacgc cctaaacgat gtcaactagt tgttggggat 780

tcatttcctt agtaacgtag ctacgcgtga agttgaccgc ctggggagta cggtcgcaag 840

attaaatmga gggtkgkktg kkgggggaa a 871

<210> 9
<211> 1453
<212> DNA
<213> Burkholderia A396

<400> 9
gtcatgaatc ctaccgtggt gaccgtcctc cttgcggtta gactagccac ttctggtaaa 60

acccactccc atggtgtgac gggcggtgtg tacaagaccc gggaacgtat tcaccgcggc 120

atgctgatcc gcgattacta gcgattccag cttcatgcac tcgagttgca gagtgcaatc 180

cggactacga tcggttttct gggattagct ccccctcgcg ggttggcaac cctctgttcc 240

gaccattgta tgacgtgtga agccctaccc ataagggcca tgaggacttg acgtcatccc 300

caccttcctc cggtttgtca ccggcagtct ccttagagtg ctcttgcgta gcaactaagg 360

acaagggttg cgctcgttgc gggacttaac ccaacatctc acgacacgag ctgacgacag 420

ccatgcagca cctgtgtatc ggttctcttt cgagcactcc cgaatctctt caggattccg 480

accatgtcaa gggtaggtaa ggtttttcgc gttgcatcga attaatccac atcatccacc 540

gcttgtgcgg gtccccgtca attcctttga gttttaatct tgcgaccgta ctccccaggc 600

ggtcaacttc acgcgttagc tacgttacta aggaaatgaa tccccaacaa ctagttgaca 660

tcgtttaggg cgtggactac cagggtatct aatcctgttt gctccccacg ctttcgtgca 720

tgagcgtcag tattggccca gggggctgcc ttcgccatcg gtattcctcc acatctctac 780

gcatttcact gctacacgtg gaattctacc cccctctgcc atactctagc ttgccagtca 840

caaatgcagt tcccaggtta agcccgggga tttcacatct gtcttaacaa accgcctgcg 900

cacgctttac gcccagtaat tccgattaac gctcgcaccc tacgtattac cgcggctgct 960

ggcacgtagt tagccggtgc ttattcttcc ggtaccgtca tccccccggg gtattagccc 1020

aaaggatttc tttccggaca aaagtgcttt acaacccgaa ggccttcttc acacacgcgg 1080

cattgctgga tcagggtttc ccccattgtc caaaattccc cactgctgcc tcccgtagga 1140

gtctgggccg tgtctcagtc ccagtgtggc tgatcgtcct ctcagaccag ctactgatcg 1200

tcgccttggt aggcctttac cccaccaact agctaatcag ccatcggcca accctatagc 1260

gcgaggtccg aagatccccc gctttcatcc gtagatcgta tgcggtatta atccggcttt 1320

cgccgggcta tcccccacta caggacatgt tccgatgtat tactcacccg ttcgccactc 1380

gccaccaggt gcaagcaccc gtgctgccgt tcgacttgca tgtgtaaggc atgccgccag 1440

cgttcaatct gag 1453

<210> 10
<211> 860
<212> DNA
<213> Burkholderia A396

<400> 10
ccaggcggtc acttcacgcg ttagctacgt tactaaggaa atgaatcccc aacaactagt 60

tgacatcgtt tagggcgtgg actaccaggg tatctaatcc tgtttgctcc ccacgctttc 120

gtgcatgagc gtcagtattg gcccaggggg ctgccttcgc catcggtatt cctccacatc 180

tctacgcatt tcactgctac acgtggaatt ctacccccct ctgccatact ctagcttgcc 240

agtcacaaat gcagttccca ggttaagccc ggggatttca catctgtctt aacaaaccgc 300

ctgcgcacgc tttacgccca gtaattccga ttaacgctcg caccctacgt attaccgcgg 360

ctgctggcac gtagttagcc ggtgcttatt cttccggtac cgtcatcccc ccggggtatt 420

agcccaaagg atttctttcc ggacaaaagt gctttacaac ccgaaggcct tcttcacaca 480

cgcggcattg ctggatcagg gtttccccca ttgtccaaaa ttccccactg ctgcctcccg 540

taggagtctg ggccgtgtct cagtcccagt gtggctgatc gtcctctcag accagctact 600

gatcgtcgcc ttggtaggcc tttaccccac caactagcta atcagccatc ggccaaccct 660

atagcgcgag gtccgaagat cccccgcttt catccgtaga tcgtatgcgg tattaatccg 720

gctttcgccg ggctatcccc cactacagga catgttccga tgtattactc acccgttcgc 780

cactcgccac caggtgcaag cacccgtgct gccgttcgac ttgcatgtgt aaggcatgcc 840

gccagcgttc aatctgagtg 860

<210> 11
<211> 1152
<212> DNA
<213> Burkholderia A396

<400> 11
tcggattact gggcgtaagc gtgcgcaggc ggtttgttaa gacagatgtg aaatccccgg 60

gcttaacctg ggaactgcat ttgtgactgg caagctagag tatggcagag gggggtagaa 120

ttccacgtgt agcagtgaaa tgcgtagaga tgtggaggaa taccgatggc gaagggagcc 180

ccctgggcct atactgaccc tcatgctcga aagcgtgagg acccaaccgg attagatgcc 240

ctgataggcc atgccccaca ccatgccatg tgttaggggc ccatttcctt agggaggcag 300

ctatggggaa ttttggacaa tgtgggaaac cctgatccaa caatgccgcg tgtgtgaata 360

aggccttcgg gttgtaaagc acttttatcc ggatagattc cttttgggct aaacctccgt 420

aggggatgac ggtaccggaa gaataaccac cgggtaacta cgtgccagca gccgcggtaa 480

tacgtagggt gcgagcgtta atcggaatta ctgggcgtaa agcgtgcgca ggcggtttgt 540

taagacagat gtgaaatccc cgggcttaac ctgggaactg catttgtgac tggcaagcta 600

gagtatggca gacgggggta gaattccacg tgtagcagtg aaatgcgtag agatgtggag 660

gaataccgat gggcgaagca gctcctgggg caatactgac gctcatgcac aagatcgtgc 720

gaaacaaaca ggataaaacc cctgtattcc acgcccaaaa cgatgtccac caagttgttg 780

gcgatccttt ccttcgtatc gtagctacgc gggaatttga ccccctgggg actaggccgc 840

atataaaact caagggaatt ccggggaccc ccagagctgt gtatgatgtg attattccga 900

tgcgcggaaa accttcctta tctttgaatg gcggtactcc tgaaaattgc ggagtgctcg 960

aaaacaccga acccgggtct ttctgcgtgt cctccctcgt gtgggatatg ctggatatcc 1020

cgcagacgca tctttgactt agtgctccca aaactgagag ctgggaggac tcgagagggg 1080

atccctgcct ccccggcttg ggtgctcccc ttatggggga aacaggtaca cgggggggatc 1140

atcccatacc ta 1152

<210> 12
<211> 1067
<212> DNA
<213> Burkholderia A396

<400> 12
tctaaggaga ctgccggtga caaaccggag gaaggtgggg atgacgtcaa gtcctcatgg 60

cccttatggg tagggcttca cacgtcatac aatggtcgga acagagggtt gccaacccgc 120

gaggggggagc taatcccaga aaaccgatcg tagtccggat tgcactctgc aactcgagtg 180

catgaagctg gaatcgctag taatcgcgga tcagcatgcc gcggtgaata cgttcccggg 240

tcttgtacac accgcccgtc acaccatggg agtgggtttt accagaagtg gctagtctaa 300

ccgcaaggag gacggtcacc acggtaggat tcatgactgg ggtgaagtcg taacaaggta 360

gccgtatcgg aaggtgcggc tggatcacct ccttaaaccc tttggcctaa taaccccggg 420

ggaataagta ccgaaaaaaa aaaaaactgg ataacttccg tgccacaacc cgcggaaaaa 480

tctaggggggg gggagcttaa atggaaattt acggggccgt aaagcgtgcg caggcggttt 540

gtaaacacag atgtgaaatc cccgggctta acctgggaac tgcatttgtg actggcaagc 600

tagagtatgg cacaggggggg tagaattcca cgtgtagcat tgaatgcata gagatgagag 660

gataccgatg gagaagggcg cccccgggga caatatgacg cctatgccac aaagctgtgg 720

cacaataggt taaatacctg tgttgtcccc gcctaaacag attacacttg ttgtgggtat 780

tttctcataa aatactacac acgggagaat acactggggg gcttcgtcaa ttatcacaac 840

aatgattgcg ggcacccacg ggggtagatg ggtaataaat cgacggcaac tatctactta 900

cttggatgat cgcacagatt gggcgggaga gaagagaaca gcgtgtgtgt gctcctccgc 960

gagtgatagg taatcggaca atactttgac aggacttaac tgggtagcgg gatcgagtgg 1020

attcccgtcg gatggcctcc gcaggtacgg cagctgggga ttacatc 1067

<210> 13
<211> 1223
<212> DNA
<213> Burkholderia A396

<400> 13
ttgcttacga cttcacccca gtcatgaatc ctaccgtggt gaccgtcctc cttgcggtta 60

gactagccac ttctggtaaa acccactccc atggtgtgac gggcggtgtg tacaagaccc 120

gggaacgtat tcaccgcggc atgctgatcc gcgattacta gcgattccag cttcatgcac 180

tcgagttgca gagtgcaatc cggactacga tcggttttct gggattagct ccccctcgcg 240

ggttggcaac cctctgttcc gaccattgta tgacgtgtga agccctaccc ataagggcca 300

tgaggacttg acgtcatccc caccttcctc cggtttgtca ccggcagtct ccttagagtg 360

ctcttgcgta gcaactaagg acaagggttg cgctcgttgc gggacttaac ccaacatctc 420

acgacacgag ctgacgacag ccatgcagca cctgtgtatc ggttctcttt cgagcactcc 480

cgaatctctt caggattccg accatgtcaa gggtaggtaa ggtttttcgc gttgcatcga 540

attaatccac atcatccacc gcttgtgcgg gtccccgtca attcctttga gttttaatct 600

tgcgaccgta ctccccaggc ggtcaacttc acgcgttagc tacgttacta aggaaatgaa 660

tccccaacaa ctagttgaca tcgtttaggg cgtggactac cagggtatct aatcctgttt 720

gctccccacg ctttcgtgca tgagcgtcag tattggccca gggggctgcc ttcgccatcg 780

gtattcctcc acatctctac gcatttcact gctacacgtg gaattctacc cccctctgcc 840

atactctagc ttgccagtca caaatgcagt tcccaggtta agcccgggga tttcacatct 900

gtcttaacaa accgcctgcg cacgctttac gcccagtaat tccgattaac gctcgcaccc 960

tacgtattac cgcggctgct ggcacgtagt tagccggtgc ttattctgcg gtaccgtcat 1020

cccccgggta tagcccaaag gattctttcg acaaagtgct ttacacccga tgtctctcac 1080

acacgcgcat gctgatcagg tttccccatg tcaaagtcca ctgctgctcg taggtctgga 1140

cgggttcagt tcaatgtgac tgatcgtctt tcgacaacta ctgaacgtcc ctgtagctta 1200

cccaccaact agctatagca tgc 1223

<210> 14
<211> 1216
<212> DNA
<213> Burkholderia A396

<400> 14
ccgagctgac gacagccatg cagcacctgt gtatcggttc tctttcgagc actcccgaat 60

ctcttcagga ttccgaccat gtcaagggta ggtaaggttt ttcgcgttgc atcgaattaa 120

tccacatcat ccaccgcttg tgcgggtccc cgtcaattcc tttgagtttt aatcttgcga 180

ccgtactccc caggcggtca acttcacgcg ttagctacgt tactaaggaa atgaatcccc 240

aacaactagt tgacatcgtt tagggcgtgg actaccaggg tatctaatcc tgtttgctcc 300

ccacgctttc gtgcatgagc gtcagtattg gcccaggggg ctgccttcgc catcggtatt 360

cctccacatc tctacgcatt tcactgctac acgtggaatt ctacccccct ctgccatact 420

ctagcttgcc agtcacaaat gcagttccca ggttaagccc ggggatttca catctgtctt 480

aacaaaccgc ctgcgcacgc tttacgccca gtaattccga ttaacgctcg caccctacgt 540

attaccgcgg ctgctggcac gtagttagcc ggtgcttatt cttccggtac cgtcatcccc 600

ccggggtatt agcccaaagg atttctttcc ggacaaaagt gctttacaac ccgaaggcct 660

tcttcacaca cgcggcattg ctggatcagg gtttccccca ttgtccaaaa ttccccactg 720

ctgcctcccg taggagtctg ggccgtgtct cagtcccagt gtggctgatc gtcctctcag 780

accagctact gatcgtcgcc ttggtaggcc tttaccccac caactagcta atcagccatc 840

ggccaaccct atagcgcgag gtccgaagat cccccgcttt catccgtaga tcgtatgcgg 900

tattaatccg gctttcgccg ggctatcccc cactacagga catgttccga tgtattactc 960

acccgttcgc cactcgcccc aggtgcaagc acccgtgctg ccgttcgact tgcatgtgta 1020

gcatgcgcag cgtcatctac taaataaaca actctaagaa tttttgcccg agggcctcta 1080

aacactcggg gcgtcgagag agactacgga tgaggagcat ccctctgtct ctaggtatgt 1140

gttgtcgcct ctctcacaga ggaggggacg cacgacggag ccatcgggga cgacaacatg 1200

tacgatatac tatcta 1216

<210> 15
<211> 1194
<212> DNA
<213> Burkholderia A396

<400> 15
ttcttcggta ccgtcatccc cccggggtat tagcccaaag gatttctttc cggacaaaag 60

tgctttacaa cccgaaggcc ttcttcacac acgcggcatt gctggatcag ggtttccccc 120

attgtccaaa attccccact gctgcctccc gtaggagtct gggccgtgtc tcagtcccag 180

tgtggctgat cgtcctctca gaccagctac tgatcgtcgc cttggtaggc ctttacccca 240

ccaactagct aatcagccat cggccaaccc tatagcgcga ggtccgaaga tcccccgctt 300

tcatccgtag atcgtatgcg gtattaatcc ggctttcgcc gggctatccc ccactacagg 360

acatgttccg atgtattact cacccgttcg ccactcgcca ccaggtgcaa gcacccgtgc 420

tgccgttcga cttgcatgtg taaggcatgc cgccagcgtt caatctgagc catgatcaaa 480

ctctgagggg gggggccttc aacggaacga ctgggcaaaa agcgtgccca ggcgttttgt 540

taagacagat gtgaaacccc ggggcttaac ctggaaactg catttgtgac tggaaagcta 600

gagtatggca gaggggggta gaattccacg tgtagcattg aaatgcgtag aaatggagag 660

gaataccgat gggagagggc agcccccgtg ggcaaatact ggcgcttatg aacaaagttg 720

gggcgcgccg ccgggatatg ttcccctggg atatcccccc cctaaactgc ttacaaatat 780

tgtgtgggaa acttttttctc taaaaaatag aacacaacgg gagatatcac ccccgggggg 840

ccaccgccag attaaacccc caaaaagtat ttggcgggca ccccccgggg gggtgagatg 900

gggtaaaata aatccgtgcg acgagcaaac cctccccaca cctgggatgg tcgcgaccac 960

agatgagatg cgggcggaga gaacgatacc caagcgtggt tgtttgcctg catcccctcc 1020

gtcgggagtg gatatagtag agtaattacg gcacgactgc attttttttt cttcagtaca 1080

ccttatcaca ctgttggatg caccgcgaga aatccggagg tgtgagtact ccccccctct 1140

cctcgggatg tgtcggcgct cccttctccc gttcaggggt gggtaagcac cgcg 1194

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Marrone Bio Innovations, Inc.

<120> CEPA BACTERIANA AISLADA DEL GÉNERO BURKHOLDERIA

<130> MOI-42016-US

<150> 61308287

<151> 2010-02-25

<150> 61406541

<151> 2010-10-25

<160> 15

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> primer

<400> 1

agagtttgat cctggctcag 20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> primer

<400> 2

ccgtcaattc ctttgagttt 20

<210> 3

<211> 16

<212> DNA

<213> primer

<400> 3

gtgccagccg ccgcgg 16

<210> 4

<211> 16

<212> DNA

<213> primer

<400> 4

gcaacgagcg caaccc 16

<210> 5

<211> 17
<212> DNA

<213> primer

<400> 5

aaggaggtgw tccarcc 17

<210> 6

<211> 15

<212> DNA

<213> primer

<400> 6

gggttgcgct cgttg 15

<210> 7

<211> 18

<212> DNA

<213> primer

<400> 7

gwattaccgc ggckgctg 18

<210> 8

<211> 871

<212> DNA

<213> Burkholderia A396
<400> 8

tgcagtcgaa cggcagcacg ggtgcttgca cctggtggcg agtggcgaac gggtgagtaa 60

tacatcggaa catgtcctgt agtgggggat agcccggcga aagccggatt aataccgcat 120

acgatctacg gatgaaagcg ggggatcttc ggacctcgcg ctatagggtt ggccgatggc 180

tgattagcta gttggtgggg taaaggccta ccaaggcgac gatcagtagc tggtctgaga 240

ggacgatcag ccacactggg actgagacac ggcccagact cctacgggag gcagcagtgg 300

ggaattttgg acaatggggg aaaccctgat ccagcaatgc cgcgtgtgtg aagaaggcct 360

tcgggttgta aagcactttt gtccggaaag aaatcctttg ggctaatacc cgggggggat 420

gacggtaccg gaagaataag caccggctaa ctacgtgcca gcagccgcgg taatacgtag 480

ggtgcgagcg ttaatcggaa ttactgggcg taaagcgtgc gcaggcggtt tgttaagaca 540

gatgtgaaat ccccgggctt aacctgggaa ctgcatttgt gactggcaag ctagagtatg 600

gcagaggggg gtagaattcc acgtgtagca gtgaaatgcg tagagatgtg gaggaatacc 660

gatggcgaag gcagcccccc gggccaatac tgacgctcat gcacgaaagc gtggggagca 720

aacaggatta gataccctgg tagtccacgc cctaaacgat gtcaactagt tgttggggat 780

tcatttcctt agtaacgtag ctacgcgtga agttgaccgc ctggggagta cggtcgcaag 840

attaaatmga gggtkgkktg kkgggggggaa a 871

<210> 9

<211> 1453

<212> DNA

<213> Burkholderia A396

<400> 9

gtcatgaatc ctaccgtggt gaccgtcctc cttgcggtta gactagccac ttctggtaaa 60

acccactccc atggtgtgac gggcggtgtg tacaagaccc gggaacgtat tcaccgcggc 120

atgctgatcc gcgattacta gcgattccag cttcatgcac tcgagttgca gagtgcaatc 180

cggactacga tcggttttct gggattagct ccccctcgcg ggttggcaac cctctgttcc 240

gaccattgta tgacgtgtga agccctaccc ataagggcca tgaggacttg acgtcatccc 300

caccttcctc cggtttgtca ccggcagtct ccttagagtg ctcttgcgta gcaactaagg 360

acaagggttg cgctcgttgc gggacttaac ccaacatctc acgacacgag ctgacgacag 420

ccatgcagca cctgtgtatc ggttctcttt cgagcactcc cgaatctctt caggattccg 480

accatgtcaa gggtaggtaa ggtttttcgc gttgcatcga attaatccac atcatccacc 540

gcttgtgcgg gtccccgtca attcctttga gttttaatct tgcgaccgta ctccccaggc 600

ggtcaacttc acgcgttagc tacgttacta aggaaatgaa tccccaacaa ctagttgaca 660

tcgtttaggg cgtggactac cagggtatct aatcctgttt gctccccacg ctttcgtgca 720

tgagcgtcag tattggccca gggggctgcc ttcgccatcg gtattcctcc acatctctac 780

gcatttcact gctacacgtg gaattctacc cccctctgcc atactctagc ttgccagtca 840

caaatgcagt tcccaggtta agcccgggga tttcacatct gtcttaacaa accgcctgcg 900

cacgctttac gcccagtaat tccgattaac gctcgcaccc tacgtattac cgcggctgct 960

ggcacgtagt tagccggtgc ttattcttcc ggtaccgtca tccccccggg gtattagccc 1020

aaaggatttc tttccggaca aaagtgcttt acaacccgaa ggccttcttc acacacgcgg 1080

cattgctgga tcagggtttc ccccattgtc caaaattccc cactgctgcc tcccgtagga 1140

gtctgggccg tgtctcagtc ccagtgtggc tgatcgtcct ctcagaccag ctactgatcg 1200

tcgccttggt aggcctttac cccaccaact agctaatcag ccatcggcca accctatagc 1260

gcgaggtccg aagatccccc gctttcatcc gtagatcgta tgcggtatta atccggcttt 1320

cgccgggcta tcccccacta caggacatgt tccgatgtat tactcacccg ttcgccactc 1380

gccaccaggt gcaagcaccc gtgctgccgt tcgacttgca tgtgtaaggc atgccgccag 1440

cgttcaatct gag 1453

<210> 10

<211> 860

<212> DNA
<213> Burkholderia A396

<400> 10

ccaggcggtc acttcacgcg ttagctacgt tactaaggaa atgaatcccc aacaactagt 60

tgacatcgtt tagggcgtgg actaccaggg tatctaatcc tgtttgctcc ccacgctttc 120

gtgcatgagc gtcagtattg gcccaggggg ctgccttcgc catcggtatt cctccacatc 180

tctacgcatt tcactgctac acgtggaatt ctacccccct ctgccatact ctagcttgcc 240

agtcacaaat gcagttccca ggttaagccc ggggatttca catctgtctt aacaaaccgc 300

ctgcgcacgc tttacgccca gtaattccga ttaacgctcg caccctacgt attaccgcgg 360

ctgctggcac gtagttagcc ggtgcttatt cttccggtac cgtcatcccc ccggggtatt 420

agcccaaagg atttctttcc ggacaaaagt gctttacaac ccgaaggcct tcttcacaca 480

cgcggcattg ctggatcagg gtttccccca ttgtccaaaa ttccccactg ctgcctcccg 540

taggagtctg ggccgtgtct cagtcccagt gtggctgatc gtcctctcag accagctact 600

gatcgtcgcc ttggtaggcc tttaccccac caactagcta atcagccatc ggccaaccct 660

atagcgcgag gtccgaagat cccccgcttt catccgtaga tcgtatgcgg tattaatccg 720

gctttcgccg ggctatcccc cactacagga catgttccga tgtattactc acccgttcgc 780

cactcgccac caggtgcaag cacccgtgct gccgttcgac ttgcatgtgt aaggcatgcc 840

gccagcgttc aatctgagtg 860

<210> 11

<211> 1152

<212> DNA

<213> Burkholderia A396

<400> 11

tcggattact gggcgtaagc gtgcgcaggc ggtttgttaa gacagatgtg aaatccccgg 60

gcttaacctg ggaactgcat ttgtgactgg caagctagag tatggcagag gggggtagaa 120

ttccacgtgt agcagtgaaa tgcgtagaga tgtggaggaa taccgatggc gaagggagcc 180

ccctgggcct atactgaccc tcatgctcga aagcgtgagg acccaaccgg attagatgcc 240

ctgataggcc atgccccaca ccatgccatg tgttaggggc ccatttcctt agggaggcag 300

ctatggggaa ttttggacaa tgtgggaaac cctgatccaa caatgccgcg tgtgtgaata 360

aggccttcgg gttgtaaagc acttttatcc ggatagattc cttttgggct aaacctccgt 420

aggggatgac ggtaccggaa gaataaccac cgggtaacta cgtgccagca gccgcggtaa 480

tacgtagggt gcgagcgtta atcggaatta ctgggcgtaa agcgtgcgca ggcggtttgt 540

taagacagat gtgaaatccc cgggcttaac ctgggaactg catttgtgac tggcaagcta 600

gagtatggca gacgggggta gaattccacg tgtagcagtg aaatgcgtag agatgtggag 660

gaataccgat gggcgaagca gctcctgggg caatactgac gctcatgcac aagatcgtgc 720

gaaacaaaca ggataaaacc cctgtattcc acgcccaaaa cgatgtccac caagttgttg 780

gcgatccttt ccttcgtatc gtagctacgc gggaatttga ccccctgggg actaggccgc 840

atataaaact caagggaatt ccggggaccc ccagagctgt gtatgatgtg attattccga 900

tgcgcggaaa accttcctta tctttgaatg gcggtactcc tgaaaattgc ggagtgctcg 960

aaaacaccga acccgggtct ttctgcgtgt cctccctcgt gtgggatatg ctggatatcc 1020

cgcagacgca tctttgactt agtgctccca aaactgagag ctgggaggac tcgagagggg 1080

atccctgcct ccccggcttg ggtgctcccc ttatggggga aacaggtaca cgggggggatc 1140

atcccatacc ta 1152

<210> 12

<211> 1067

<212> DNA

<213> Burkholderia A396

<400> 12

tctaaggaga ctgccggtga caaaccggag gaaggtgggg atgacgtcaa gtcctcatgg 60

cccttatggg tagggcttca cacgtcatac aatggtcgga acagagggtt gccaacccgc 120

gaggggggagc taatcccaga aaaccgatcg tagtccggat tgcactctgc aactcgagtg 180

catgaagctg gaatcgctag taatcgcgga tcagcatgcc gcggtgaata cgttcccggg 240

tcttgtacac accgcccgtc acaccatggg agtgggtttt accagaagtg gctagtctaa 300

ccgcaaggag gacggtcacc acggtaggat tcatgactgg ggtgaagtcg taacaaggta 360

gccgtatcgg aaggtgcggc tggatcacct ccttaaaccc tttggcctaa taaccccggg 420

ggaataagta ccgaaaaaaa aaaaaactgg ataacttccg tgccacaacc cgcggaaaaa 480

tctaggggggg gggagcttaa atggaaattt acggggccgt aaagcgtgcg caggcggttt 540

gtaaacacag atgtgaaatc cccgggctta acctgggaac tgcatttgtg actggcaagc 600

tagagtatgg cacaggggggg tagaattcca cgtgtagcat tgaatgcata gagatgagag 660

gataccgatg gagaagggcg cccccgggga caatatgacg cctatgccac aaagctgtgg 720

cacaataggt taaatacctg tgttgtcccc gcctaaacag attacacttg ttgtgggtat 780

tttctcataa aatactacac acgggagaat acactggggg gcttcgtcaa ttatcacaac 840

aatgattgcg ggcacccacg ggggtagatg ggtaataaat cgacggcaac tatctactta 900

cttggatgat cgcacagatt gggcgggaga gaagagaaca gcgtgtgtgt gctcctccgc 960

gagtgatagg taatcggaca atactttgac aggacttaac tgggtagcgg gatcgagtgg 1020

attcccgtcg gatggcctcc gcaggtacgg cagctgggga ttacatc 1067

<210> 13

<211> 1223

<212> DNA

<213> Burkholderia A396

<400> 13

ttgcttacga cttcacccca gtcatgaatc ctaccgtggt gaccgtcctc cttgcggtta 60
gactagccac ttctggtaaa acccactccc atggtgtgac gggcggtgtg tacaagaccc 120

gggaacgtat tcaccgcggc atgctgatcc gcgattacta gcgattccag cttcatgcac 180

tcgagttgca gagtgcaatc cggactacga tcggttttct gggattagct ccccctcgcg 240

ggttggcaac cctctgttcc gaccattgta tgacgtgtga agccctaccc ataagggcca 300

tgaggacttg acgtcatccc caccttcctc cggtttgtca ccggcagtct ccttagagtg 360

ctcttgcgta gcaactaagg acaagggttg cgctcgttgc gggacttaac ccaacatctc 420

acgacacgag ctgacgacag ccatgcagca cctgtgtatc ggttctcttt cgagcactcc 480

cgaatctctt caggattccg accatgtcaa gggtaggtaa ggtttttcgc gttgcatcga 540

attaatccac atcatccacc gcttgtgcgg gtccccgtca attcctttga gttttaatct 600

tgcgaccgta ctccccaggc ggtcaacttc acgcgttagc tacgttacta aggaaatgaa 660

tccccaacaa ctagttgaca tcgtttaggg cgtggactac cagggtatct aatcctgttt 720

gctccccacg ctttcgtgca tgagcgtcag tattggccca gggggctgcc ttcgccatcg 780

gtattcctcc acatctctac gcatttcact gctacacgtg gaattctacc cccctctgcc 840

atactctagc ttgccagtca caaatgcagt tcccaggtta agcccgggga tttcacatct 900

gtcttaacaa accgcctgcg cacgctttac gcccagtaat tccgattaac gctcgcaccc 960

tacgtattac cgcggctgct ggcacgtagt tagccggtgc ttattctgcg gtaccgtcat 1020

cccccgggta tagcccaaag gattctttcg acaaagtgct ttacacccga tgtctctcac 1080

acacgcgcat gctgatcagg tttccccatg tcaaagtcca ctgctgctcg taggtctgga 1140

cgggttcagt tcaatgtgac tgatcgtctt tcgacaacta ctgaacgtcc ctgtagctta 1200

cccaccaact agctatagca tgc 1223

<210> 14

<211> 1216

<212> DNA

<213> Burkholderia A396

<400> 14

ccgagctgac gacagccatg cagcacctgt gtatcggttc tctttcgagc actcccgaat 60

ctcttcagga ttccgaccat gtcaagggta ggtaaggttt ttcgcgttgc atcgaattaa 120

tccacatcat ccaccgcttg tgcgggtccc cgtcaattcc tttgagtttt aatcttgcga 180

ccgtactccc caggcggtca acttcacgcg ttagctacgt tactaaggaa atgaatcccc 240

aacaactagt tgacatcgtt tagggcgtgg actaccaggg tatctaatcc tgtttgctcc 300

ccacgctttc gtgcatgagc gtcagtattg gcccaggggg ctgccttcgc catcggtatt 360

cctccacatc tctacgcatt tcactgctac acgtggaatt ctacccccct ctgccatact 420

ctagcttgcc agtcacaaat gcagttccca ggttaagccc ggggatttca catctgtctt 480

aacaaaccgc ctgcgcacgc tttacgccca gtaattccga ttaacgctcg caccctacgt 540

attaccgcgg ctgctggcac gtagttagcc ggtgcttatt cttccggtac cgtcatcccc 600

ccggggtatt agcccaaagg atttctttcc ggacaaaagt gctttacaac ccgaaggcct 660

tcttcacaca cgcggcattg ctggatcagg gtttccccca ttgtccaaaa ttccccactg 720

ctgcctcccg taggagtctg ggccgtgtct cagtcccagt gtggctgatc gtcctctcag 780

accagctact gatcgtcgcc ttggtaggcc tttaccccac caactagcta atcagccatc 840

ggccaaccct atagcgcgag gtccgaagat cccccgcttt catccgtaga tcgtatgcgg 900

tattaatccg gctttcgccg ggctatcccc cactacagga catgttccga tgtattactc 960

acccgttcgc cactcgcccc aggtgcaagc acccgtgctg ccgttcgact tgcatgtgta 1020

gcatgcgcag cgtcatctac taaataaaca actctaagaa tttttgcccg agggcctcta 1080

aacactcggg gcgtcgagag agactacgga tgaggagcat ccctctgtct ctaggtatgt 1140

gttgtcgcct ctctcacaga ggaggggacg cacgacggag ccatcgggga cgacaacatg 1200

tacgatatac tatcta 1216

<210> 15

<211> 1194

<212> DNA
<213> Burkholderia A396

<400> 15

ttcttcggta ccgtcatccc cccggggtat tagcccaaag gatttctttc cggacaaaag 60

tgctttacaa cccgaaggcc ttcttcacac acgcggcatt gctggatcag ggtttccccc 120

attgtccaaa attccccact gctgcctccc gtaggagtct gggccgtgtc tcagtcccag 180

tgtggctgat cgtcctctca gaccagctac tgatcgtcgc cttggtaggc ctttacccca 240

ccaactagct aatcagccat cggccaaccc tatagcgcga ggtccgaaga tcccccgctt 300

tcatccgtag atcgtatgcg gtattaatcc ggctttcgcc gggctatccc ccactacagg 360

acatgttccg atgtattact cacccgttcg ccactcgcca ccaggtgcaa gcacccgtgc 420

tgccgttcga cttgcatgtg taaggcatgc cgccagcgtt caatctgagc catgatcaaa 480

ctctgagggg gggggccttc aacggaacga ctgggcaaaa agcgtgccca ggcgttttgt 540

taagacagat gtgaaacccc ggggcttaac ctggaaactg catttgtgac tggaaagcta 600

gagtatggca gagggggggta gaattccacg tgtagcattg aaatgcgtag aaatggagag 660

gaataccgat gggagagggc agcccccgtg ggcaaatact ggcgcttatg aacaaagttg 720

gggcgcgccg ccgggatatg ttcccctggg atatcccccc cctaaactgc ttacaaatat 780

tgtgtgggaa acttttctc taaaaaatag aacacaacgg gagatatcac ccccgggggg 840

ccaccgccag attaaacccc caaaaagtat ttggcgggca ccccccgggg gggtgagatg 900

gggtaaaata aatccgtgcg acgagcaaac cctccccaca cctgggatgg tcgcgaccac 960

agatgagatg cgggcggaga gaacgatacc caagcgtggt tgtttgcctg catcccctcc 1020

gtcgggagtg gatatagtag agtaattacg gcacgactgc attttttttt cttcagtaca 1080

ccttatcaca ctgttggatg caccgcgaga aatccggagg tgtgagtact ccccccctct 1140

cctcgggatg tgtcggcgct cccttctccc gttcaggggt gggtaagcac cgcg 1194

Figura 1

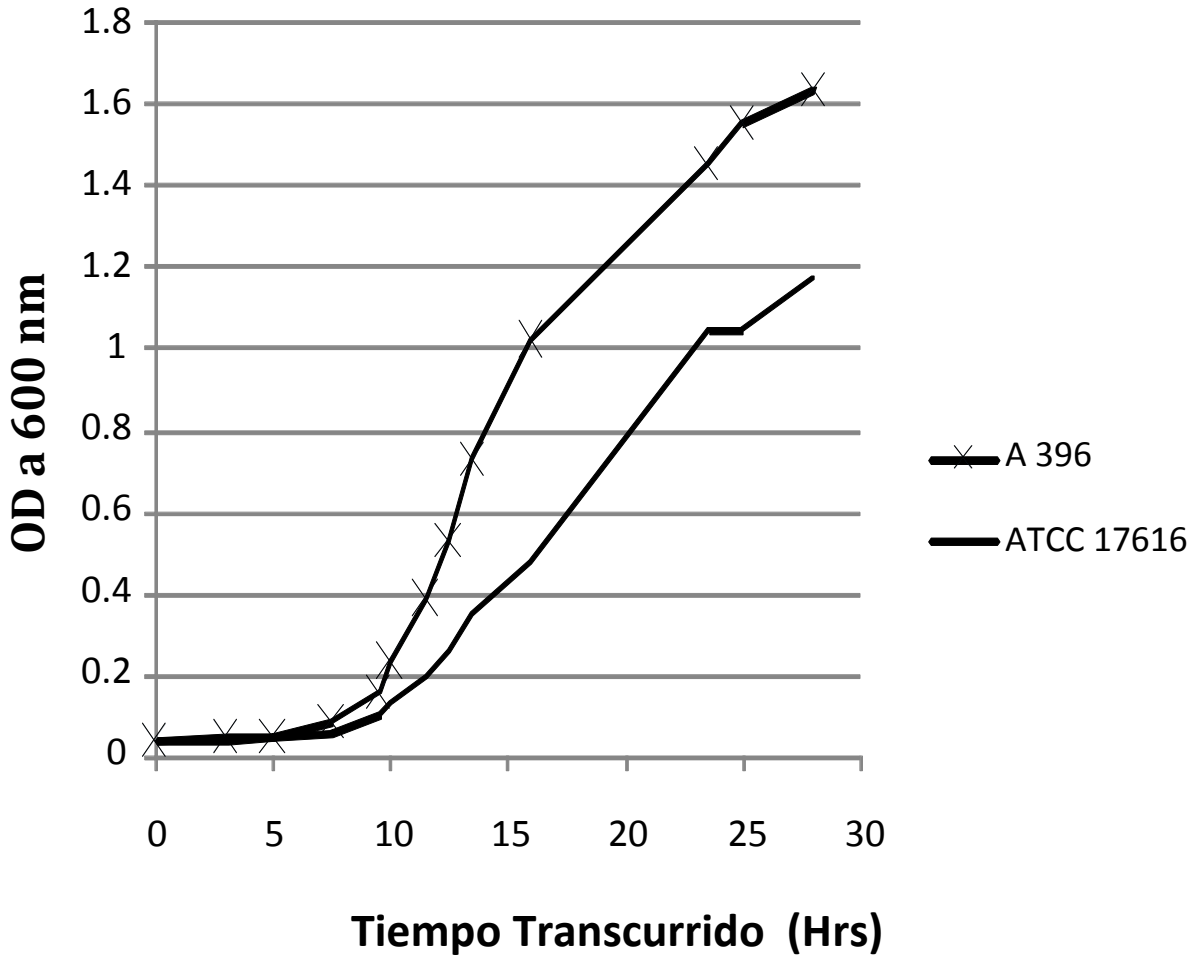

1.8
1.6
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
OD a 600 nm
0
5
10
15
20
25
30
Tiempo Transcurrido (Hrs)
A 396
ATCC 17616

Figura 2


UTC (parte trasera)
A396 @ 5 mg/mL (parte media)
A396 @ 10 mg/mL (parte delantera)

Figura 3

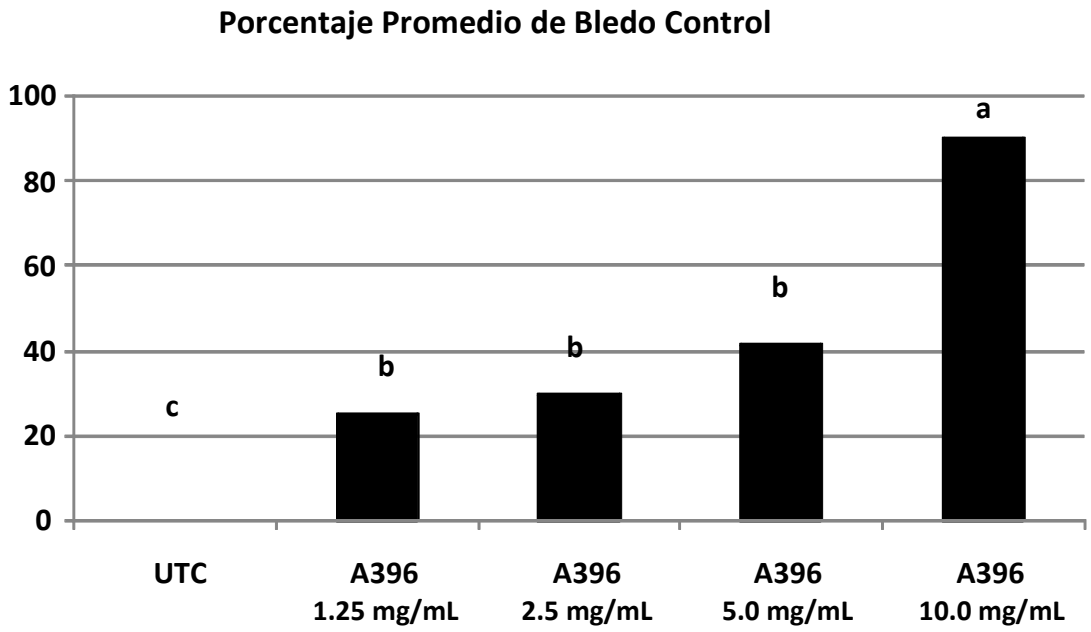

Porcentaje Promedio de Bledo Control
100
80
60
40
20
0
c
b
b
b
a
UTC
A396
1.25 mg/mL
A396
2.5 mg/mL
A396
5.0 mg/mL
A396
10.0 mg/mL

Figura 4

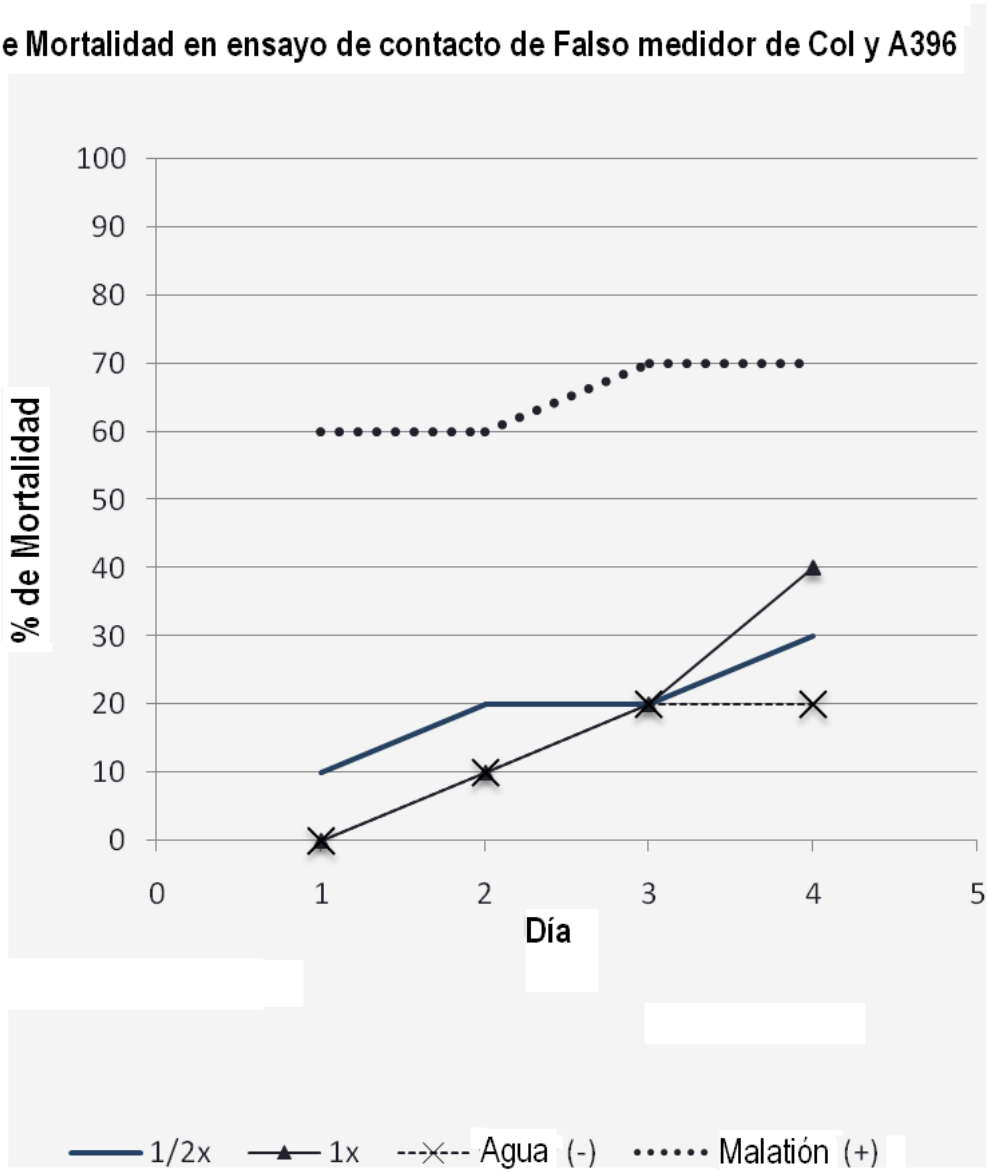

% de Mortalidad en ensayo de contacto de Falso medidor de Col y A396
% de Mortalidad
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
1
2
3
4
5
Día
1/2x
1x
Agua (-)
Malatión (+)

Figura 5

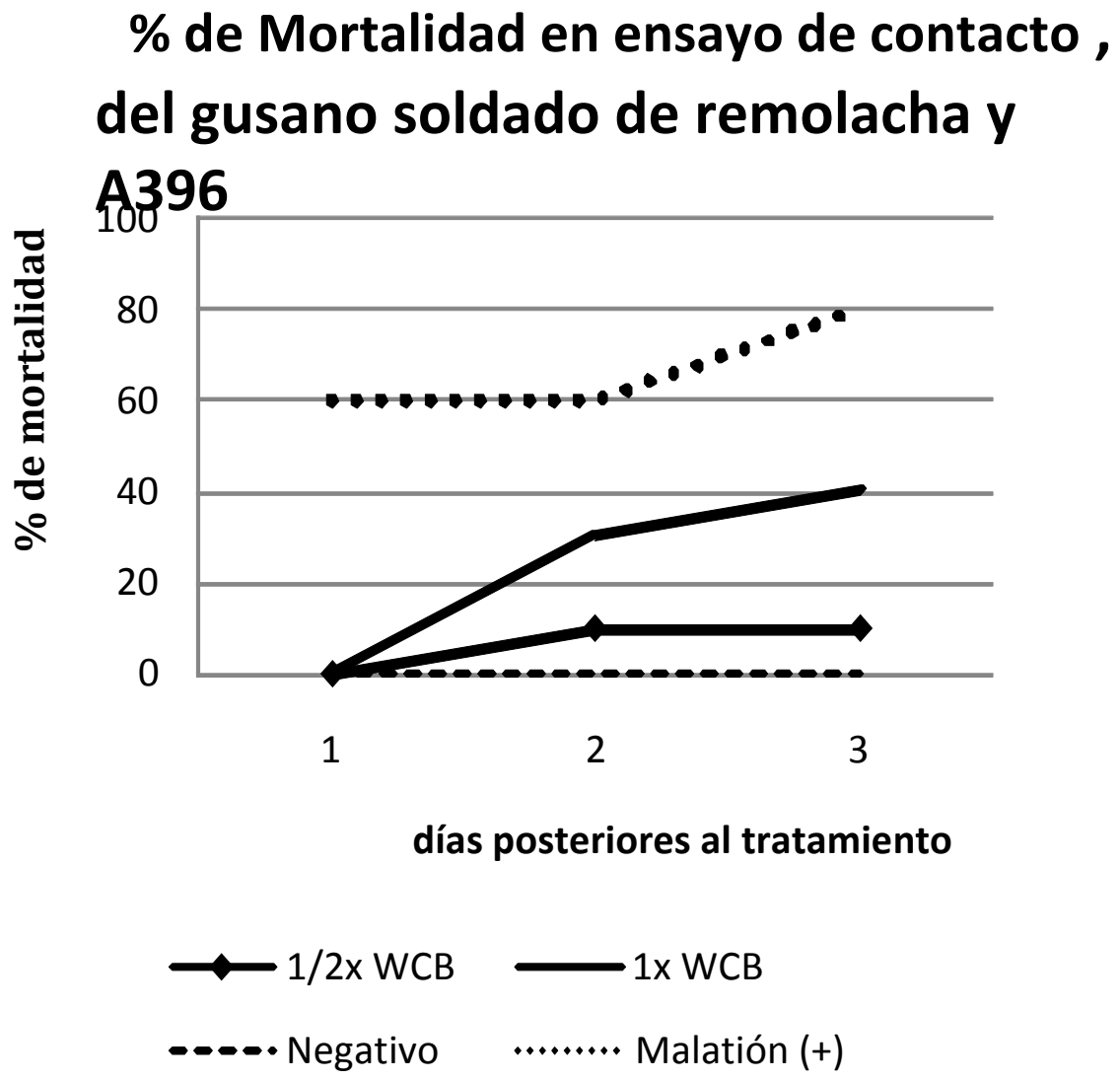

% de Mortalidad en ensayo de contacto , del gusano soldado de remolacha y A396
% de mortalidad
100
80
60
40
20
0
1
2
3
días posteriores al tratamiento
1/2x WCB
1x WCB
Negativo
Malatión (+)

Figura 6

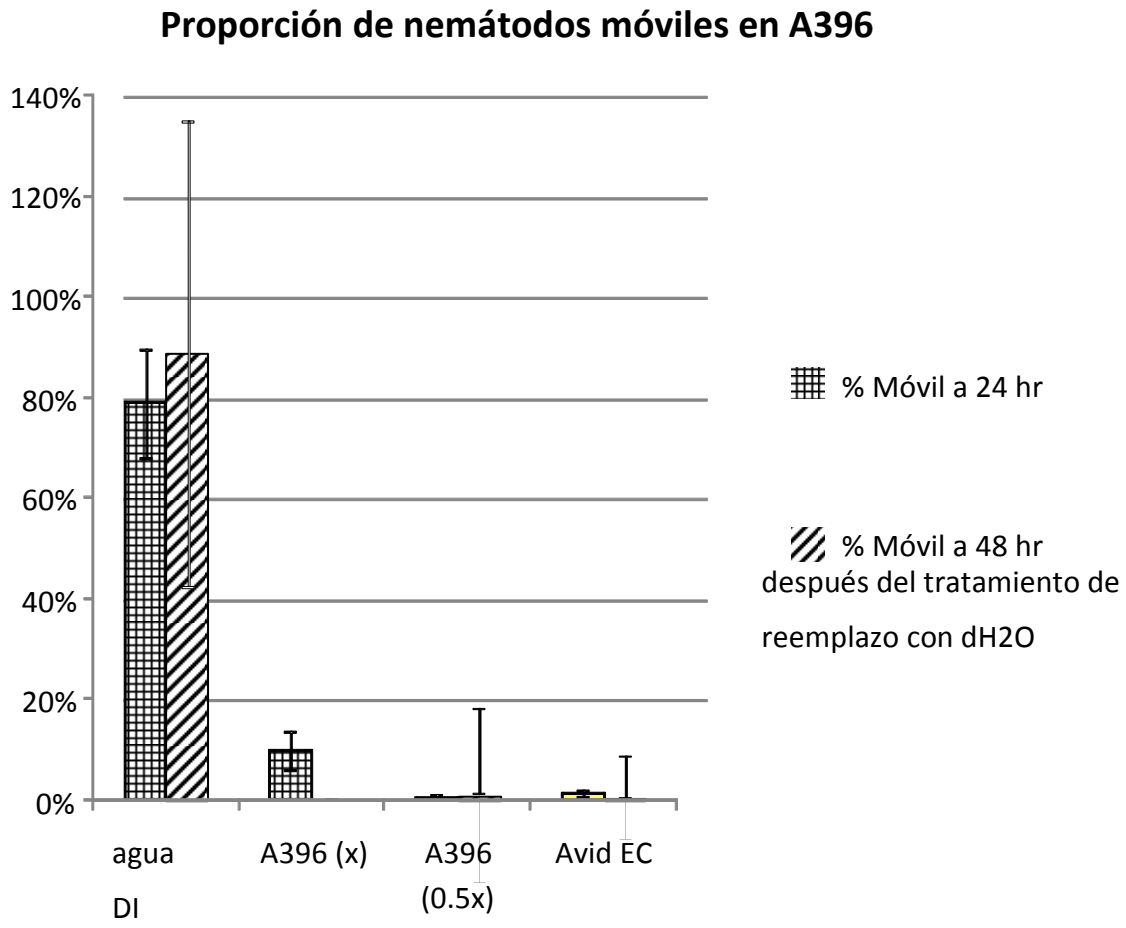

Proporción de nemátodos móviles en A396
140%
120%
100%
80%
60%
40%
20%
0%
agua DI
A396 (x)
A396 (0.5x)
Avid EC
% Móvil a 24 hr
% Móvil a 48 hr después del tratamiento de reemplazo con dH2O

Figura 7

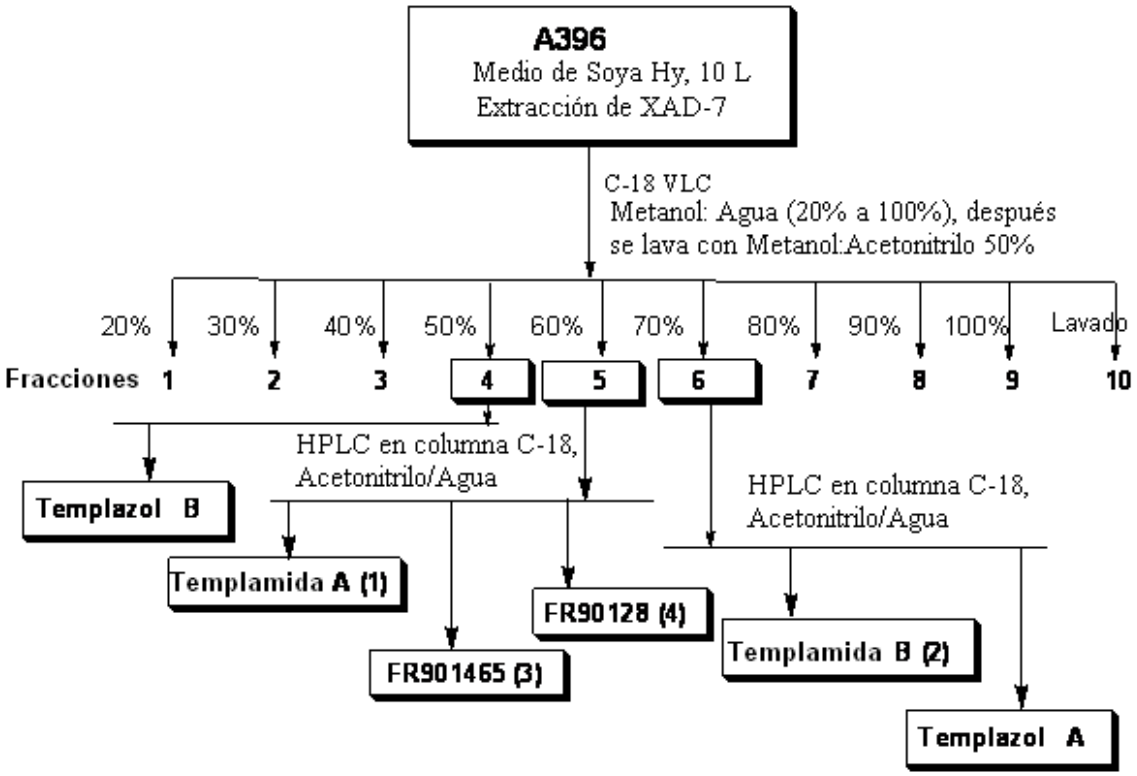

A396
Medio de Soya Hy, 10 L
Extracción de XAD-7
C-18 VLC
Metanol: Agua (20% a 100%), después se lava con Metanol:Acetonitrilo 50%
20%
30%
40%
50%
60%
70%
80%
90%
100%
Lavado
Fracciones 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
HPLC en columna C-18, Acetonitrilo/Agua
HPLC en columna C-18, Acetonitrilo/Agua
Templazol B
Templamida A (1)
FR901465 (3)
FR90128 (4)
Templamida B (2)
Templazol A

Figura 8

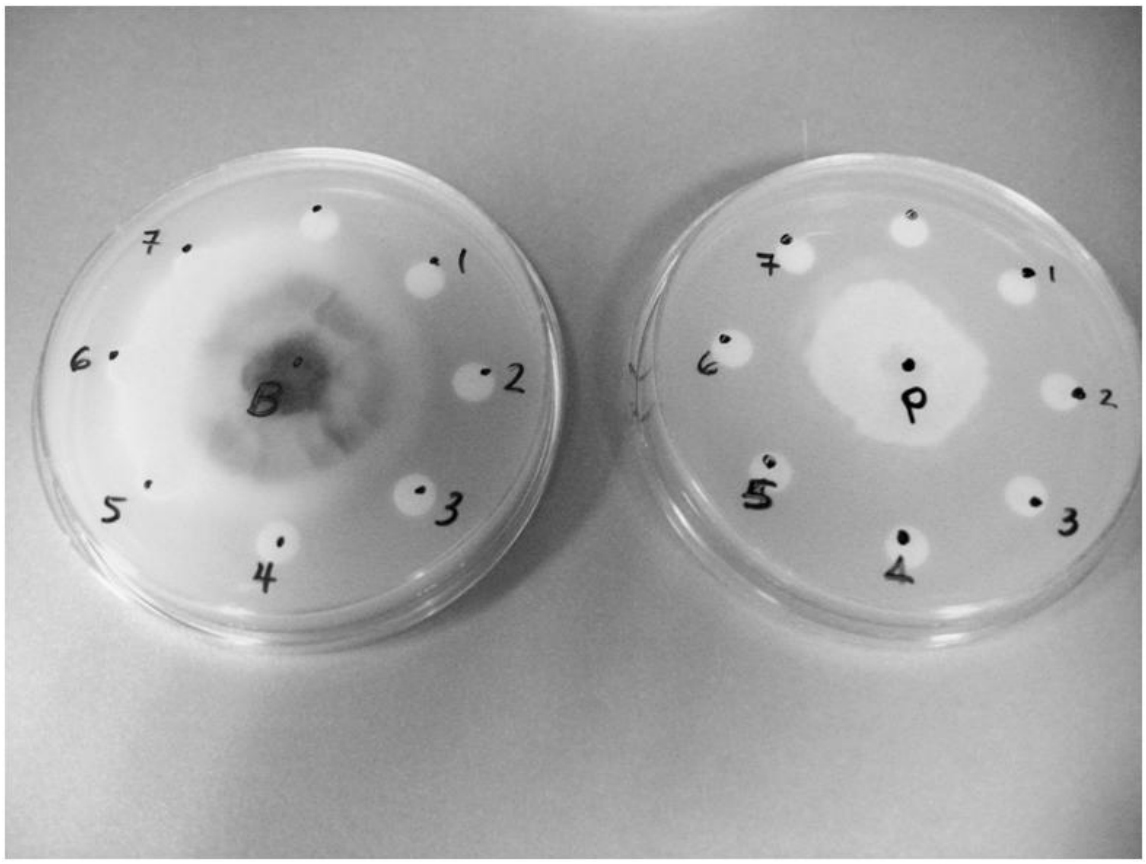


Figura 9

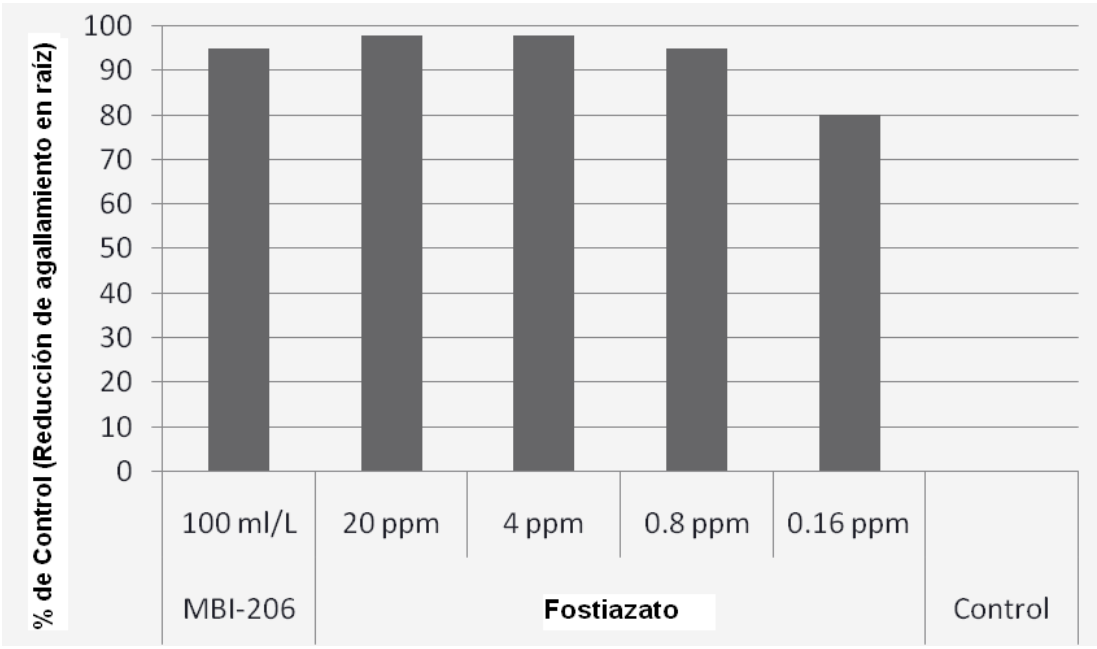
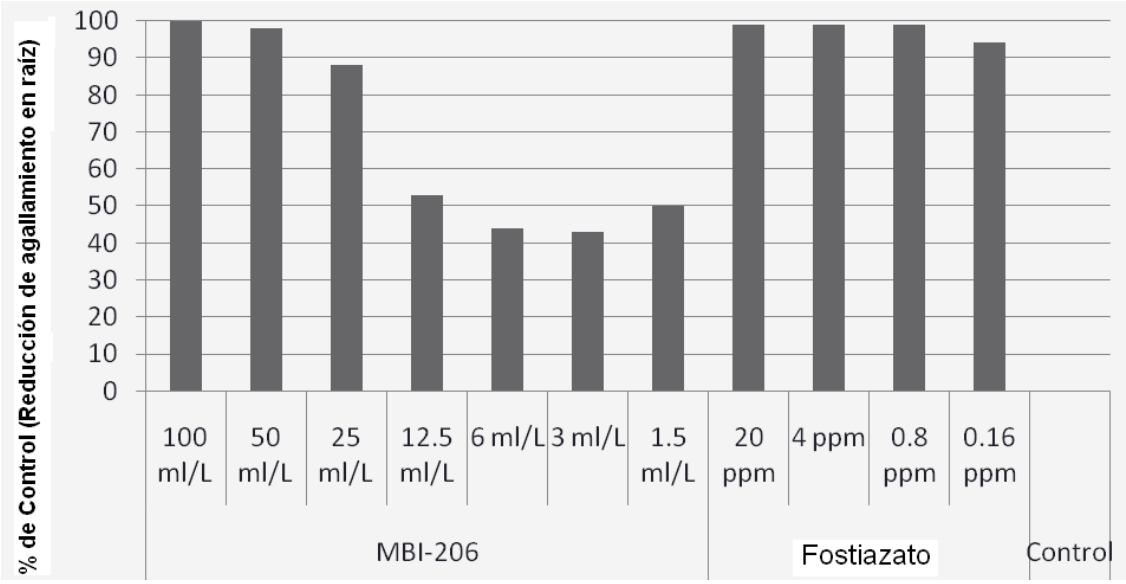

% de Control (Reducción de agallamiento en raíz)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
100 ml/L
20 ppm
4 ppm
0.8 ppm
0.16 ppm
MBI-206
Fostiazato
Control

Figura 10


% de Control (Reducción de agallamiento en raíz)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
100 ml/L
50 ml/L
25 ml/L
12.5 ml/L
6 ml/L
3 ml/L
1.5 ml/L
20 ppm
4 ppm
0.8 ppm
0.16 ppm
MBI-206
Fostiazato
Control

ADVANCE E-MAIL

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING OF A CHANGE

(PCT Rule 92*bis*.1 and Administrative Instructions, Section 422)

To:

AGRIS, Cheryl, H.
The Law Offices Of Cheryl H. Agris, Phd, PC
P.O. Box 8495
Pelham, NY 10803
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing *(day/month/year)*
28 April 2011 (28.04.2011)

Applicant's or agent's file reference
MOI-42016-PCT

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.
PCT/US2011/026016

International filing date *(day/month/year)*
24 February 2011 (24.02.2011)

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant ☒ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address

State of Nationality | State of Residence

Telephone No.

Facsimile No.

E-mail address

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☒ the person ☐ the name ☐ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address
HUANG, Huazhang
2674 Briscoe Place
Woodland, CA 95776
United States of America

State of Nationality: CN | State of Residence: US

Telephone No.

Facsimile No.

E-mail address
☐ Notifications by e-mail authorized

3. Further observations, if necessary:
The person identified in Box 2 should be added to the record as applicant for the United States of America only and inventor for all designated States.

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office
☒ the International Searching Authority
☐ the Authority(ies) specified for supplementary search
☐ the International Preliminary Examining Authority
☐ the designated Offices concerned
☐ the elected Offices concerned
☐ other:

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. +41 22 338 87 20

Authorized officer
Giffo Schmitt Beate
e-mail pt03.pct@wipo.int
Telephone No. +41 22 338 74 03

TRATADO DE COOPERACIÓN INTERNACIONAL EN MATERIA DE PATENTES

ADELANTO POR E-MAIL

De la OFICINA INTERNACIONAL

PCT

Notificación de registro de una modificación

(regla PCT 92bis.1 e Instrucciones Administrativas , sección 422)

A:

AGRIS, Cheryl, H.
The Law Offices Of Cheryl H. Agris, PhD, PC
PO Box 8495
Pelham, NY 10803
Estados Unidos de América

Fecha de envío (*día/mes/año*):
28 de abril de 2011 (28.04.2011)

Referencia del solicitante o del agente:
MOI-42016-PCT

NOTIFICACIÓN IMPORTANTE

Solicitud Internacional Nº:
PCT/US 2011/026016

Fecha de presentación internacional (*día/mes/año*):
24 de febrero de 2011(24.02.2011)

1. Las siguientes indicaciones aparecen en los registros concernientes a:
☒ el solicitante ☒ el inventor ☐ el agente ☐ el representante común

Nombre y dirección:

País de Nacionalidad | País de Residencia

Teléfono Nº:

Facsímil Nº:

Dirección de E-mail

2. La Oficina Internacional notifica por este medio al solicitante que se registró la siguiente modificación, concerniente a:
☒ la persona ☐ el nombre ☐ el domicilio ☐ la nacionalidad ☐ la residencia

Nombre y dirección:

HUANG, Huazhang
2674 Briscoe Place
Woodland, CA 95776
Estados Unidos de América

País de Nacionalidad: *CN* | País de Residencia: *US*

Teléfono Nº:

Facsímil Nº:

Dirección de E-mail

☐ Se autoriza notificar por E-mail

3. Otras observaciones, si son necesarias:
La persona identificada en el campo 2 debe ser agregada al registro como solicitante solo para los Estados Unidos de América y como inventor para todos los países designados.

4. Se envía una copia de esta notificación a:

☒ la Oficina receptora
☒ el Organismo de Búsqueda Internacional
☐ el Organismo especificado para búsquedas suplementarias
☐ el Organismo de Examen Preliminar Internacional
☐ las Oficinas designadas concernientes
☐ las Oficinas seleccionadas concernientes
☐ otros:

La Oficina Internacional de WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Suiza

Facsímil Nº: +41 22 338 87 20

Funcionario autorizado:
Giffo-Schmitt Beate
e-mail: pt03.pct@wipo.int
Teléfono Nº: *+41 22 338 74 03*

ADVANCE E-MAIL

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING OF A CHANGE

(PCT Rule 92*bis*.1 and Administrative Instructions, Section 422)

To:

AGRIS, Cheryl, H.
The Law Offices Of Cheryl H. Agris, Phd, PC
P.O. Box 8495
Pelham, NY 10803
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing *(day/month/year)*
28 April 2011 (28.04.2011)

Applicant's or agent's file reference
MOI-42016-PCT

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.
PCT/US2011/026016

International filing date *(day/month/year)*
24 February 2011 (24.02.2011)

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant ☒ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address

State of Nationality | State of Residence

Telephone No.

Facsimile No.

E-mail address

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☒ the person ☐ the name ☐ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address
CORDOVA-KREYLOS, Ana Lucia
18 Simmons Way
Davis, CA 95616
United States of America

State of Nationality: MX | State of Residence: US

Telephone No.

Facsimile No.

E-mail address
☐ Notifications by e-mail authorized

3. Further observations, if necessary:
The person identified in Box 2 should be added to the record as applicant for the United States of America only and inventor for all designated States.

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office
☒ the International Searching Authority
☐ the Authority(ies) specified for supplementary search
☐ the International Preliminary Examining Authority
☐ the designated Offices concerned
☐ the elected Offices concerned
☐ other:

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. +41 22 338 87 20

Authorized officer
Giffo Schmitt Beate
e-mail pt03.pct@wipo.int
Telephone No. +41 22 338 74 03

TRATADO DE COOPERACIÓN INTERNACIONAL EN MATERIA DE PATENTES

ADELANTO POR E-MAIL

De la OFICINA INTERNACIONAL

PCT

Notificación de registro de una modificación

(regla PCT 92bis.1 e Instrucciones Administrativas , sección 422)

A:

AGRIS, Cheryl, H.
The Law Offices Of Cheryl H. Agris, PhD, PC
PO Box 8495
Pelham, NY 10803
Estados Unidos de América

Fecha de envío (*día/mes/año*):
28 de abril de 2011 (28.04.2011)

Referencia del solicitante o del agente:
MOI-42016-PCT

NOTIFICACIÓN IMPORTANTE

Solicitud Internacional Nº:
PCT/US 2011/026016

Fecha de presentación internacional (*día/mes/año*):
24 de febrero de 2011

1. Las siguientes indicaciones aparecen en los registros concernientes a:
☒ el solicitante ☒ el inventor ☐ el agente ☐ el representante común

Nombre y dirección:

País de Nacionalidad | País de Residencia

Teléfono Nº:

Facsímil Nº:

Dirección de E-mail

2. La Oficina Internacional notifica por este medio al solicitante que se registró la siguiente modificación, concerniente a:
☒ la persona ☐ el nombre ☐ el domicilio ☐ la nacionalidad ☐ la residencia

Nombre y dirección:

CORDOVA-KREYLOS, Ana Lucia
18 Simmons Way
Davis, CA 95616
Estados Unidos de América

País de Nacionalidad: *MX* | País de Residencia: *US*

Teléfono Nº:

Facsímil Nº:

Dirección de E-mail

☐ Se autoriza notificar por E-mail

3. Otras observaciones, si son necesarias:
La persona identificada en el campo 2 debe ser agregada al registro como solicitante solo para los Estados Unidos de América y como inventor para todos los estados designados.

4. Se envía una copia de esta notificación a:

☒ la Oficina receptora
☒ el Organismo de Búsqueda Internacional
☐ el Organismo especificado para búsquedas suplementarias
☐ el Organismo de Examen Preliminar Internacional
☐ las Oficinas designadas concernientes
☐ las Oficinas seleccionadas concernientes
☐ otros:

La Oficina Internacional de WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Suiza

Facsímil Nº: +41 22 338 87 20

Funcionario autorizado:
Giffo-Schmitt Beate
e-mail: pt03.pct@wipo.int
Teléfono Nº: *+41 22 338 74 03*

ADVANCE E-MAIL

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING OF A CHANGE

(PCT Rule 92*bis*.1 and Administrative Instructions, Section 422)

To:

AGRIS, Cheryl, H.
The Law Offices Of Cheryl H. Agris, Phd, PC
P.O. Box 8495
Pelham, NY 10803
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing *(day/month/year)*
28 April 2011 (28.04.2011)

Applicant's or agent's file reference
MOI-42016-PCT

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.
PCT/US2011/026016

International filing date *(day/month/year)*
24 February 2011 (24.02.2011)

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant ☐ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address
MARRONE BIO INNOVATIONS, INC.
2121 Second Street, Suite 107b
Davis, CA 95618
United States of America

State of Nationality: US
State of Residence: UA
Telephone No.: 530-750-2800
Facsimile No.: 530-750-2802
E-mail address:

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☐ the person ☐ the name ☐ the address ☐ the nationality ☒ the residence

Name and Address
MARRONE BIO INNOVATIONS, INC.
2121 Second Street, Suite 107B
Davis, CA 95618
United States of America

State of Nationality: US
State of Residence: US
Telephone No.: 530-750-2800
Facsimile No.: 530-750-2802
E-mail address:
☐ Notifications by e-mail authorized

3. Further observations, if necessary:

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office
☒ the International Searching Authority
☐ the Authority(ies) specified for supplementary search
☐ the International Preliminary Examining Authority
☐ the designated Offices concerned
☐ the elected Offices concerned
☐ other:

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. +41 22 338 87 20

Authorized officer
Giffo Schmitt Beate
e-mail pt03.pct@wipo.int
Telephone No. +41 22 338 74 03

TRATADO DE COOPERACIÓN INTERNACIONAL EN MATERIA DE PATENTES

ADELANTO POR E-MAIL

De la OFICINA INTERNACIONAL

PCT

Notificación de registro de una modificación

(regla PCT 92bis.1 e Instrucciones Administrativas , sección 422)

A:

AGRIS, Cheryl, H.
The Law Offices Of Cheryl H. Agris, PhD, PC
PO Box 8495
Pelham, NY 10803
Estados Unidos de América

Fecha de envío (*día/mes/año*):
28 de abril de 2011 (28.04.2011)

Referencia del solicitante o del agente:
MOI-42016-PCT

NOTIFICACIÓN IMPORTANTE

Solicitud Internacional Nº:
PCT/US 2011/026016

Fecha de presentación internacional (*día/mes/año*):
24 de febrero de 2011

1. Las siguientes indicaciones aparecen en los registros concernientes a:

☒ el solicitante ☐ el inventor ☐ el agente ☐ el representante común

Nombre y dirección:

MARRONE BIO INNOVATIONS, INC,
2121 Second Street, Suite 107b
Davis, CA 95618
Estados Unidos de América

País de Nacionalidad: *US*
País de Residencia: *US*
Teléfono Nº: *530-750-2800*
Facsímil Nº: *530-750-2802*
Dirección de E-mail:

2. La Oficina Internacional notifica por este medio al solicitante que se registró la siguiente modificación, concerniente a:

☐ la persona ☐ el nombre ☐ el domicilio ☐ la nacionalidad ☒ la residencia

Nombre y dirección:

MARRONE BIO INNOVATIONS, INC,
2121 Second Street, Suite 107B
Davis, CA 95618
Estados Unidos de América

País de Nacionalidad: *US*
País de Residencia: *US*
Teléfono Nº: *530-750-2800*
Facsímil Nº: *530-750-2802*
Dirección de E-mail:

☐ Se autoriza notificar por E-mail

3. Otras observaciones, si son necesarias:

4. Se envía una copia de esta notificación a:

☒ la Oficina receptora
☒ el Organismo de Búsqueda Internacional
☐ el Organismo especificado para búsquedas suplementarias
☐ el Organismo de Examen Preliminar Internacional
☐ las Oficinas designadas concernientes
☐ las Oficinas seleccionadas concernientes
☐ otros:

La Oficina Internacional de WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Suiza

Facsímil Nº: +41 22 338 87 20

Funcionario autorizado:
Giffo-Schmitt Beate
e-mail: pt03.pct@wipo.int
Teléfono Nº: *+41 22 338 74 03*

(12) PUBLICACIÓN DE LA SOLICITUD INTERNACIONAL BAJO PCT

(19) Organización Mundial de Propiedad Intelectual
Oficina internacional

(43) Fecha de publicación internacional
1° de septiembre de 2011 (01.09.2011)

(10) Número de publicación internacional
WO 2011/106491 A3

(51) Clasificación internacional de Patentes:
C12N 1/20 (2006.01) ***A01N 43/14*** (2006.01)
A01N 63/02 (2006.01) ***A01P 7/00*** *(2006.01)*
A01N 43/74 (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/US2011/026016

(22) Fecha de la presentación internacional
24 de febrero de 2011 (24.02.2011)

(25) Idioma de la presentación: inglés

(26) Idioma de la publicación: inglés

(30) Datos de la prioridad
61/308,287 25 de febrero de 2010 (25.02.2010) US
61/406,541 25 de octubre de 2010 (25.10.2010) US

(71) Solicitante (*para todos los estados designados con excepción de US)* **MARRONE BIO INNOVATIONS, INC** [US/US]; 2121 Second Street Suite 107B, Davis, CA 95618 (US).

(72) Inventores; e
(75) Inventores/Solicitantes: *(solamente para US)* **ASOLKAR, Ratnakar** [IN/US]; 4005 Cowell Blvd, Davis, CA 95618 (US). **KOIVUNEN, Marja** [FI/US]; 1236 Evans Court, Davis, CA 95618 (US). **MARRONE, Pamela** [US/US]; 3333 Victoria Place, Davis, CA 95616 (US). **HUANG, Huazhang** [CN/US]; 2674 Briscoe Place, Woodland, CA 95776 (US). **CORDOVA-KREYLOS, Ana Lucia** [MX/US]; 18 Simmons Way, Davis, CA 95616 (US).

(74) Representante: AGRIS, Cheryl, H.; The Law Offices of Cheryl H. Agris, Phd, PC, P.O. Box 8495, Pelham, NY 10803 (US)

(81) Estados designados *(en la medida en que no se indique lo contrario para cada tipo de protección nacional disponible):*AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados: *(en la medida en que no se indique lo contrario para cada tipo de protección regional disponible*): Patente ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW) Patente euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), Patente europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR) OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declaración según regla 4.17:
- en referencia al derecho de la solicitante para solicitar una patente y obtenerla (regla 4.17 cifra ii)
- en relación a la legitimidad del solicitante para reivindicar la prioridad de una solicitud anterior (regla 4.17 (iii)).
- Con listado de secuencias como parte de la memoria (regla 5.2(a))

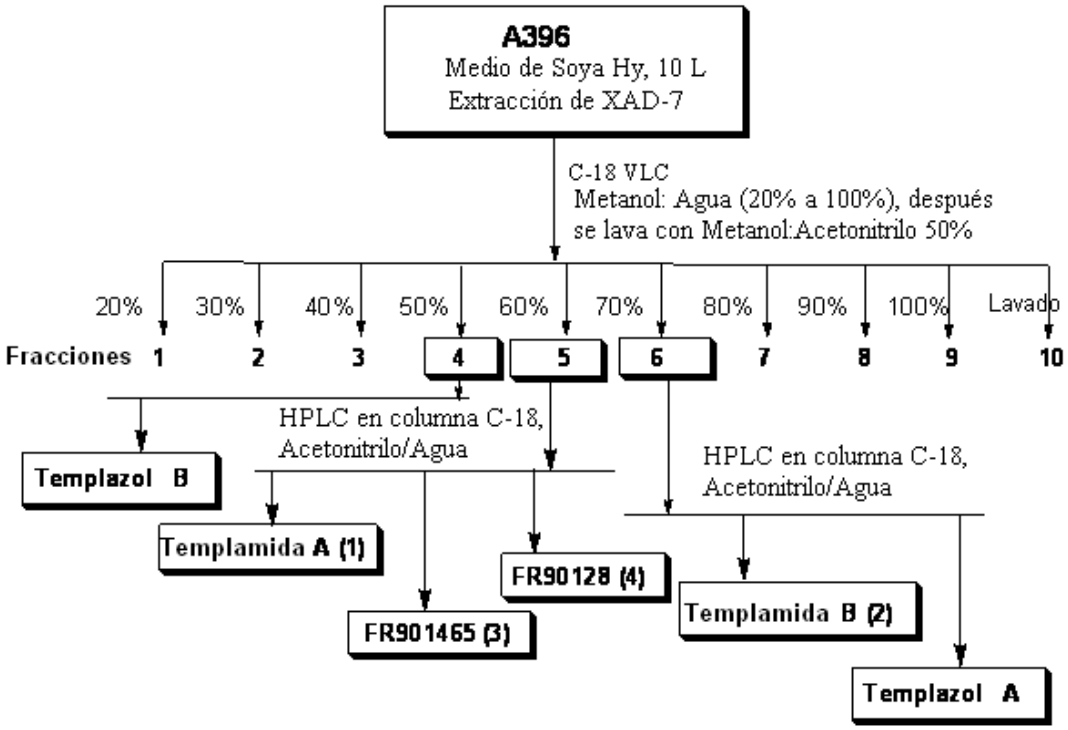
Publicado:
- *con el informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))*
- *antes de la expiración del límite de tiempo para enmendar las reivindicaciones y ser publicada en el evento de recepción de enmiendas (Regla 48.2 (h))*

(88) fecha de publicación del informe de búsqueda internacional 15 de marzo de 2012

(54) Título: CEPA BACTERIANA AISLADA DEL GÉNERO *BURKHOLDERIA* Y METABOLITOS PESTICIDAS DEL MISMO

(57) Resumen: La presente invención se refiere a especies de *Burkholderia sp* sin patogenicidad conocida a vertebrados pero con actividad pesticida (por ejemplo, plantas, insectos, hongos, malezas y nemátodos). También se proporcionan productos naturales derivados de un cultivo de las especies y métodos para controlar las plagas usando los productos naturales.

Figura 7



PATENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

To:

AGRIS CHERYL, H.

THE LAW OFFICES OF CHERYL H. AGRIS, PHD, PC P.O. BOX 8495 PELHAM NY 10803 USA

RECEIVED
2012
CHERYL H. AGRIS Ph. D.
ATTORNEY AT LAW

PCT

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT AND THE WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY, OR THE DECLARATION

(PCT Rule 44.1)

Date of mailing *(day/month/year)* 18 JANUARY 2012 (18.01.2012)	
Applicant's or agent's file reference MOI-42016-PCT	**FOR FURTHER ACTION** See paragraphs 1 and 4 below
International application No. **PCT/US2011/026016**	International filing date *(day/month/year)* **24 FEBRUARY 2011 (24.02.2011)**

Applicant

MARRONE BIO INNOVATIONS, INC. et al

1. ☒ The applicant is hereby notified that the international search report and the written opinion of the International Searching Authority have been established and are transmitted herewith.

Filing of amendments and statement under Article 19:

The applicant is entitled, if he so wishes, to amend the claims of the international application (see Rule 46):

When? The time limit for filing such amendments is normally two months from the date of transmittal of the international search report.

Where? Directly to the International Bureau of WIPO, 34 chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland, Facsimile No.: +41 22 338 82 70

For more detailed instructions, see *PCT Applicant's Guide*, International Phase, paragraphs 9.004 . 9.011.

2. ☐ The applicant is hereby notified that no international search report will be established and that the declaration under Article 17(2)(a) to that effect and the written opinion of the International Searching Authority are transmitted herewith.

3. ☐ **With regard to any protest** against payment of (an) additional fee(s) under Rule 40.2, the applicant is notified that:

☐ the protest together with the decision thereon has been transmitted to the International Bureau together with any request to forward the texts of both the protest and the decision thereon to the designated Offices.

☐ no decision has been made yet on the protest; the applicant will be notified as soon as a decision is made.

4. **Reminders**

The applicant may submit comments on an informal basis on the written opinion of the International Searching Authority to the International Bureau. The International Bureau will send a copy of such comments to all designated Offices unless an international preliminary examination report has been or is to be established. Following the expiration of 30 months from the priority date, these comments will also be made available to the public.

Shortly after the expiration of **18 months** from the priority date, the international application will be published by the International Bureau. If the applicant wishes to avoid or postpone publication, a notice of withdrawal of the international application, or of the priority claim, must reach the International Bureau before the completion of the technical preparations for international publication (Rules 90bis.1 and 90bis.3).

Within **19 months** from the priority date, but only in respect of some designated Offices, a demand for international preliminary examination must be filed if the applicant wishes to postpone the entry into the national phase **until 30 months** from the priority date (in some Offices even later); otherwise, the applicant must, **within 20 months** from the priority date, perform the prescribed acts for entry into the national phase before those designated Offices.
In respect of other designated Offices, the time limit of **30 months** (or later) will apply even if no demand is filed within 19months.

For details about the applicable time limits, Office by Office, see www.wipo.int/pct/en/texts/time_limits.html and the PCT Applicant's Guide, National Chapters.

Name and mailing address of the ISA/KR Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon, 189 Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon 302-701, Republic of Korea	Authorized officer COMMISSIONER
Facsimile No. 82-42-472-7140	Telephone No. 82-42-481-8754

* Attention

Copies of the documents cited in the international search report can be searched in the following Korean Intellectual Property Office English website for three months from the date of mailing of the international search report.

http://www.kipo.go.kr/en/ => PCT Service => PCT Fees Payment

ID : PCT international application number
PW : **SKJ93DLA**

Inquiries related to PCT International Search Report or Written Opinion prepared by KIPO as an International Searching Authority can be answered not only by KIPO but also through IPKC (Intellectual Property Korea Center), located in Vienna, VA, which functions as a PCT Help Desk for PCT applicants.

Homepage: http://www.ipkcenter.com
Email: ipkc@ipkcenter.com
Phone: +1 703 388 1066
Fax: +1 703 388 1084

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference	FOR FURTHER ACTION	see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.
MOI-42016-PCT		
International application No.	International filing date *(day/month/year)*	(Earliest) Priority Date *(day/month/year)*
PCT/US2011/026016	**24 FEBRUARY 2011 (24.02.2011)**	25 FEBRUARY 2010 (25.02.2010)

Applicant

MARRONE BIO INNOVATIONS, INC. et al

This International search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 7 sheets.

☐ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report

1. **Basis of the report**
   a. With regard to the **language**, the international search was carried out on the basis of:
      ☒ the international application in the language in which it was filed
      ☐ a translation of the international application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))
   b. ☐ This international search report has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6*bis*(a)).
   c. ☒ With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, see Box No. I.
2. ☒ **Certain claims were found unsearchable** (See Box No. II)
3. ☒ **Unity of invention is lacking** (See Box No. III)
4. With regard to the **title,**
   ☒ the text is approved as submitted by the applicant.
   ☐ the text has been established by this Authority to read as follows:
5. With regard to the **abstract,**
   ☒ the text is approved as submitted by the applicant.
   ☐ the text has been established, according to Rule 38.2, by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority.
6. With regard to the drawings,
   a. the figure of the **drawings** to be published with the abstract is Figure No. 7
      ☒ as suggested by the applicant.
      ☐ as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure.
      ☐ as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention.
   b. ☐ none of the figure is to be published with the abstract.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2011/026016

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of :

   a. a sequence listing filed or furnished

   - ☐ on paper
   - ☒ in electronic form

   b. time of filing or furnishing

   - ☐ contained in the international application as filed
   - ☒ filed together with the international application in electronic form
   - ☐ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2011/026016

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☒ Claims Nos.: 8, 12, 16
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

Claims 8, 12, 16 are unclear, as they refer to the multiple dependent claim which does not refer to other claims in the alternative way. Claims 12, 16 are unclear, as they refer to the multiple dependent claims which are not drafted in accordance with the third sentence of Rule 6.4(a).

3. ☒ Claims Nos.: 3, 7-11, 13-15
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

See extra sheet

1. ☐ As all required addtional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-3, 7-16(partial)

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2011/026016

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 1/20(2006.01)i, A01N 63/02(2006.01)i, A01N 43/74(2006.01)i, A01N 43/14(2006.01)i, A01P 7/00(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N 1/20; A01N 63/00; A61K 31/351; A61K 31/5377

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean utility models and applications for utility models

Japanese utility models and applications for utility models

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS(KIPO internal) & Keywords: burkholderia, 16S rRNA, pesticidal activity, oxazolyl-indole structure, oxazolyl-benzyl structure

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	THEODORE SPILKER et al. PCR-Based Assay for Differentiation of Pseudomonas aeruginosa from Other Pseudomonas Species Recovered from Cystic Fibrosis Patients. JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY. 2004, Vol. 42, No. 5, pp. 2074-2079 See the whole document	1,2
A	US 2008-0096879 A1 (KAZUNORI KOIDE et al.) 24 April 2008 See the whole document	1,2
A	HIDENORI NAKAJIMA et al. New Antitumor Substances, FR901463, FR901464 and FR901465 II. Activities against Experimental Tumors in Mice and Mechanism of Action. THE JOURNAL OF ANTIBIOTICS. 1996, Vol. 49, No. 12, pp. 1204-1211 See the whole document	1,2
A	US 2004-0071663 A1 (JESUS MENA CAMPOS et al.) 15 April 2004 See the whole document	1,2
A	US 2003-0082147 A1 (DAWN H. GOUGE et al.) 01 May 2003 See the whole document	1,2

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents,such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
17 JANUARY 2012 (17.01.2012)	**18 JANUARY 2012 (18.01.2012)**
Name and mailing address of the ISA/KR Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon, 189 Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140	Authorized officer CHOI Jun-Ho Telephone No. 82-42-481-5569

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2011/026016

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-0537389 B1 (AMSOL CO., LTD.) 29 December 2005 See the whole document	1,2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.
PCT/US2011/026016

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2008-0096879 A1	24.04.2008	US 2011-0086909 A1	14.04.2011
		US 7825267 B2	02.11.2010
US 2004-0071663 A1	15.04.2004	AT 302552 T	15.09.2005
		AU 2002-216898 B2	07.09.2006
		BR 0116711 A	23.12.2003
		CA 2431669 A1	11.07.2002
		CN 1484494 A	24.03.2004
		CN 1484494 C0	15.02.2006
		CU 23176 A1	22.09.2006
		DE 60112973 D1	29.09.2005
		DE 60112973 T2	18.05.2006
		DK 1356733 T3	14.11.2005
		EC SP034675 A	28.10.2003
		EP 1356733 A2	29.10.2003
		EP 1356733 B1	24.08.2005
		ES 2247009 T3	01.03.2006
		IL 156700 A	24.07.2007
		IL 156700 D0	04.01.2004
		JP 2004-522727 A	29.07.2004
		JP 2004-522727 T	29.07.2004
		JP 2007-326861 A	20.12.2007
		MX PA03006040 A	10.09.2003
		PA 8536401 A1	30.06.2003
		PE 07782002 A1	16.10.2002
		RU 2003124061 A	27.01.2005
		RU 2249957 C1	20.04.2005
		US 2011-0064718 A1	17.03.2011
		UY 27112 A1	22.03.2002
		WO 02-052934 A2	11.07.2002
		WO 02-052934 A3	19.09.2002
		WO 02-052934 A3	11.07.2002
		ZA 200305121 A	19.07.2004
US 2003-0082147 A1	01.05.2003	None	
KR 10-0537389 B1	29.12.2005	None	

(Continuation of Box No. III)

This ISA found multiple inventions in this application as follows:

Group 1 : Claims 1-3 are directed to an isolated strain, and claims 7-16(partial) are directly or indirectly referring to claim 1.

Group 2 : Claims 4-6(partial) are directed to an isolated pesticidal compound optionally obtainable from a Burkholderia species selected from (A) a compound having an oxazolyl-indole structure as described in claim 4, and claims 7-16(partial) are directly or indirectly referring to claim 4.
Group 3 : Claims 4-6(partial) are directed to an isolated pesticidal compound optionally obtainable from a Burkholderia species selected from (B) a compound having an oxazolyl-benzyl structure as described in claim 4, and claims 7-16(partial) are directly or indirectly referring to claim 4.
Group 4 : Claims 4-6(partial) are directed to an isolated pesticidal compound optionally obtainable from a Burkholderia species selected from (C) a non-epoxide compound as described in claim 4, and claims 7-16(partial) are directly or indirectly referring to claim 4.
Group 5 : Claims 4-6(partial) are directed to an isolated pesticidal compound optionally obtainable from a Burkholderia species selected from (D) a compound as described in claim 4, and claims 7-16(partial) are directly or indirectly referring to claim 4.

Group 6 : Claims 17-18(partial) are directed to use of a compound selected from (A) a compound as described in claim 17.
Group 7 : Claims 17-18(partial) are directed to use of a compound selected from (B) a compound having an oxazolyl-indole structure as described in claim 17.
Group 8 : Claims 17-18(partial) are directed to use of a compound selected from (C) a compound having an oxazolyl-benzyl structure as described in claim 17.
Group 9 : Claims 17-18(partial) are directed to use of a compound selected from (D) a compound as described in claim 17.
Group 10 : Claims 17-18(partial) are directed to use of a compound selected from (E) a compound as described in claim 17.

- [a priori] lack of Unity as to Groups 1-10

The inventions listed as Groups 1-10 do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1.

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

To:
AGRIS CHERYL H.

THE LAW OFFICES OF CHERYL H. AGRIS, PHD, PC P.O. BOX 8495 PELHAM NY 10803 USA

PCT

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

(PCT Rule 43bis.1)

Date of mailing *(day/month/year)*	**18 JANUARY 2012 (18.01.2012)**
Applicant's or agent's file reference MOI-42016-PCT	**FOR FURTHER ACTION** See paragraph 2 below

International application No.	International filing date *(day/month/year)*	Priority date *(day/month/year)*
PCT/US2011/026016	**24 FEBRUARY 2011 (24.02.2011)**	25 FEBRUARY 2010 (25.02.2010)

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC

C12N 1/20(2006.01)i, A01N 63/02(2006.01)i, A01N 43/74(2006.01)i, A01N 43/14(2006.01)i, A01P 7/00(2006.01)i

Applicant

MARRONE BIO INNOVATIONS, INC. et al

1. This opinion contains indications relating to the following items:

- ☒ Box No. I Basis of the opinion
- ☐ Box No. II Priority
- ☒ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- ☒ Box No. IV Lack of unity of invention
- ☒ Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- ☐ Box No. VI Certain documents cited
- ☒ Box No. VII Certain defects in the international application
- ☐ Box No. VIII Certain observations on the international application

2. **FURTHER ACTION**

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA") except that this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 66.1bis(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of 3 months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.
For further options, see Form PCT/ISA/220.

Name and mailing address of the ISA/KR	Date of completion of this opinion	Authorized officer
Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon, 189 Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140	17 JANUARY 2012 (17.01.2012)	CHOI Jun-Ho Telephone No. 82-42-481-5569

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/US2011/026016

Box No. I Basis of this opinion

1. With regard to the **language**, this opinion has been established on the basis of :

   ☒ the international application in the language in which it was filed

   ☐ a translation of the international application into _____ , which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))

2. ☐ This opinion has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43*bis*.1(a))

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, this opinion has been established on the basis of:

   a. a sequence listing filed or furnished
      ☐ on paper
      ☒ in electronic form

   b. time of filing or furnishing
      ☐ contained in the international application as filed.
      ☒ filed together with the international application in electronic form.
      ☐ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search.

4. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additioanl copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

5. Additional comments:

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/US2011/026016

Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

☐ the entire international application

☒ claims Nos. 3, 7-16

because:

☐ the said international application, or the said claims Nos. _____ relate to the following subject matter which does not require an international search *(specify)*:

☒ the description, claims or drawings *(indicate particular elements below)* or said claims Nos. 8, 12, 16 are so unclear that no meaningful opinion could be formed *(specify)*:

Claims 8, 12, 16 are unclear, as they refer to the multiple dependent claim which does not refer to other claims in the alternative way.
Claims 12, 16 are unclear, as they refer to the multiple dependent claims which are not drafted in accordance with the third sentence of Rule 6.4(a).

☐ the claims, or said claims Nos. _____ are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed *(specify)*:

☒ no international search report has been established for said claims Nos. 3, 7-16

☐ a meaningful opinion could not be formed without the sequence listing: the applicant did not, within the prescribed time limit:

☐ furnish a sequence listing on paper complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Istructions, and such listing was not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.

☐ furnish a sequence listing in electronic form complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Istructions, and such listing was not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.

☐ pay the required late furnishing fee for the furnishing of a sequence listing in response to an invitation under Rule 13ter.1(a) or (b).

☐ See Supplemental Box for further details.

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/US2011/026016

Box No. IV Lack of unity of invention

1. ☒ In response to the invitation (Form PCT/ISA/206) to pay additional fees the applicant has, within the applicable time limit:
   - ☐ paid additional fees
   - ☐ paid additional fees under protest and, where applicable, the protest fee
   - ☐ paid additional fees under protest but the applicable protest fee was not paid
   - ☒ not paid additional fees
2. ☐ This Authority found that the requirement of unity of invention is not complied with and chose not to invite the applicant to pay additional fees.
3. This Authority considers that the requirement of unity of invention in accordance with Rule 13.1, 13.2 and 13.3 is
   - ☐ complied with
   - ☒ not complied with for the following reasons

See Supplemental Box

4. Consequently, this opinion has been established in respect of the following parts of the international application :
   - ☐ all parts.
   - ☒ the parts relating to claims Nos. 1-3, 7-16(partial)

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/US2011/026016

Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1, 2	YES
	Claims	NONE	NO
Inventive step (IS)	Claims	1, 2	YES
	Claims	NONE	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1, 2	YES
	Claims	NONE	NO

2. Citations and explanations :

Reference is made to the following documents:

D1: THEODORE SPILKER et al. PCR-Based Assay for Differentiation of *Pseudomonas aeruginosa* from Other Pseudomonas Species Recovered from Cystic Fibrosis Patients. JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY. 2004, Vol. 42, No. 5, pp. 2074-2079
D2: US 2008-0096879 A1 (KAZUNORI KOIDE et al.) 24 April 2008
D3: HIDENORI NAKAJIMA et al. New Antitumor Substances, FR901463, FR901464 and FR901465 II. Activities against Experimental Tumors in Mice and Mechanism of Action. THE JOURNAL OF ANTIBIOTICS. 1996, Vol. 49, No. 12, pp. 1204-1211
D4: US 2004-0071663 A1 (JESUS MENA CAMPOS et al.) 15 April 2004
D5: US 2003-0082147 A1 (DAWN H. GOUGE et al.) 01 May 2003
D6: KR 10-0537389 B1 (AMSOL CO., LTD.) 29 December 2005

1. Novelty and Inventive Step

The subject matter of claim 1 differs from these prior art documents in that an isolated strain has a 16S rRNA gene sequence comprising the forward sequence having at least 99% identity to the sequence set forth in SEQ ID NO:8, 11, 12 and a reverse sequence having at least 99% identity to the sequence set forth in SEQ ID NO:9, 10, 13, 14 and 15.
And it is not obvious to a person skilled in the art by the documents, taken alone or in combination.
And claim 2 is dependent on claim 1.

Therefore, claims 1 and 2 meet the requirements of PCT Article 33(2) and (3) with respect to novelty and inventive step.

2. Industrial Applicability

Claims 1 and 2 are industrially applicable under PCT Article 33(4).

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/US2011/026016

Box No. VII Certain defects in the international application

The following defects in the form or contents of the international application have been noted:

Claims 3, 7, 9-11, 13-15 do not comply with PCT Rule 6.4(a) because the multiple dependent claim does not refer to other claims in the alternative way.
Claims 8-11, 13-15 do not comply with Rule 6.4(a) because multiple dependent claims should not serve as a basis for any other multiple dependent claim.

International application No.
PCT/US2011/026016

Supplemental Box

In case the space in any of the preceding boxes is not sufficient.
Continuation of :

(Box No. IV)

This ISA found multiple inventions in this application as follows:

Group 1 : Claims 1-3 are directed to an isolated strain, and claims 7-16(partial) are directly or indirectly referring to claim 1.

Group 2 : Claims 4-6(partial) are directed to an isolated pesticidal compound optionally obtainable from a Burkholderia species selected from (A) a compound having an oxazolyl-indole structure as described in claim 4, and claims 7-16(partial) are directly or indirectly referring to claim 4.
Group 3 : Claims 4-6(partial) are directed to an isolated pesticidal compound optionally obtainable from a Burkholderia species selected from (B) a compound having an oxazolyl-benzyl structure as described in claim 4, and claims 7-16(partial) are directly or indirectly referring to claim 4.
Group 4 : Claims 4-6(partial) are directed to an isolated pesticidal compound optionally obtainable from a Burkholderia species selected from (C) a non-epoxide compound as described in claim 4, and claims 7-16(partial) are directly or indirectly referring to claim 4.
Group 5 : Claims 4-6(partial) are directed to an isolated pesticidal compound optionally obtainable from a Burkholderia species selected from (D) a compound as described in claim 4, and claims 7-16(partial) are directly or indirectly referring to claim 4.

Group 6 : Claims 17-18(partial) are directed to use of a compound selected from (A) a compound as described in claim 17.
Group 7 : Claims 17-18(partial) are directed to use of a compound selected from (B) a compound having an oxazolyl-indole structure as described in claim 17.
Group 8 : Claims 17-18(partial) are directed to use of a compound selected from (C) a compound having an oxazolyl-benzyl structure as described in claim 17.
Group 9 : Claims 17-18(partial) are directed to use of a compound selected from (D) a compound as described in claim 17.
Group 10 : Claims 17-18(partial) are directed to use of a compound selected from (E) a compound as described in claim 17.

- [a priori] lack of Unity as to Groups 1-10

The inventions listed as Groups 1-10 do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1.

TRATADO DE COOPERACIÓN INTERNACIONAL EN MATERIA DE PATENTES

Del ORGANISMO DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

A
AGRIS CHERYL H
THE LAW OFFICES OF
CHERYL H. AGRIS, PhD, PC
PO Box 8495 PELHAM, NY 10803
USA

PCT

INFORME ESCRITO
DEL ORGANISMO DE
BÚSQUEDA INTERNACIONAL

(regla PCT Nº 43*bis*.1)

Fecha de envío (*día/mes/año*)	*18 de enero de 2012 (18.01.2012)*
Referencia del Solicitante o Agente: *MOI-42016 PCT*	PROCEDER *Ver abajo, punto 2*

Referencia Internacional	Fecha de Presentación Internacional (*día/mes/año*)	Fecha de Prioridad(*día/mes/año*)
PCT/US 2011/026016	*24 de febrero de 2011 (24.02.2011)*	*25 de febrero de 2010 (25.02.2010)*

Clasificación Internacional de Patentes (IPK) o clasificación nacional e IPC
C12N 1/20 (2006.01), A01N 63/02(2006.01), A01N 43/74(2006.01), A01N 43/14, A01P 7/00 (2006.01),

Solicitante
MARRONE BIO INNOVATIONS INC.et al

1. Este informe contiene indicaciones acerca de los siguientes puntos:

- ☒ Campo Nº I — Fundamento del informe
- ☐ Campo Nº II — Prioridad
- ☒ Campo Nº III — No realización de dictamen alguno sobre novedad, actividad inventiva y aplicabilidad industrial
- ☒ Campo Nº IV — Carencia de unidad de la invención
- ☒ Campo Nº V — Resolución fundada según regla PCT 43*bis*.1(a)(i) con respecto a la novedad, la actividad inventiva y la aplicabilidad industrial; documentos y declaraciones destinados a apoyar esta resolución.
- ☐ Campo Nº VI — Documentos específicos expuestos
- ☒ Campo Nº VII — Falencias específicas de la solicitud internacional
- ☐ Campo Nº VIII — Observaciones específicas a la solicitud internacional

2. **PROCEDER**

Cuando se solicita un Examen Preliminar Internacional, este informe es válido como informe escrito del organismo encargado de la búsqueda internacional ("IPEA"); esto no es así cuando, según la regla 66.1*bis*(b), el solicitante elige otro organismo distinto a este como IPEA y el IPEA elegido informó a la Oficina Internacional que los informes escritos de este organismo de búsqueda internacional no serán considerados.

Cuando este informe es válido como informe escrito de IPEA, tal como está previsto arriba, el solicitante es intimado a presentar ante IPEA una posición por escrito, y cuando corresponde, modificaciones, en el plazo de 3 meses a partir de la fecha en la que fue remitido el formulario PCT/ISA/220 o en el plazo de 22 meses a partir de la fecha de prioridad, según el plazo que venza más tarde.

Para otras opciones, ver formulario PCT/ISA/220.

Nombre y dirección postal del ISA/KR	Fecha de confección de este informe	Funcionario autorizado
Oficina de Propiedad Intelectual Coreana Governement-Complex-Daejeon , 189 Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon 302-701 República de Corea Fax Nº: 82-42-472-7140	*Enero 17, 2012 (17.01.2012)*	*CHOI, Jun-Ho* Teléfono Nº: *82-42-481-5569*

INFORME ESCRITO DEL ORGANISMO DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional
PCT/US 2011/026016

Campo Nº I Fundamento del Informe

1. Con respecto al **idioma**, el informe se basa sobre

   ☒ La solicitud internacional en el idioma en que fue presentada

   ☐ una traducción del idioma original al siguiente idioma , el que se trata del idioma de la traducción presentada a los efectos de la búsqueda internacional (según las reglas 12.3 y 23.1 b)).

2. ☐ Este informe ha sido confeccionado teniendo en cuenta la **rectificación de un error obvio** autorizada por o notificada a este Organismo bajo la regla 91 (regla 43*bis*.1(a)).

3. Con respecto a la **secuencia de nucleótidos y/o aminoácidos** revelada en la solicitud internacional, el informe fue confeccionado sobre la siguiente base:

   a. un listado de secuencias presentado o suministrado

      ☐ en papel

      ☒ en forma electrónica

   b. momento de presentación o suministro

      ☐ comprendido en la presentación internacional tal como fue presentada

      ☒ presentado, junto con la solicitud internacional, en forma electrónica

      ☐ suministrado posteriormente ante este organismo a los efectos de la búsqueda

4. ☐ Habiendo presentado más de una versión o copia de un protocolo de secuencias y/o la tabla correspondiente se deben presentar adicionalmente las declaraciones requeridas de que la información de las copias presentadas posterior mente o adicionales coinciden con la versión original de la solicitud o que no la supera., lo que corresponda

5. Observaciones adicionales

INFORME ESCRITO DEL ORGANISMO DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional Nº

PCT/US 2011/026016

Campo Nº III **No confección de un informe con respecto a la novedad, la actividad inventiva y la aplicabilidad industrial**

La cuestión acerca de si la invención reivindicada parece ser novedosa, involucra actividad inventiva (no obvia) o es aplicable industrialmente no fue examinada con respecto a:

☐ toda la solicitud internacional

☒ reivindicaciones Nº *3, 7-16*

Porque

☐ las mencionadas solicitud internacional completa o reivindicaciones Nº … se refieren al siguiente objeto, el que no requiere un examen preliminar internacional (*especificar*):

☒ la descripción, reivindicaciones o ilustraciones (*indicar elementos particulares abajo*) o las mencionadas reivindicaciones Nº *8, 12, 16* son tan poco claras que no se puede confeccionar un informe coherente (*especificar*):

Las reivindicaciones 8, 12, 16 carecen de claridad porque se refieren a la reivindicación dependiente múltiple que no se refiere a otras reivindicaciones como vía alternativa.
Las reivindicaciones 12, 16 carecen de claridad porque se refieren a la reivindicación dependiente múltiple que no está redactada en acordanza con la tercera frase de la Regla 6.4(a).

☐ las reivindicaciones o las mencionadas reivindicaciones Nº está apoyadas tan inadecuadamente por la descripción que no se puede confeccionar un informe coherente.

☒ no se confeccionó ningún informe de búsqueda internacional para toda la solicitud o para las mencionadas reivindicaciones Nº *3, 7-16*

☐ No se pudo establecer una opinión coherente sin el listado de secuencias; el solicitante, dentro del plazo prescripto:

- ☐ No suministró un listado de secuencias en papel que cumpla con el estandard provisto para ello en el Anexo C de las Instrucciones Administrativas, y tal listado no estaba disponible para el Organismo de Búsqueda Internacional en una forma o manera aceptable para él.
- ☐ No suministró un listado de secuencias en forma electrónica que cumpla con el estandard provisto para ello en el Anexo C de las Instrucciones Administrativas, y tal listado no estaba disponible para el Organismo de Búsqueda Internacional en una forma o manera aceptable para él.
- ☐ No pagó la tasa requerida por el suministro tardío de un listado de secuencias en respuesta a una intimación según la Regla 13ter.1 (a) o (b).

☐ para mayores detalles, ver campo suplementario.

INFORME ESCRITO DEL ORGANISMO DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional Nº
PCT/US 2011/026016

Campo Nº IV Carencia de unidad de la invención

1. ☒ En respuesta a la intimación (formulario PCT/ISA/206) de pagar tasas adicionales, el solicitante, dentro de los plazos establecidos:

   ☐ ha pagado las tasas adicionales

   ☐ ha pagado las tasas adicionales bajo protesta y, si corresponde, la tasa de protesta

   ☐ ha pagado las tasas adicionales bajo protesta pero no la correspondiente tasa de protesta

   ☒ no ha pagado las tasas adicionales

2. ☐ Este Organismo considera que no se cumple el requisito de unidad de invención y opta por no intimar al solicitante a pagar las tasas adicionales

3. ☐ Este Organismo considera que el requisito de unidad de invención acorde con las reglas 13.1, 13.2 y 13.3

   ☐ se cumple

   ☒ no se cumple por las siguientes razones:

Ver campo suplementario

4. En consecuencia, este informe ha sido confeccionado con respecto a las siguientes partes de la solicitud internacional:

   ☐ todas las partes

   ☒ las partes relacionadas con las reivindicaciones Nº *1-3; 7-16 (parcialmente)*

INFORME ESCRITO DEL ORGANISMO DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional Nº
PCT/US 2011/026016

Campo Nº V **Resolución fundada según regla PCT 43*bis*.1(a)(i) con respecto a la novedad, la actividad inventiva y la aplicabilidad industrial; documentos y declaraciones destinadas a apoyar esta resolución**

1. Resolución

Novedad (N)	Reivindicaciones:	*1, 2*	*SÍ*
	Reivindicaciones:	*NINGUNA*	*NO*
Actividad inventiva (IS)	Reivindicaciones:	*1, 2*	*SÍ*
	Reivindicaciones:	*NINGUNA*	*NO*
Aplicabilidad industrial (AI)	Reivindicaciones:	*1, 2*	*SÍ*
	Reivindicaciones:	*NINGUNA*	*NO*

2. Documentos y declaraciones:

Se hace referencia a los siguientes documentos:

D1: THEODOR SPILKER et al: PCR-based Assay for Differentiation of Pseudomonas aeruginosa from other Pseudomonas Species Recovered from Cystic Fibrosis Patients JOURNAL OF CLINIC MICROBIOLOGY, 2004, vol. 42, Nº 5, pp. 2074-2079
D2: US 2008-0096879 A1 (KAZINORI KOIDE et al) 24 de abril de 2008
D3: HIDENORI NAKAJIMA et al: New Antitumor Substances. FR9014463, FR901464 y FR901465. II. Activity against Experimental Tumors in Mise and Mechanism of Action.THE JOURNAL OF ANTIBIOTICS 1996, vol. 49, Nº 12, pp. 1204-1211
D4: US 2004-0071663 A1 (JESUS MENA CAMPOS et al) 15 de abril de 2004
D5: US 2003-0082147 A1 (DAWN H. GOOGE et al) 01 de mayo de 2003
D6: KR 10-0537389 B1 (AMSOL CO. LTD.) 29 de diciembre de 2005

1. Novedad y actividad inventiva

El objeto de la reivindicación 1 difiere de estos documentos del estado de la técnica en que una cepa aislada posee un secuencia de genes 16S rARN que comprende la secuencia de avance expuesta que posee al menos 99 % de identidad con la secuencia expuesta en SEQ ID Nº: 8,11, 12 y y una secuencia inversa que posee al menos 99 % de identidad con la secuencia expuesta en SEQ ID Nº:9, 10, 13, 14 y 15.

Y la reivindicación 2 es dependiente de la reivindicación 1.

Por lo tanto, las reivindicaciones 1 y 2 cumplen los requisitos del Artículo PCT 33(2) y (3) con respecto a la novedad y la actividad inventiva.

2. Aplicabilidad industrial

Las reivindicaciones 1 y 2 son aplicables industrialmente según el Artículo PCT 33(4).

-----/////-----

Campo suplementario

En caso de que el espacio de alguno de lo campos precedentes no sea suficiente.
Continuación de Campo IV (1)

El ISA encontró invenciones múltiples en esta solicitud, a saber:

Grupo 1: *las reivindicaciones 1-3 están dirigidas a una cepa sin aislar, y las reivindicaciones 7-16 están dirigidas o se refieren indirectamente a la reivindicación 1.*

Grupo 2: *las reivindicaciones 4-6 (parcialmente) están dirigidas a un compuesto pesticida aislado obtenible opcionalmente de una especie de Buckholdeia seleccionada de (A) un compuesto que posee una estructura oxazolina-indol como la descripta en la reivindicación 4, y las reivindicaciones 7-16 (parcialmente) están referidas directa o indirectamente a la reivindicación 4.*

Grupo 3: *las reivindicaciones 4-6 (parcialmente) están dirigidas a un compuesto pesticida aislado obtenible opcionalmente de una especie de Buckholdeia seleccionada de (B) un compuesto que posee una estructura oxazolina-bencilo como la descripta en la reivindicación 4, y las reivindicaciones 7-16 (parcialmente) están referidas directa o indirectamente a la reivindicación 4.*

Grupo 4: *las reivindicaciones 4-6 (parcialmente) están dirigidas a un compuesto pesticida aislado obtenible opcionalmente de una especie de Buckholdeia seleccionada de (C) un compuesto no epoxídico como el descripto en la reivindicación 4, y las reivindicaciones 7-16 (parcialmente) están referidas directa o indirectamente a la reivindicación 4.*

Grupo 5: *las reivindicaciones 4-6 (parcialmente) están dirigidas a un compuesto pesticida aislado obtenible opcionalmente de una especie de Buckholdeia seleccionada de (D) un compuesto no epoxídico como el descripto en la reivindicación 4, y las reivindicaciones 7-16 (parcialmente) están referidas directa o indirectamente a la reivindicación 4.*

Grupo 6: *las reivindicaciones 17-18 (parcialmente) están dirigidas al uso de un compuesto seleccionado de (A), un compuesto como el descripto en la reivindicación 17.*

Grupo 7: *las reivindicaciones 17-18 (parcialmente) están dirigidas al uso de un compuesto seleccionado de (B), un compuesto que posee una estructura oxazolina-indol como la descripta en la reivindicación 17.*

Grupo 8: *las reivindicaciones 17-18 (parcialmente) están dirigidas al uso de un compuesto seleccionado de (C), un compuesto que posee una estructura oxazolina-bencilo como la descripta en la reivindicación 17.*

Grupo 9: *las reivindicaciones 17-18 (parcialmente) están dirigidas al uso de un compuesto seleccionado de (D), un compuesto como el descripto en la reivindicación 17.*

-----/////-----

Campo suplementario

En caso de que el espacio de alguno de lo campos precedentes no sea suficiente.
Continuación de Campo IV (2)

Grupo 10: *las reivindicaciones 17-18 (parcialmente) están dirigidas al uso de un compuesto seleccionado de (E), un compuesto como el descripto en la reivindicación 17.*

-***[a priori] carencia de unidad como en los grupos 1-10***

Según la Regla PCT 13.1, las invenciones listadas como grupos 1-10 no se refieren a un concepto inventivo general individual.

INFORME ESCRITO DEL ORGANISMO DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional Nº

PCT/US 2011/026016

Campo Nº VII Defectos específicos de la solicitud internacional

Se encontraron los siguientes defectos en el formulario o en el contenido de la solicitud internacional:

Las reivindicaciones 3, 7, 9-11, 13-15 no cumplen con la Regla PCT 6.4(a) porque la reivindicación múltiple dependiente no se refiere a otra reivindicación como vía alternativa.

Las reinvindicaciones 8-11, 13-15 no cumplen con la Regla 6.4(a), porque las reivindicaciones múltiples dependientes no deberían servir de base para alguna otra reivindicación múltiple dependiente.

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
1 September 2011 (01.09.2011)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2011/106491 A3

(51) International Patent Classification:
C12N 1/20 (2006.01) *A01N 43/14* (2006.01)
A01N 63/02 (2006.01) *A01P 7/00* (2006.01)
A01N 43/74 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/US2011/026016

(22) International Filing Date:
24 February 2011 (24.02.2011)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
61/308,287 25 February 2010 (25.02.2010) US
61/406,541 25 October 2010 (25.10.2010) US

(71) Applicant *(for all designated States except US)*: **MARRONE BIO INNOVATIONS, INC.** [US/US]; 2121 Second Street, Suite 107B, Davis, CA 95618 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants *(for US only)*: **ASOLKAR, Ratnakar** [IN/US]; 4005 Cowell Blvd, Davis, CA 95618 (US). **KOIVUNEN, Marja** [FI/US]; 1236 Evans Court, Davis, CA 95618 (US). **MARRONE, Pamela** [US/US]; 3333 Victoria Place, Davis, CA 95616 (US). **HUANG, Huazhang** [CN/US]; 2674 Briscoe Place, Woodland, CA 95776 (US). **CORDOVA-KREYLOS, Ana Lucia** [MX/US]; 18 Simmons Way, Davis, CA 95616 (US).

(74) Agent: **AGRIS, Cheryl, H.**; The Law Offices Of Cheryl H. Agris, Phd, PC, P.O. Box 8495, Pelham, NY 10803 (US).

(81) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of national protection available)*: AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

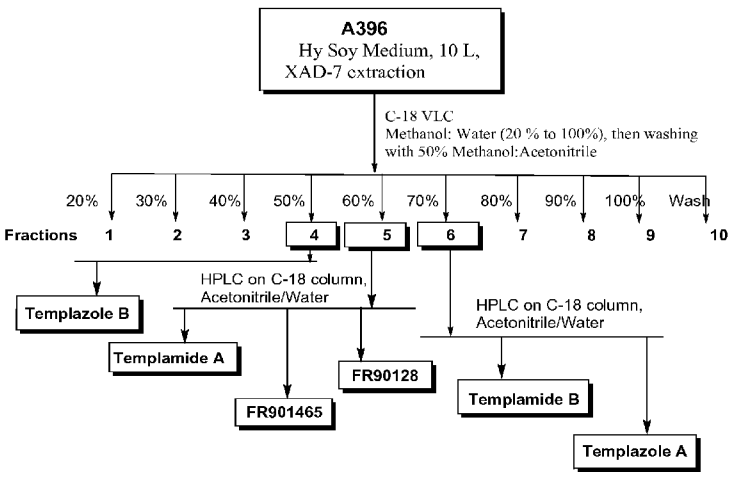
Declarations under Rule 4.17:

— *as to applicant's entitlement to apply for and be granted a patent (Rule 4.17(ii))*

[Continued on next page]

(54) Title: ISOLATED BACTERIAL STRAIN OF THE GENUS BURKHOLDERIA AND PESTICIDAL METABOLITES THEREFROM

Figure 7



(57) Abstract: A species of *Burkholderia sp* with no known pathogenicity to vertebrates but with pesticidal activity (e.g., plants, insects, fungi, weeds and nematodes) is provided. Also provided are natural products derived from a culture of said species and methods of controlling pests using said natural products.

WO 2011/106491 A3

— *as to the applicant's entitlement to claim the priority of the earlier application (Rule 4.17(iii))*

Published:

— *with international search report (Art. 21(3))*

— *before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments (Rule 48.2(h))*

— *with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))*

(88) Date of publication of the international search report:
15 March 2012

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2011/026016

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 1/20(2006.01)i, A01N 63/02(2006.01)i, A01N 43/74(2006.01)i, A01N 43/14(2006.01)i, A01P 7/00(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N 1/20; A01N 63/00; A61K 31/351; A61K 31/5377

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean utility models and applications for utility models
Japanese utility models and applications for utility models

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS(KIPO internal) & Keywords: burkholderia, 16S rRNA, pesticidal activity, oxazolyl-indole structure, oxazolyl-benzyl structure

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	THEODORE SPILKER et al. PCR-Based Assay for Differentiation of Pseudomonas aeruginosa from Other Pseudomonas Species Recovered from Cystic Fibrosis Patients. JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY. 2004, Vol. 42, No. 5, pp. 2074-2079 See the whole document	1,2
A	US 2008-0096879 A1 (KAZUNORI KOIDE et al.) 24 April 2008 See the whole document	1,2
A	HIDENORI NAKAJIMA et al. New Antitumor Substances, FR901463, FR901464 and FR901465 II. Activities against Experimental Tumors in Mice and Mechanism of Action. THE JOURNAL OF ANTIBIOTICS. 1996, Vol. 49, No. 12, pp. 1204-1211 See the whole document	1,2
A	US 2004-0071663 A1 (JESUS MENA CAMPOS et al.) 15 April 2004 See the whole document	1,2
A	US 2003-0082147 A1 (DAWN H. GOUGE et al.) 01 May 2003 See the whole document	1,2

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents,such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
17 JANUARY 2012 (17.01.2012)	**18 JANUARY 2012 (18.01.2012)**

Name and mailing address of the ISA/KR
Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon 302-701, Republic of Korea
Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer
CHOI Jun-Ho
Telephone No. 82-42-481-5569

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2011/026016

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☒ Claims Nos.: 8, 12, 16
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

Claims 8, 12, 16 are unclear, as they refer to the multiple dependent claim which does not refer to other claims in the alternative way. Claims 12, 16 are unclear, as they refer to the multiple dependent claims which are not drafted in accordance with the third sentence of Rule 6.4(a).

3. ☒ Claims Nos.: 3, 7-11, 13-15
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

See extra sheet

1. ☐ As all required addtional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1-3, 7-16(partial)

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2011/026016

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-0537389 B1 (AMSOL CO., LTD.) 29 December 2005 See the whole document	1,2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/US2011/026016

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2008-0096879 A1	24.04.2008	US 2011-0086909 A1	14.04.2011
		US 7825267 B2	02.11.2010
US 2004-0071663 A1	15.04.2004	AT 302552 T	15.09.2005
		AU 2002-216898 B2	07.09.2006
		BR 0116711 A	23.12.2003
		CA 2431669 A1	11.07.2002
		CN 1484494 A	24.03.2004
		CN 1484494 C0	15.02.2006
		CU 23176 A1	22.09.2006
		DE 60112973 D1	29.09.2005
		DE 60112973 T2	18.05.2006
		DK 1356733 T3	14.11.2005
		EC SP034675 A	28.10.2003
		EP 1356733 A2	29.10.2003
		EP 1356733 B1	24.08.2005
		ES 2247009 T3	01.03.2006
		IL 156700 A	24.07.2007
		IL 156700 D0	04.01.2004
		JP 2004-522727 A	29.07.2004
		JP 2004-522727 T	29.07.2004
		JP 2007-326861 A	20.12.2007
		MX PA03006040 A	10.09.2003
		PA 8536401 A1	30.06.2003
		PE 07782002 A1	16.10.2002
		RU 2003124061 A	27.01.2005
		RU 2249957 C1	20.04.2005
		US 2011-0064718 A1	17.03.2011
		UY 27112 A1	22.03.2002
		WO 02-052934 A2	11.07.2002
		WO 02-052934 A3	19.09.2002
		WO 02-052934 A3	11.07.2002
		ZA 200305121 A	19.07.2004
US 2003-0082147 A1	01.05.2003	None	
KR 10-0537389 B1	29.12.2005	None	

(Continuation of Box No. III)

This ISA found multiple inventions in this application as follows:

Group 1 : Claims 1-3 are directed to an isolated strain, and claims 7-16(partial) are directly or indirectly referring to claim 1.

Group 2 : Claims 4-6(partial) are directed to an isolated pesticidal compound optionally obtainable from a Burkholderia species selected from (A) a compound having an oxazolyl-indole structure as described in claim 4, and claims 7-16(partial) are directly or indirectly referring to claim 4.
Group 3 : Claims 4-6(partial) are directed to an isolated pesticidal compound optionally obtainable from a Burkholderia species selected from (B) a compound having an oxazolyl-benzyl structure as described in claim 4, and claims 7-16(partial) are directly or indirectly referring to claim 4.
Group 4 : Claims 4-6(partial) are directed to an isolated pesticidal compound optionally obtainable from a Burkholderia species selected from (C) a non-epoxide compound as described in claim 4, and claims 7-16(partial) are directly or indirectly referring to claim 4.
Group 5 : Claims 4-6(partial) are directed to an isolated pesticidal compound optionally obtainable from a Burkholderia species selected from (D) a compound as described in claim 4, and claims 7-16(partial) are directly or indirectly referring to claim 4.

Group 6 : Claims 17-18(partial) are directed to use of a compound selected from (A) a compound as described in claim 17.
Group 7 : Claims 17-18(partial) are directed to use of a compound selected from (B) a compound having an oxazolyl-indole structure as described in claim 17.
Group 8 : Claims 17-18(partial) are directed to use of a compound selected from (C) a compound having an oxazolyl-benzyl structure as described in claim 17.
Group 9 : Claims 17-18(partial) are directed to use of a compound selected from (D) a compound as described in claim 17.
Group 10 : Claims 17-18(partial) are directed to use of a compound selected from (E) a compound as described in claim 17.

- [a priori] lack of Unity as to Groups 1-10

The inventions listed as Groups 1-10 do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1.

TRATADO DE COOPERACIÓN INTERNACIONAL EN MATERIA DE PATENTES

PCT

Informe de Búsqueda Internacional

(Artículo PCT 18, así como reglas PCT 43 y 44)

Referencia del solicitante o del agente	**PROCEDER**	Ver notificación formulario PCT/ISA/220, así como, en tanto corresponda, el punto 5.abajo
MOI-42016-PCT		
Solicitud Internacional Nº:	Fecha de presentación Internacional (*día/mes/año*)	Fecha de prioridad (la más antigua) (*día/mes/año*)
PCT/US 2011/026016	*24 de febrero de 2011 (24.02.2011)*	*25 de febrero de 2010 (25.02.2010)*
Solicitante		
MARRONE BIO INOVATIONS, INC. et al		

Este Informe de Búsqueda Internacional fue elaborado por el Organismo de Búsqueda Internacional y, de acuerdo con el artículo 18, es enviado al solicitante. Se envía una copia a la Oficina Internacional.

Este informe de búsqueda Internacional comprende, en total, 7 hojas.

☐ Además se adjunta una copia de cada uno de los documentos del estado de la técnica mencionados en este informe

1. **Fundamentos del Informe**

   a. Con respecto al idioma, la búsqueda internacional fue llevada a cabo sobre la base de:

      ☒ la solicitud internacional en el idioma en que fue presentada

      ☐ una traducción de la solicitud internacional al , que es el idioma de una traducción suministrada a los fines de la búsqueda internacional (reglas 12.3(a) y 23.1 (b)).

   b. ☐ Este informe de búsqueda internacional ha sido confeccionado teniendo en consideración la **rectificación de un error obvio**, autorizada por o notificada a este organismo según la regla 91 (regla 43.6*bis*(b))

   c. ☒ Con respecto a los **nucleótidos y/o aminoácidos** revelados en la solicitud internacional, ver campo Nº 1

2. ☒ **Determinadas reivindicaciones no eran investigables** (ver campo II)**.**

3. ☒ **La invención carece de unidad** (ver campo III)**.**

4. Con respecto **al título**,

   ☒ se aprueba el texto presentado por el solicitante.

   ☐ el texto fue establecido por el organismo como sigue:

5. Con respecto al **resumen**,

   ☒ se aprueba el texto presentado por el solicitante.

   ☐ el texto fue establecido por el organismo, de acuerdo con la regla 38.2 b), en la versión indicada en el campo IV. El solicitante puede presentar una posición ante el organismo durante el transcurso de un mes a partir de la fecha de envío de este Informe de Búsqueda Internacional.

6. Con respecto a las **ilustraciones**

   a. Con el resumen se debe publicar la siguiente figura de Las **ilustraciones**: figura Nº -7-.

      ☒ sugerida por el solicitante.

      ☐ seleccionada por el organismo, dado que el mismo solicitante no sugiere ninguna figura.

      ☐ seleccionada por el organismo, dado que esta figura caracteriza mejor la invención.

   b. ☐ con el resumen no se publica ninguna de las ilustraciones

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Referencia Internacional
PCT/US 2011/026016

Campo I: Secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos (continuación del ítem 1.b de la hoja 1)

1- Con respecto a cualquier secuencia de nucleótidos y/o aminoácidos revelados en la solicitud internacional y necesarios para la invención reivindicada, la búsqueda internacional fue llevada a cabo basada sobre:

a. Un listado de secuencias presentado o suministrado

- ☐ en papel
- ☒ en forma electrónica

b. Momento de presentación o suministro

- ☐ contenido en la solicitud internacional tal como fue presentada
- ☒ presentado con la solicitud internacional en forma electrónica
- ☐ suministrado posteriormente a los propósitos de la búsqueda

2. ☐ Adicionalmente, en caso de que fueran presentadas o suministradas más de una versión o copia del listado de secuencia y/o tabla relacionada a éste, se suministra la declaración requerida de que la información incluida en las copias subsiguientes o adicionales es idéntica a aquella incluida en la solicitud tal como fue presentada o no supera la solicitud tal como fue presentada, lo que sea apropiado.

3. Comentarios adicionales

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Referencia Internacional
PCT/US2011/026016

Campo II: Observaciones acerca de porque determinadas reivindicaciones no eran investigables (continuación del ítem 2 de la hoja 1)

Este Informe de Búsqueda Internacional no fue realizado con respecto a algunas reivindicaciones, según el artículo 17(2)(a), por las siguientes razones:

1. ☐ Reivindicaciones Nº:
porque se refieren a objetos que no requieren ser investigados por este Organismo, a saber:

2. ☒ Reivindicaciones Nº: *8, 12, 16*
porque se refieren a partes de la Solicitud Internacional que no cumplen con los requisitos prescriptos en una extensión que no permite llevar a cabo una búsqueda internacional, específicamente:
Las reivindicaciones pues se refieren a la reivindicación múltiple dependiente que no se refiere a otras reivindicaciones como alternativa. Las reivindicaciones 12, 16 no son claras pues se refieren a la reivindicación múltiple dependiente que no está redactada en acordanza con la tercera frase de la Regla 6.4 (a).

3. ☒ Reivindicaciones Nº: *3, 7, 11, 13-15*
porque son reivindicaciones dependientes y no están desarrolladas en acordanza con la segunda y la tercera frase de la regla 6.4(a).

Campo III: Observaciones por falta de uniformidad de la invención (continuación del ítem 3 de la hoja 1)

Este Organismo de Búsqueda Internacional encontró invenciones múltiples en esta solicitud internacional, a saber:

1. ☐ Como todas las tasas adicionales requeridas fueron abonadas en término por el solicitante, este Informe de Búsqueda Internacional cubre todas las reivindicaciones investigables.

2. ☐ Como todas las reivindicaciones investigables pueden ser investigadas sin un esfuerzo que justifique una tasa adicional, este Organismo no solicita ningún pago o tasa adicional.

3. ☐ Como solo algunas de las tasas adicionales fueron abonadas en término por el solicitante, este Informe de Búsqueda Internacional cubre solo aquellas reivindicaciones para los cuales fueron abonadas las tasas, específicamente, las reivindicaciones Nº:

4. ☒ Ninguna de las tasas adicionales requeridas fue abonada en término por el solicitante. En consecuencia, este Informe de Búsqueda Internacional está restringido a la invención mencionada inicialmente en las reivindicaciones; la misma está cubierta por las reivindicaciones Nº:

Observaciones sobre protestas

☐ Las tasas adicionales de búsqueda fueron acompañadas por la protesta del solicitante y, de corresponder, por la tasa de protesta

☐ Las tasas adicionales de búsqueda fueron acompañadas por la protesta del solicitante, pero la tasa de protesta aplicable no fue pagada en el plazo especificado en la intimación

☐ Las tasas adicionales no fueron acompañadas por ninguna protesta.

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional Nº: *PCT/US 2011/026016*

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C12N 1/20 (2006.01), A01N 63/02 (2006.01), A01N 43/74 (2006.01), A01N 43/14 (2006.01), A01P 7/00 (2006.01)

Según la clasificación internacional de patentes (IPC) o las clasificaciones nacional e IPC

B. ÁMBITOS INVESTIGADOS

Documentación mínima investigada (Sistema de clasificación y símbolos de clasificación)

C12N 1/20, A01N 63/00, A61K 31/351, A61K 31/5377

Publicaciones investigadas pero no pertenecientes al material mínimo investigado, en tanto pertenezcan al ámbito investigado

Base de datos electrónica consultada durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y expresiones de búsqueda eventualmente empleadas)

eKOMPASS(KIPO Internal) y keywords burkholderia, 165 rRNA, pesticidal activity, oxazolyl-indol structure, oxazolyl-bencyl structure

C. ANTECEDENTES CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría°	Denominación de la publicación, así como, de ser apropiado, indicación de los pasajes relevantes	Relevante para reivindicación Nº:
A	*THEODOR SPILKER et al: PCR-based Assay for Differentiation of Pseudomonas aeruginosa from other Pseudomonas Species Recovered from Cystic Fibrosis Patients JOURNAL OF CLINIC MICROBIOLOGY 2004, vol. 42, Nº 5, pp. 2074-2079 Ver todo el documento*	*1-2*
A	*US 2008-0096879 A1 (KAZINORI KOIDE et al) 24 de abril de 2008 Ver todo el documento*	*1-2*
A	*HIDENORI NAKAJIMA et al: New Antitumor Substances. FR9014463, PR901464 y FR901465. II. Activity against Experimental Tumors in Mise and Mechanism of Action. THE JOURNAL OF ANTIBIOTICS 1996, vol. 49, Nº 12, pp. 1204-1211 Ver todo el documento*	*1-2*

––––– ––––– /////– –––––

,

☒ Otras publicaciones están listadas en la continuación del campo C

☒ Ver familia de patentes en el anexo

° Categorías particulares indicadas en publicaciones

"A" publicación que define el estado general de la técnica pero no considerada como particularmente importante

"B" documento anterior pero publicado recién o después de la de la fecha de presentación internacional

"L" publicación adecuada para hacer aparecer como dudosa una reivindicación de prioridad, o mediante la cual debe ser considerada la fecha de divulgación de otra publicación mencionada en el informe de búsqueda o que es indicada por otra razón particular (como realizada)

"O" publicación que se refiere a una revelación oral, a una utilización, a una exposición o a otras disposiciones

"P" publicación realizada antes de la fecha de presentación internacional pero luego de la fecha de prioridad reivindicada

"T" publicaciones posteriores a las difundidas en la fecha de presentación internacional o de la fecha de prioridad y que no colisionan con la solicitud, sino que solo están indicadas para mayor entendimiento del principio fundamental de la invención o de la teoría sobre la cual se basa

"X" publicación de particular importancia: la invención reivindicada no puede ser considerada, solo como consecuencia de esta publicación, como novedosa o apoyarse en una actividad inventiva

"Y" publicación de particular importancia: la invención reivindicada no puede ser considerada como apoyada en una actividad inventiva cuando puede ser relacionada con una o varias otras publicaciones de esta categoría y tal relación es notoria para un especialista

"&" publicación que es miembro de la misma familia

Fecha de finalización de la búsqueda internacional	Fecha de envío del Informe de Búsqueda Internacional
17 de enero de 2012 (17.01.2012)	*18 de enero de 2012 (18.01.2012)*

Nombre y Dirección Postal del ISA/KR	Funcionario Apoderado
Korean Intellectual Property Office Governement Complex – Daejeon 189 Cheongsa-Ro Seo-gu, Daejeon 302-701, República de Corea FAX: 82 42 472 7140	*CHOI Jun-Ho* Teléfono Nº: *+82 42 481 8754*

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional Nº:
PCT/US 2011/026016

C. (continuación) ANTECEDENTES CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Denominación de la publicación, así como, de ser requerido, indicación de los pasajes relevantes	Referente a la reivindicación Nº
A	*US 2004-0071663 A1 (JESUS MENA CAMPOS et al)* *15 de abril de 2004* *Ver todo el documento*	*1-2*
A	*US 2003-0082147 A1 (DAWN H. GOOGE et al)* *01 de mayo de 2003* *Ver todo el documento*	*1-2*
A	*KR 10-0537389 B1 (AMSOL CO. LTD.)* *29 de diciembre de 2005* *Ver todo el documento*	*1-2*

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL
Información de miembros de la familia de patentes

Solicitud Internacional Nº:
PCT/US 2011/026016

Documentos de Patente citados en el Informe de Búsqueda	Fecha de la publicación	Miembros de la familia de patentes	Fecha de la publicación
US 08-0096879 A1	*24.04.2008*	*US 2011-0086909 A1*	*14.04.2011*
		US 7825267 B2	*02.11.2010*
US 04-0071663 A1	*15.04.2004*	*AT 302552 T*	*15.09.2005*
		AU 2002-216898 B2	*07.09.2006*
		BR 0116711 A	*03.12.2003*
		CA 2431689 A1	*11.07.2002*
		CN 1484494 A	*24.03.2004*
		CN 1484494 C0	*15.02.2006*
		CU 23178 A1	*22.09.2006*
		DE 60112973 D1	*29.09.2005*
		DE 60112973 T2	*18.05.2006*
		DK 1356733 T3	*14.11.2005*
		EC SP034675 A	*28.10.2003*
		EP 1356733 A2	*29.10.2003*
		EP 1356733 B1	*24.08.2005*
		ES 2247009 T3	*01.03.2006*
		IL 156700 A	*24.07.2007*
		IL 156700 D0	*04.01.2004*
		JP 2004-522727 A	*29.07.2004*
		JP 2004-522727 T	*29.07.2004*
		JP 2007-326861 A	*20.12.2007*
		MX PA03006040 A	*10.09.2003*
		PA 8536401 A1	*30.06.2003*
		PE 07782002 A1	*16.10.2002*
		RU 2003124061 A	*27.01.2005*
		RU 2249957 C1	*20.04.2005*
		US 2011-0064718 A1	*17.03.2011*
		UY 27112 A1	*22.03.2002*
		WO 02-052934 A2	*11.07.2002*
		WO 02-052934 A3	*19.08.2002*
		WO 02-052934 A3	*11.07.2002*
		ZA 200305121 A	*10.07.2004*
US 03-0082147 A1	*01.05.2003*	*NINGUNO*	
KR 10-0537389 B1	*29.12.2005*	*NINGUNO*	

(Continuación del campo Nº III)

El ISA encontró invenciones múltiples en esta solicitud, a saber:

Grupo 1: *las reivindicaciones 1-3 están dirigidas a una cepa sin aislar, y las reivindicaciones 7-18 están dirigidas o se refieren indirectamente a la reivindicación 1.*

Grupo 2: *las reivindicaciones 4-6 (parcialmente) están dirigidas a un compuesto pesticida aislado obtenible opcionalmente de una especie de Buckholdeia seleccionada de (A) un compuesto que posee una estructura oxazolina-indol como la descripta en la reivindicación 4, y las reivindicaciones 7-16 (parcialmente) están referidas directa o indirectamente a la reivindicación 4.*

Grupo 3: *las reivindicaciones 4-6 (parcialmente) están dirigidas a un compuesto pesticida aislado obtenible opcionalmente de una especie de Buckholdeia seleccionada de (B) un compuesto que posee una estructura oxazolina-bencilo como la descripta en la reivindicación 4, y las reivindicaciones 7-16 (parcialmente) están referidas directa o indirectamente a la reivindicación 4.*

Grupo 4: *las reivindicaciones 4-6 (parcialmente) están dirigidas a un compuesto pesticida aislado obtenible opcionalmente de una especie de Buckholdeia seleccionada de (C) un compuesto no epoxídico como el descripto en la reivindicación 4, y las reivindicaciones 7-16 (parcialmente) están referidas directa o indirectamente a la reivindicación 4.*

Grupo 5: *las reivindicaciones 4-6 (parcialmente) están dirigidas a un compuesto pesticida aislado obtenible opcionalmente de una especie de Buckholdeia seleccionada de (D) un compuesto no epoxídico como el descripto en la reivindicación 4, y las reivindicaciones 7-16 (parcialmente) están referidas directa o indirectamente a la reivindicación 4.*

Grupo 6: *las reivindicaciones 17-18 (parcialmente) están dirigidas al uso de un compuesto seleccionado de (A), un compuesto como el descripto en la reivindicación 17.*

Grupo 7: *las reivindicaciones 17-18 (parcialmente) están dirigidas al uso de un compuesto seleccionado de (B), un compuesto que posee una estructura oxazolina-indol como la descripta en la reivindicación 17.*

Grupo 8: *las reivindicaciones 17-18 (parcialmente) están dirigidas al uso de un compuesto seleccionado de (C), un compuesto que posee una estructura oxazolina-bencilo como la descripta en la reivindicación 17.*

Grupo 9: *las reivindicaciones 17-18 (parcialmente) están dirigidas al uso de un compuesto seleccionado de (D), un compuesto como el descripto en la reivindicación 17.*

(Continuación del campo Nº III

Grupo 10: *las reivindicaciones 17-18 (parcialmente) están dirigidas al uso de un compuesto seleccionado de (E), un compuesto como el descripto en la reivindicación 17.*

-[a priori] carencia de unidad como en los grupos 1-10

Según la Regla PCT 13.1, las invenciones listadas como grupos 1-10 no se refieren a un concepto inventivo general individual.