



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 14-036105- -00006-0000

Fecha: 2015-05-25 15:29:04 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 851 DIVISIONAL Folios: 106

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 15-118252- -00000-0000

Fecha: 2015-05-25 15:29:04 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 106

Delegatura de Propiedad Industrial
División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD DIVISIONAL DE PATENTE DE INVENCION PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL

21. EXPEDIENTE No. 14.036.105

54. TITULO: COMPOSICIONES Y METODOS PARA CONTROLAR LA
FUSARIOSIS

52. CLASIFICACION INTERNACIONAL:

71. SOLICITANTE: MONSANTO TECHNOLOGY LLC

DOMICILIO: 800 North Lindbergh Boulevard, St. Louis,
Missouri 63167, ESTADOS UNIDOS DE
AMERICA

74. APODERADO: Dra. MARGARITA CASTELLANOS A.

22. BOGOTA, D.C.,

25 MAYO 2015



No. 14-036105-00006-0000

Fecha: 2015-05-25 15:29:04 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 851 DIVISIONAL Folios: 106



No. 15-118252-00000-0000

Fecha: 2015-05-25 15:29:04 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 106



DIRECCION DE NUEVAS CREACIONES
CONVERSION, DIVISION Y FUSION DE SOLICITUDES

1. Identificación del Trámite

- ☐ Conversión ☒ División ☐ Fusión
- ☒ Patente de Invención
- ☐ Patente de Modelo de Utilidad
- ☐ Registro de Diseño Industrial
- ☐ Esquema de Trazado de Circuitos Integrados

2. Datos del solicitante

Persona Natural ☐Persona Jurídica ☒**MONSANTO TECHNOLOGY LLC**

Nombre o Denominación / Nombre social

Nombre del representante legal

Tipo de empresa Micro ☐ Pequeña ☐ Mediana ☐ Otra ☐Documento de identificación: ☐ C.C. ☐ C.E. ☐ NIT ☐ Otro Número _____

Nacionalidad/Pais de constitución	Dirección del titular	Ciudad
ESTADOS UNIDOS DE AMERICA	800 North Lindbergh Boulevard	St. Louis, Missouri 63167
Dirección electrónica	No. Fax	Número telefónico

☐ Autorizo expresamente a la Superintendencia de Industria y Comercio para que todas las comunicaciones sean enviadas a través de la dirección de correo electrónico

3. Datos del representante o apoderado

MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO

Apellidos y Nombre

39.779.654 de Bogotá

Documento de Identificación

70.819 de C.S.J.

T.P. No.

Dirección del representante	Ciudad
Calle 94 A No. 7 A - 09	Bogotá
Dirección electrónica	No. Fax
info@castellanosyco.co	7 550158
	Número telefónico
	7 560770

En caso de haber presentado poder general para asuntos que se adelanten ante la Delegatura de Propiedad Industrial, sírvase indicar el número de su radicación o protocolo general _____

4. Datos del trámite

CONVERSION

Expediente	
De:	
A:	

DIVISION

Expediente	14.036.105
No. de Divisional	UNA (1)

FUSION

Expediente	
De:	
A:	

5. Comprobante de Pago No. _____

Fecha _____

6. Anexos

- ☒ Comprobantes de pago de las tasas
- ☒ Poder, si fuere el caso con el que se acredita la representación
- ☐ Número de documento que ordena la comisión o fusión o división
- ☐ Documento que contiene la conversión, división o fusión de la solicitud
- ☒ Texto de la descripción, reivindicaciones, resumen y listado de secuencias

7. Firma

MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO
Nombre y Apellidos

Margarita Castellanos
Firma

39.779.654 de Bogotá
C.C.

70.819 C.S.J.
T.P.

P4085 SOLICITUD DIVISIONAL DE LA P3277

25 MAYO 2015

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -

P4085

**Industria y Comercio**
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 15 - 0057087

Bogotá D.C., Mayo 22 de 2015 - 15:08:33

RECIBIDO DE : CASTELLANOS Y Y CO

NI 800.174.641

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	686327806	22/05/2015	1.196.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	2205 DIVISIONAL SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCIÓN CONT. DERE	478.000.00	478.000.00
			\$478.000.00

SON: **CUATROCIENTOS SETENTA Y OCHO MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

**No. 15-118252- -00000-0000**

Fecha: 2015-05-25 15:29:04 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 106

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

**No. 14-036105- -00006-0000**

Fecha: 2015-05-25 15:29:04 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 851 DIVISIONAL Folios: 106

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mai: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

, Mayo 22 de 2015 - 15:08:34

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -



RECIBO DE CAJA

No. 15 - 0057088

Bogotá D.C., Mayo 22 de 2015 - 15:08:33

RECIBIDO DE : CASTELLANOS Y Y CO

NI 800.174.641

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	686327806	22/05/2015	1.196.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
3 50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION PATENTE UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INIC	32.000.00	96.000.00
			\$96.000.00

SON: **NOVENTA Y SEIS MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 15-118252- -00000-0000

Fecha: 2015-05-25 15:29:04 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 106

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 14-036105- -00006-0000

Fecha: 2015-05-25 15:29:04 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 851 DIVISIONAL Folios: 106

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mai: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

, Mayo 22 de 2015 - 15:08:34

PODER

El (los) **MONSANTO TECHNOLOGY LLC**

Domiciliados en **800 North Lindbergh Boulevard, St. Louis, Missouri 63167, EEUU**

Nombran por el presente a **XIMENA CASTELLANOS A. y/o MARGARITA CASTELLANOS A.** abogadas con oficinas en la Calle 94 A No. 7 A-09, Bogotá-Colombia para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad Industrial y con este fin autorizamos a dichos apoderados para que nos representen ante cualesquiera autoridades o personas de los órdenes administrativo, contencioso - administrativo y judicial en todo lo relacionado con los siguientes actos y gestiones:

- a) Obtención de patentes de invención, modelos y dibujos industriales; registro de marcas de fabrica, de servicio, colectivas o defensivas y de denominaciones de origen, depósito de nombres y enseñas comerciales; su renovación, prórroga, inscripción de traspaso y cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria y el registro de licencias de uso de esos derechos;
- b) Para la obtención de registros sanitarios;
- c) Acciones de oposición, observación, cancelación, nulidad, medidas cautelares y en general los juicios civiles, penales, administrativos o contencioso - administrativos que promovamos o se nos promuevan.

Pudiendo en todos los actos y gestiones arriba mencionados sustituir éste mandato, transigir, desistir, recibir, cancelar, renunciar, aceptar notificaciones y nombrar apoderados judiciales y extrajudiciales.

Finalmente, este poder ratifica la validez de todos los actos y solicitudes que, a nombre de la poderdante hubieren realizado los apoderados en relación con las facultades anteriormente enumeradas, antes de la suscripción del presente poder

Dado y firmado hoy **19 de Diciembre de 2005**

en **St. Louis, Missouri, USA**

por **MONSANTO TECHNOLOGY LLC**

(El notario debe suscribir el documento en la pagina siguiente)

(Se requiere legalización consular o mediante apostilla)

POWER OF ATTORNEY

I (we) the undersigned **MONSANTO TECHNOLOGY LLC**

Of **800 North Lindbergh Boulevard, St. Louis, Missouri 63167, EEUU**

hereby grant(s) Power of Attorney to **XIMENA CASTELLANOS A. and/or MARGARITA CASTELLANOS A.** attorneys residing at Calle 94 A No. 7 A-09, Bogotá-Colombia, to obtain the protection of my (our) Industrial Property, for which purpose we authorize the said attorneys to represent us before any authorities, or persons, specially those, administrative, contentious and judicial, in all matters concerning the following:

- a) Obtainment of patents, models and designs, registration of trademarks, service, collective and defensive marks, and of designations of origin; the deposit of trade names and ensigns; its renewal, extension, recordal of assignments, change of name or domicile, voluntary cancellation, and the registration of licenses of use of the above rights;
- b) For the obtainment of Sanitary registrations;
- c) Actions of opposition, cancellation, nullity, infringement, granting of licenses; and in general the civil, criminal and administrative suits related to those rights; actions and suits instituted by us or against us;

In all the above matters they may substitute this power of attorney, compromise, desist, cancel, receive, renounce, accept notifications and appoint attorneys in fact, in or out of court.

Finally, this power of attorney ratifies the validity of all acts and applications made by the representatives in the name of the signatory of this power of attorney, with regard to the faculties above given, before the execution of the present power of attorney.

Given and signed this **19th December, 2005**

in **St. Louis, Missouri**

by 
Dennis R. Hoerner
(Notary shall execute on the next page)

(Consular legalization or apostille is required)

CERTIFICADO NOTARIAL (Sociedad)

NOTARIAL CERTIFICATION (Corporation)

ALVARO CASTELLANOS M. & CIA

Apostille

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: United States of America

This public document
2. has been signed by MICHELLE LUDWIG
3. acting in the capacity of NOTARY PUBLIC
4. bears the seal/stamp of MICHELLE LUDWIG-NOTARY PUBLIC-STATE OF MISSOURI

Certified

5. at Jefferson City, Missouri
6. the 21ST day of DECEMBER, 2005
7. by Robin Carnahan, Secretary of State, State of Missouri
8. No. 142500
9. Seal/Stamp
10. Signature:

Robin Carnahan

7. por Robin Carnahan, Secretario de Estado, Estado de Missouri

8. No. 142500

9. Sello (en dorado)

10. Firma:

(fdo) Robin Carnahan

ES TRADUCCION FIEL Y COMPLETA, a la cual me remito,

Bogotá, D. C., Febrero 9, 2006.



DORA DUQUE DE BERNAL
TRADUCTORA E INTERPRETE OFICIAL
RES. 02755/68 Y 01144/97 - MINJUSTICIA
REP. DE COLOMBIA

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2006 FEB 13 A 11:55

Jefe de Legalizaciones
SANTAFE DE BOGOTA D.C.

MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES

613662
Dora Duque
Cuya firma aparece en el
documento de semperna
las funciones indicadas

COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA CONTROLAR LA FUSARIOSIS

INCORPORACIÓN DE LISTADO DE SECUENCIAS

- 5 El material en el Listado de secuencias adjunto se incorpora por la presente en su totalidad. El archivo adjunto, llamado "SGI1520-1WO_ST25.txt", se creó el 24 de julio de 2012 y pesa 55 Kb. Puede accederse al archivo utilizando Microsoft Word en una computadora con el sistema operativo Windows.

10

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención guarda relación con el control biológico de enfermedades fitopatógenas. Específicamente, guarda relación con las composiciones y métodos útiles en el control de la fusariosis en plantas gramíneas, tales como el trigo y la cebada.

15

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La fusariosis, también conocida como fusariosis de la espiga, hongo rosado, hongo blanco y pudrición seca, es una enfermedad devastadora que afecta el trigo, la cebada y varios
20 otros cultivos de cereales en el mundo, particularmente en Estados Unidos, Europa y China. Esta enfermedad puede alcanzar niveles epidémicos y causar un extenso daño a los granos, especialmente al trigo y la cebada en áreas de cultivo de cereales húmedas y semihúmedas del mundo, lo que incluye India, Rusia, Francia, Alemania y Reino Unido. Particularmente, la fusariosis o fusariosis de trigo es una de las enfermedades más
27.767 dañinas para el trigo en los Estados Unidos. A nivel nacional, la enfermedad ha causado pérdidas de millones de dólares norteamericanos a la industria del trigo. En el medio oeste y las altas llanuras, la fusariosis del trigo es el mayor obstáculo en la producción de trigo de los últimos años. La fusariosis, además de atacar al trigo, también ataca y se reproduce en cebada, avena, maíz y otros tantos cereales.

30

Esta grave enfermedad de las plantas puede ser causada por varios fitopatógenos pero principalmente por varias especies del género de hongos *Fusarium*. Por ejemplo, los agentes causantes de la enfermedad fusariosis en el trigo pueden incluir una cantidad de diferentes especies de *Fusarium*, por ejemplo, *F. culmorum*, *F. graminearum* (teleomorfo
35 *Gibberella zeae*), *F. avenaceum* (teleomorfo, *G. avenacea*), *F. poae*, así como también

patógenos no pertenecientes al género *Fusarium* tales como *Microdochium nivale* (teleomorfo, *Monographella nivalis*) y *Microdochium majus*. En los Estados Unidos, Europa y la mayoría de las áreas importantes del mundo desde el punto de vista agrícola, el agente predominante que causa la fusariosis es *Fusarium graminearum* (telemorfo, *Gibberella zeae*, *stricto sensu*).

Estos patógenos normalmente sobreviven en los desechos vegetales. Invaden y dañan las espiguillas de la espiga durante la floración, lo que impide u obstruye parcialmente el desarrollo del grano de la espiga. Como resultado, el patógeno de fusariosis invasor puede matar parte de la espiga o toda la espiga. Algunas semillas infectadas carecen de energía y no logran germinar. Las semillas infectadas que germinan frecuentemente mueren tempranamente en la etapa de plántula debido a la putrefacción de la corona o de la raíz, lo que causa una mala postura en la siguiente planta de cultivo. Las plántulas saludables también pueden infectarse en la emergencia. Además de una mala y débil postura, las pérdidas de rendimiento debido a la infección por patógenos pueden ser bastante elevadas si las condiciones son favorables para el desarrollo de la enfermedad.

Los patógenos fúngicos del género *Fusarium* se esparcen en las áreas de cultivo de cereales de todo el mundo y se sabe que causan daños graves, particularmente en áreas con un nivel elevado de precipitaciones entre la floración y la formación del grano. Cuando *Fusarium graminearum* es el agente causante, esta enfermedad es de una preocupación primordial ya que no solo reduce el valor comercial de los granos contaminados, además de las pérdidas de rendimiento, sino que, dado que la infección por *Fusarium* puede conducir a la acumulación de micotoxinas tricotecenas en los granos, también amenaza la salud de los seres humanos y del ganado. Las tricotecenas son grandes contaminantes micotóxicos de cereales a nivel mundial, lo que causa rechazo a la alimentación, vómitos, diarrea y pérdida de peso en animales no rumiantes e implican un riesgo para la salud de otros animales y seres humanos cuando los niveles de exposición son elevados. Esta amenaza se ha exacerbado por el reciente cambio en las cepas de *F. graminearum* en Estados Unidos en cuanto a una mayor producción de toxinas y mayor potencia. Las micotoxinas que se encuentran con mayor frecuencia son deoxinivalenol (DON, también conocida como vomitoxina) y zearalenona (ZEA). El deoxinivalenol en particular es una toxina muy peligrosa, que causa trastornos gastrointestinales junto con afecciones hemorrágicas y similares en seres humanos y animales que consuman los granos infectados, lo que conduce a la muerte en algunos casos. Dado que el deoxinivalenol

generalmente es estable en cambios de pH y altas temperaturas, la desintoxicación puede resultar muy difícil. Por tanto, los granos contaminados más allá de un nivel determinado no pueden utilizarse en forma alguna de destilación, procesamiento o alimentación de ganado y por tanto a menudo es necesario deshacerse de ellos.

5

Al día de la fecha, se han diseñado varias estrategias para controlar la fusariosis en las plantas de cultivo. Las opciones prometedoras incluyen medidas químicas, el desarrollo de cultivares de cultivo resistentes y prácticas tradicionales de rotación de cultivo y labranza de campos. Entre estas opciones, los pesticidas químicos son bastante efectivos en la reducción de la infección de fusariosis, pero los residuos generan preocupación en cuanto a que el uso de los fungicidas en etapas tardías del desarrollo del cultivo, normalmente en las etapas de floración tan solo unas pocas semanas antes del cultivo, pueda disminuir su efectividad. También están ocurriendo avances en el desarrollo de cultivares resistentes que utilizan cultivo tradicional y modificación genética que representan otra alternativa para el control de la enfermedad. Los ejemplos registrados de avances en modificación genética incluyen la alteración del producto de una hormona vegetal o la manipulación de la vía de señalización de la hormona vegetal. En los últimos años, se han hecho avances considerables en el área del cultivo tradicional al entenderse la base de la genética de la resistencia a la fusariosis y se ha registrado una cantidad de genes y loci de rasgos cuantitativos (QTL) que confieren resistencia. Sin embargo, el progreso en la mejora de la resistencia de los cultivos a la enfermedad de la fusariosis ha sido lento, más que nada por la dificultad de estudio de esta enfermedad. De hecho, actualmente se entiende poco sobre los mecanismos implicados en la resistencia o la susceptibilidad. Adicionalmente, la diversidad genética de la especie *Fusarium*, que son los agentes predominantes que causan la enfermedad, a menudo aumenta la preocupación con respecto a qué tan duradera será la eficacia de los fungicidas químicos y de los cultivares resistentes. Como resultado, prácticamente todos los cultivares de trigo que tienen actualmente una producción a gran escala son vulnerables a la infección.

Adicionalmente, si bien puede esperarse algo de éxito en el control de la fusariosis mediante las prácticas tradicionales tales como el arado de los campos para enterrar los residuos de los cultivos infectados con el agente causante, por ejemplo, *F. graminearum*, luego de la recolección, el labrado convencional de los campos luego de la recolección no es compatible con la práctica de conservación del suelo de labranza mínima. Al considerar el potencial de la dispersión inoculante a larga distancia y la diversidad de cultivos que

pueden funcionar como huéspedes alternativos para los patógenos, la rotación de cultivos es a menudo una solución insostenible. Adicionalmente al problema de los residuos de pesticidas en el ambiente, los registros de resistencia a los pesticidas y los aumentos de instancias con contenido DON en el grano también pueden generar preocupaciones sobre su uso. Adicionalmente, los costos y la preocupación creciente en los sectores públicos y privados acerca de los residuos de pesticidas en el ambiente y la seguridad en la producción de alimentos han hecho que este control alternativo de la enfermedad se vuelva menos atractivo, y ha llevado a pedidos de cultivos que utilicen pesticidas lo menos posible.

En resumen, a pesar de los avances considerables en el desarrollo de técnicas para controlar la fusariosis, reducir el impacto de esta enfermedad devastadora en la producción de granos y en la calidad sigue siendo un problema intratable. Por lo tanto, la identificación y desarrollo de nuevas técnicas de control para la fusariosis es esencial en la mejora de la producción y la calidad de muchos cultivos de cereales. Estos problemas requieren una solución urgente no solo en los Estados Unidos sino también a nivel mundial, lo que incluye Asia y Europa.

El control biológico de la fusariosis ha atraído un interés considerable desde mediados de la década de 1990. Los agentes de control biológico (BCA), si bien actualmente son un número limitado, podrían constituir un método aceptable desde el punto de vista ambiental para disminuir sustancialmente el nivel de la enfermedad incitada por patógenos tales como *Fusarium*. La aceptación del público, la compatibilidad con otras medidas de administración y la durabilidad son algunos de los factores favorables a favor del desarrollo de estrategias para el control biológico de la enfermedad fusariosis. Los agentes de control biológico pueden cumplir una función importante en la producción de cereal orgánico. En la producción convencional, tales agentes pueden extender la protección de las espigas hasta luego de la etapa de floración y después de que ya no se puedan aplicar los fungicidas químicos. Al día de la fecha, se han logrado avances en el área del control biológico. Por ejemplo, determinadas cepas de bacterias que producen esporas (tales como especies de *Bacillus* y *Pseudomonas*) y levaduras (tales como especies de *Cryptococcus*) son prometedoras en cuanto al control de la enfermedad fusariosis y en cuanto a la reducción de la contaminación micotóxica. Sin embargo, a pesar de estos y otros avances, persiste la necesidad de microorganismos mejorados para el uso en el control biológico de la fusariosis. Si bien los BCA se han vuelto una

solución más aceptable para los patógenos vegetales y los productos con BCA se han promocionado más que antes, al día de la fecha ha habido pocos intentos de desarrollar estrategias y microorganismos antagonistas para el control biológico de la fusariosis. Además, el ciclo de vida de *Fusarium* spp. y otros agentes causantes de la fusariosis indica que los patógenos pueden ser potencialmente susceptibles a las técnicas de control biológico que utilicen microorganismos antagonistas en diferentes etapas de desarrollo. Por lo tanto, existe la necesidad de identificar nuevos agentes de control biológico, preferentemente con diferentes modos de acción, así como también métodos de biocontrol que puedan ayudar eficazmente a prevenir o impedir el desarrollo de la fusariosis.

COMPENDIO DE LA INVENCION

En la presente se proporcionan composiciones que comprenden cepas y cultivos microbiológicos. Determinadas cepas, cultivos y composiciones de estos son útiles en el control de la fusariosis, por ejemplo, varios cultivos de plantas que incluyen el trigo y otras plantas gramíneas. También se proporcionan composiciones de control biológico y métodos para el uso de estas para prevenir, inhibir o tratar el desarrollo de patógenos o enfermedades vegetales y para preservar el rendimiento de las plantas. También se proporcionan métodos para el uso de tales composiciones como agentes de control biológico en combinaciones con otros compuestos o composiciones eficaces desde el punto de vista agrícola para el control de patógenos vegetales dañinos.

En un aspecto, la presente invención proporciona cepas microbianas aisladas que tienen una actividad supresora contra la fusariosis. Las cepas microbianas, de acuerdo con este aspecto de la presente invención, se seleccionan del grupo que consta de los géneros *Microbacterium*, *Bacillus*, *Mycosphaerella* y *Variovorax*. En algunas modalidades preferidas, las cepas microbianas se seleccionan del grupo que consta de *Mycosphaerella* sp. cepa SGI-010-H11 (depositada como NRRL B-50471), *Microbacterium* sp. cepa SGI-014-C06 (depositada como NRRL B-50470), *Microbacterium* sp. cepa SGI-005-G08 (depositada como NRRL _-____), *Variovorax* sp. cepa SGI-014-G01 (depositada como NRRL B-50469), *Bacillus* sp. cepa SGI-015-F03 (depositada como NRRL B-50760), *Bacillus* sp. cepa SGI-015-H06 (depositada como NRRL B-50761) y variantes activas como pesticidas de cualquiera de estas. La cepa microbiana de acuerdo con algunas otras de las modalidades preferidas

pueden comprender una secuencia de ADN que exhibe al menos un 85 % de identidad de secuencia con cualquier de las secuencias de nucleótidos en el Listado de secuencias. Se proporcionan adicionalmente cultivos puros desde el punto de vista biológico y cultivos enriquecidos de las cepas microbianas que se describen en la presente.

5

También se proporcionan en otro aspecto de la presente invención composiciones que comprenden una cepa microbiana de la invención o de un cultivo de esta, y una cantidad eficaz desde el punto de vista agrícola de un compuesto o composición seleccionada del grupo que consta de un acaricida, un bactericida, un fungicida, un insecticida, un microbicida, un nematocida, un pesticida y un fertilizante. Las composiciones en algunas modalidades de este aspecto pueden prepararse como una formulación seleccionada del grupo que consta de una emulsión, un coloide, un polvo, un gránulo, un sedimento, un polvo, un aerosol, una emulsión y una solución. En algunas otras modalidades, las composiciones pueden proporcionarse con un portador. En algunas modalidades preferidas, el portador es un portador aceptable desde el punto de vista agrícola. En algunas modalidades particularmente preferidas, el portador es una semilla de planta. En otras modalidades preferidas, la composición es una formulación de recubrimiento de semilla. Adicionalmente se proporcionan en la presente descripción semillas que tienen un recubrimiento con una composición de acuerdo con la presente invención.

20

En otro aspecto de la presente invención, se proporcionan métodos para prevenir, inhibir o tratar el desarrollo de un patógeno vegetal. Los métodos implican cultivar una cepa microbiana de la invención o un cultivo de esta en un medio de cultivo o suelo de una planta hospedadora antes de que la planta hospedadora crezca o durante su crecimiento en el medio de cultivo o suelo. En algunas modalidades preferidas de este aspecto, el patógeno vegetal causa fusariosis. En algunas modalidades particularmente preferidas, el patógeno vegetal es *Fusarium graminearum*.

25

En aun otro aspecto de la presente invención, se proporcionan métodos para prevenir, inhibir o tratar el desarrollo de la fusariosis en una planta. Los métodos implican la aplicación a la planta, o a los alrededores de la planta, de una cantidad efectiva de una cepa microbiana de la invención o un cultivo de esta. En una modalidad, dicha fusariosis es causada por el hongo *Fusarium graminearum*. En algunas modalidades de este aspecto, la cepa microbiana o cultivo de esta se aplica al suelo, a una semilla, una raíz, una flor, una hoja, una parte de la planta o la planta entera. En una modalidad preferida, la

30
35

planta es susceptible a *Fusarium graminearum*. En otras modalidades, la planta es una planta de trigo, una planta de maíz, una planta de cebada o una planta de avena. En otra modalidad preferida, la cepa microbiana de la presente invención o cultivo de esta se establece como un endófito en la planta.

5

Otro aspecto adicional de la invención proporciona plantas de origen no natural. Las plantas de origen no natural se infectan artificialmente con una cepa microbiana de la invención o un cultivo de esta. En algunas modalidades preferidas de este aspecto se proporcionan adicionalmente semillas, tejido reproductor, tejido vegetativo, partes de

10

Todavía otro aspecto de la invención proporciona un método para preparar una composición agrícola. El método implica inocular la cepa microbiana de acuerdo con la presente invención o un cultivo de esta en o sobre un sustrato y permite que crezca a una

15

temperatura de 1-37 °C hasta obtener una cantidad de células o esporas de al menos 10^2 - 10^3 por milímetro o por gramo.

20

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Algunas definiciones

25

A menos que se defina de otra forma, todos los términos, notaciones y otros términos o terminología científica de la técnica empleada en la presente tienen los significados comúnmente comprendidos por los expertos en la técnica a la que pertenece esta invención. En algunos casos, se definen en la presente términos con significados comúnmente comprendidos con fines de claridad y/o para hacer una referencia específica,

30

y la inclusión de tales definiciones en la presente no debe ser necesariamente interpretada como una representación de diferencia sustancial respecto a lo que generalmente se entiende en la técnica. Muchas de las técnicas y procedimientos descritos o mencionados en la presente se entienden y emplean comúnmente usando metodología convencional por los expertos en la técnica.

35

La forma en singular "un", "una" y "el/la" incluye referencias en plural a menos que el contexto claramente lo indique de otra manera. Por ejemplo, el término "una célula" incluye una o más células, e incluye mezclas de estos.

- 5 Las expresiones "microorganismo antagonista" y "antagonista microbiano" cuando se usan de manera intercambiable en referencia a un microorganismo se pretende que signifiquen que la cepa de la presente exhibe un grado de inhibición de fusariosis que excede, a un nivel estadísticamente significativo, el de un control sin tratamiento.
- 10 Antibiótico: el término "antibiótico", tal como se usa en la presente, se refiere a cualquier sustancia que es capaz de matar o inhibir el crecimiento de un microorganismo. Los antibióticos pueden ser producidos por uno o más de los siguientes: 1) un microorganismo, 2) un proceso sintético, o 3) un proceso semisintético. Un antibiótico puede ser un microorganismo que secreta un compuesto orgánico volátil. Además, un
15 antibiótico puede ser un compuesto orgánico volátil secretado por un microorganismo.

- Bactericida: el término "bactericida", tal como se usa en la presente, se refiere a la capacidad de una composición o sustancia de aumentar la mortalidad o inhibir la tasa de crecimiento de bacterias. La inhibición de la tasa de crecimiento de bacterias puede
20 cuantificarse comúnmente como la reducción de células bacterianas viables durante el tiempo.

- Control biológico: el término "control biológico" y su forma abreviada "biocontrol", como se usa en la presente, se define como el control de un patógeno o insecto o cualquier
25 organismo no deseado mediante el uso de al menos un segundo organismo que no sea un ser humano. Un ejemplo de un mecanismo conocido de control biológico es el uso de microorganismos que controlan la descomposición de la raíz al ocupar el espacio que ocuparían los hongos en la superficie de la raíz, o microorganismos que inhiben el crecimiento o matan el patógeno. La "planta hospedadora" en el contexto de control
30 biológico es la planta que es susceptible a la enfermedad causada por el patógeno. En el contexto del aislamiento de un organismo, tal como una especie fúngica, de su ambiente natural, la "planta hospedadora" es una planta que sustenta el crecimiento del hongo, por ejemplo, una planta de una especie de la cual el hongo es un endófito.

- 35 Se pretende que el término "cereal" tal como se usa en la presente, se refiera a cualquier

especie de cereal que pueda ser susceptible a fusariosis. Los cereales que se ha reportado son susceptibles incluyen trigo, cebada, avena y triticale, aunque el trigo y la cebada son los dos cultivos en los cuales la enfermedad representa un problema económico significativo.

5

Una "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad suficiente para producir resultados beneficiosos o deseados. En términos de manejo, tratamiento, inhibición o protección de la enfermedad, una cantidad eficaz es la cantidad suficiente para suprimir, estabilizar, revertir, enlentecer o retrasar la evolución de la infección o enfermedad objetivo. Como tal, la expresión "una cantidad eficaz" se utiliza en la presente en referencia a aquella cantidad de tratamiento antagonista que es necesaria para obtener una reducción en el nivel de desarrollo del patógeno y/o en el nivel de enfermedad patógena en relación con la que ocurre en un control sin tratamiento. Típicamente, una cantidad eficaz de un tratamiento de antagonista dado proporciona una reducción de al menos 20 %; o, más típicamente, entre 30 y 40 %; más típicamente, entre 50-60 %; incluso más típicamente, entre 70 y 80 %; e incluso más típicamente, entre 90 y 95 %, en relación con el nivel de enfermedad y/o el nivel del desarrollo de patógenos que ocurre en un control sin tratamiento bajo condiciones de tratamiento adecuadas. Una cantidad eficaz puede administrarse en una o más administraciones. La tasa real de aplicación de una formulación líquida variará usualmente entre un mínimo de alrededor de 1×10^3 a alrededor de 1×10^{10} células viables/mL y preferentemente de alrededor de 1×10^6 a alrededor de 5×10^9 células viables/mL. Bajo la mayoría de las condiciones, las cepas microbianas antagonistas de la invención descritas en los Ejemplos más adelante, será eficazmente óptima con tasas de aplicación en el intervalo de alrededor de 1×10^6 a 1×10^9 células viables/mL, asumiendo un modo de aplicación que lograría un contacto sustancialmente uniforme con al menos alrededor del 50 % de los tejidos de la planta. Si los antagonistas se aplican como formulación sólida, la tasa de aplicación debería controlarse para lograr una cantidad similar de células viables por área de unidad de superficie de tejido de plantas, como la obtenida mediante las tasas antemencionadas de tratamiento líquido. Típicamente, los agentes de control biológico de la presente invención son efectivos biológicamente cuando se administran a una concentración en exceso de 10^6 CFU/g (unidades formadoras de colonias por gramo), preferentemente en exceso de 10^7 CFU/g, más preferentemente 10^8 CFU/g y más preferentemente a 10^9 CFU/g.

Además, la expresión "antagonista microbiano eficaz" cuando se usa en referencia a un

microorganismo se pretende que signifiquen que la cepa microbiana de la presente exhibe un grado de inhibición de fusariosis que excede, a un nivel estadísticamente significativo, el de un control sin tratamiento. Típicamente, un agente microbiano eficaz tiene la capacidad de producir una reducción de al menos 20 %; o, más típicamente, entre 30 y 40 %; más típicamente, entre 50-60 %; incluso más típicamente, entre 70 y 80 %; e incluso más típicamente, entre 90 y 95 %, en relación con el nivel de enfermedad y/o el nivel del desarrollo de patógenos que ocurre en un control sin tratamiento bajo condiciones de tratamiento adecuadas.

- 10 Composición: Se pretende que "composición" signifique una combinación de agente activo y al menos otro compuesto, portador o composición, inerte (por ejemplo, un agente detectable o etiqueta o portador líquido) o activo, tal como un pesticida.

Cepa microbiana aislada, cultivo aislado, cultivo biológicamente puro y cultivo enriquecido:

15 Tal como se usa en la presente, el término "aislado" cuando se aplica a un microorganismo (por ejemplo, bacterias o microhongos) se refiere a un microorganismo que ha sido retirado y/o purificado del ambiente en el cual aparece naturalmente. Como tal, una "cepa aislada" de un microbio, tal como se usa en la presente, es una cepa que ha sido retirada y/o purificada de su entorno natural. Por lo tanto, un "microorganismo

20 aislado" no incluye el que se encuentra en un ambiente en el cual aparece naturalmente. Además, el término "aislado" no refleja necesariamente la extensión en la cual el microbio ha sido purificado. Un "cultivo sustancialmente puro" de la cepa del microbio se refiere a un cultivo que sustancialmente no contiene otros microbios que la cepa o cepas deseadas de microbios. En otras palabras, un cultivo sustancialmente puro de una cepa de

25 microbios está sustancialmente libre de otros contaminantes, que pueden incluir contaminantes microbianos, así como contaminantes químicos no deseados. Además, tal como se usa en la presente, una cepa "biológicamente pura" se pretende que signifique la cepa separada de materiales con los que se asocia normalmente en la naturaleza. Nótese que una cepa asociada con otras cepas, o con compuestos o materiales con los cuales no

30 se encuentre normalmente en la naturaleza, se denomina de todos modos como "biológicamente pura". Un monocultivo de una cepa particular está, por supuesto, "biológicamente puro". Tal como se usa en la presente, el término "cultivo enriquecido" de una cepa microbiana aislada se refiere a un cultivo microbiano que contiene más del 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 95 % de la cepa aislada.

35

- Tal como se usa en la presente, un "endófito" es un endosimbionte que vive dentro de una planta durante al menos parte de su vida sin causar una enfermedad evidente. Los endófitos pueden transmitirse ya sea verticalmente (directamente de progenitor a progenie) u horizontalmente (de individuo a individuo no relacionado). Los endófitos fúngicos transmitidos verticalmente son típicamente asexuados y se transmiten desde la planta progenitora hasta la progenie por medio de penetración de la hifa fúngica en las semillas hospedadoras. Los endófitos bacterianos también pueden transferirse verticalmente desde semillas hasta plántulas (Ferreira *et ál.*, 2008). Por el contrario, los endófitos transmitidos horizontalmente son típicamente sexuales, y se transmiten por medio de esporas, y pueden expandirse por medio del viento y/o vectores insectos. Los endófitos de plantas de cultivo han recibido atención considerable con respecto a su capacidad de controlar tanto la enfermedad como la infestación por insectos, así como promover el crecimiento de la planta.
- 15 Proteína funcionalmente similar: La frase "proteína funcionalmente similar", tal como se usa en la presente, describe aquellas proteínas que tienen al menos una característica en común. Dichas características incluyen similitud de secuencia, actividad bioquímica, similitud de patrón transcripcional y actividad fenotípica. Típicamente, las proteínas funcionalmente similares comparten alguna similitud de secuencia o al menos una bioquímica. Dentro de esta definición, los homólogos, ortólogos, parálogos y análogos se consideran como funcionalmente similares. Además, las proteínas funcionalmente similares generalmente comparten al menos una actividad bioquímica y/o fenotípica. Las proteínas funcionalmente similares producirán la misma característica en un grado similar, pero no necesariamente igual. Típicamente, las proteínas funcionalmente similares proporcionan las mismas características donde la medición cuantitativa debido a una de las similares es de al menos 20 % de la otra; más típicamente, entre 30 y 40 %; más típicamente, entre 50-60 %; incluso más típicamente, entre 70 y 80 %; incluso más típicamente, entre 90 y 95 %; incluso más típicamente, entre 98 y 100 % de la otra.
- 30 Fungicida: Tal como se usa en la presente, "fungicida" se refiere a la capacidad de una composición o sustancia de disminuir la tasa de crecimiento de hongos o de aumentar la mortalidad de los hongos.
- 35 Hongo *Fusarium*: Para los fines de esta invención se entiende que el uso del término hongo *Fusarium* se pretende que incluya tanto la etapa sexual (teleomorfa) de este

organismo como también la etapa asexual (anamorfa), también mencionadas como etapas fúngicas perfecta e imperfecta, respectivamente. Por ejemplo, la etapa anamorfa de *Fusarium graminearum* es *Gibberella zeae*, un agente que causa la fusariosis. Esta enfermedad ocurre típicamente cuando la cabeza de la flor o semilla se inocula con conidia producida por la forma imperfecta o ascosporas producidas por forma perfecta de este hongo.

Mutante: Tal como se usa en la presente, el término "mutante" o "variante" en referencia a un microorganismo se refiere a una modificación de la cepa progenitora en la cual la actividad biológica deseada es similar a la expresada por la cepa progenitora. Por ejemplo, en el caso de *Microbacterium*, la "cepa progenitora" se define en la presente como la cepa original de *Microbacterium* antes de la mutagénesis. Los mutantes o variantes pueden ocurrir en la naturaleza sin la intervención del hombre. También se pueden obtener mediante con o mediante una variedad de métodos y composiciones conocidos para los expertos en la técnica. Por ejemplo, una cepa progenitora puede ser tratada con un químico tal como N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina, etilmetanosulfona, o mediante radiación usando radiación por rayos gamma, X o ultravioleta, o mediante otros medios conocidos por los expertos en la técnica.

Nematicida: El término "nematicida", tal como se usa en la presente, se refiere a la capacidad de una sustancia o composición de aumentar la mortalidad o inhibir la tasa de crecimiento de nemátodos.

Patógeno: El término "patógeno" tal como se usa en la presente se refiere a un organismo tal como un alga, un arácnido, una bacteria, un hongo, un insecto, un nemátodo, una planta parásita, levadura, un protozoario o un virus capaz de producir una enfermedad en una planta o animal. El término "fitopatógeno" tal como se usa en la presente se refiere a un organismo patogénico que infecta la planta.

Porcentaje del porcentaje de identidad: la "porcentaje de identidad de secuencia", tal como se usa en la presente, se determina mediante la comparación de dos secuencias alineadas ubicadas de manera óptima, durante una ventana de comparación definida por la longitud de la alineación local entre las dos secuencias. La secuencia de aminoácidos en la ventana de comparación puede comprender adiciones o eliminaciones (por ejemplo, huecos o excedentes) en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende

adiciones o eliminaciones) para la alineación óptima de las dos secuencias. La alineación local de dos secuencias únicamente incluye segmentos de cada secuencia que se consideran lo suficientemente similares, de acuerdo con un criterio que depende de un logaritmo usado para llevar a cabo la alineación (por ejemplo BLAST). El porcentaje de identidad se calcula determinando el número de posiciones en la que la base de ácido nucleico o residuo de aminoácido aparece en ambas secuencias para obtener el número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de posiciones coincidentes por el número total de posiciones en la ventana de comparación y multiplicando el resultado por 100. La alineación óptima de secuencias para su comparación se puede llevar a cabo mediante el algoritmo de homología local de Smith y Waterman (1981) *Add. APL. Math.* 2:482, mediante el algoritmo de alineación de homología de Needleman y Wunsch (*J. Mol. Biol.* 48:443,1970); mediante la búsqueda para el método de similitud de Pearson y Lipman (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 2444,1988), mediante implementaciones heurísticas de estos algoritmos (NCBI BLAST, WU-BLAST, BLAT, SIM, BLASTZ), o mediante inspección. Dado que se han identificado dos secuencias para su comparación, GAP y BESTFIT se emplean preferentemente para determinar su alineación óptima. Típicamente, se utilizan los valores por defecto de peso de huecos de 5,00 y 0,30 para la longitud de peso de hueco. El término "identidad de secuencia sustancial" entre secuencias polinucleótidos o polipéptidos se refiere a polinucleótidos o polipéptidos que comprenden una identidad de secuencia que es al menos 50 %, preferentemente al menos 70 %, preferentemente al menos 80 %, más preferentemente al menos 85 %, más preferentemente al menos 90 %, incluso más preferentemente al menos 95 %, y más preferentemente al menos 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de sustancia comparada con una secuencia de referencia usando los programas.

La consulta de ácidos nucleicos y secuencias de aminoácidos se pueden buscar contra secuencias de aminoácidos o ácidos nucleicos de la invención que se encuentran en bases de datos públicas o privadas. Dichas búsquedas se pueden realizar usando el programa de Búsqueda de Alineación Local Básica del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI BLAST v 2.18). El programa NCBI BLAST está disponible en internet a través del Centro Nacional de Información Biotecnológica (blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi). Típicamente se pueden utilizar los siguientes parámetros para NCBI BLAST: Las opciones de filtro se establecen en "por defecto", la Matriz de Comparación se establece como "BLOSUM62", el Costo de Hueco se establece como "Existencia: 11, Extensión: 1", la longitud de palabra se establece como 3, la Expectativa

(umbral E) se establece como $1e-3$, y la longitud mínima para la alineación local se establece como 50 % de la longitud de secuencia consultada. La identidad y similitud de secuencia puede determinarse usando el software GenomeQuest™ (Gene-IT, Worcester Mass. EUA).

5

El término "pesticida", tal como se utiliza en la presente, se refiere a la capacidad de una sustancia o composición de disminuir la tasa de crecimiento de una plaga, es decir, un organismo no deseado, o de aumentar la mortalidad de la plaga.

10 La "actividad supresora" de un agente de control biológico contra un patógeno significa la capacidad del agente de suprimir, inhibir, estabilizar, revertir, enlentecer o retrasar el desarrollo del patógeno en sí, o la evolución de la infección o enfermedades causadas por el patógeno.

15 Variante: Una "variante", tal como se usa en la presente, en referencia a un microorganismo, es una cepa que tiene características identificadoras de las especies a la que pertenece, mientras que tiene al menos una variación de secuencia de nucleótidos o un rasgo diferente identificable con respecto a la cepa progenitora, donde el rasgo es genético (hereditario). Por ejemplo, para una cepa SGI SGI-014-C06 de *Microbacterium*
 20 *sp.* que tiene actividad fungicida, los rasgos identificables incluyen 1) la capacidad de suprimir el crecimiento de *Fusarium graminearum* y su teleomorfo *Gibberella zeae*; 2) la capacidad de suprimir el desarrollo de fusariosis; 3) tener genes constitutivos con identidad de secuencia mayor que 95 %, mayor que 96 %, mayor que 97 %, mayor que 98 % o mayor que 99 % con los genes constitutivos de *Microbacterium sp.* SGI-014-C06
 25 puede usarse para confirmar una variante como *Microbacterium sp.* SGI-014-C06.

En el caso de ácidos nucleicos y polipéptidos, el término "variante" se usa en la presente para denominar una molécula de polipéptido, proteína o polinucleótido con algunas diferencias, generadas sintética o naturalmente, en sus secuencias de aminoácidos o
 30 ácido nucleico, en comparación con un polipéptido o polinucleótido de referencia, respectivamente. Por ejemplo, estas diferencias incluyen sustituciones, inserciones, deleciones o cualesquiera combinaciones deseadas de dichos cambios en un polipéptido de referencia o polipéptido. Las variantes de polipéptidos y proteínas pueden consistir adicionalmente en cambios en la carga y/o modificaciones postraduccionales tal como
 35 glicosilación, metilación, fosforilación, etc.).

Todas las publicaciones y las solicitudes de patente citadas en la presente memoria descriptiva se incorporan a la presente a modo de referencia en la misma medida que si cada publicación o solicitud de patente individual se indicara específica e individualmente como incorporada a la presente mediante esta referencia.

5

No se admite que ninguna de las referencias constituya técnica previa. La discusión de las referencias establece lo que sus autores afirman, y los solicitantes se reservan el derecho a cuestionar la precisión y pertinencia de los documentos citados. Se entenderá claramente que, aunque haya una cantidad de publicaciones de la técnica previa
10 mencionadas en la presente, estas referencias no constituyen una admisión de que ninguno de estos documentos forme parte del conocimiento general común de la técnica.

Métodos para la identificación taxonómica

- 15 Los microorganismos pueden, a menudo, diferenciarse en función de análisis microscópicos directos (si todas las células en una muestra se ven idénticas cuando se examinan), características de tinción, análisis molecular simple (tal como una determinación de restricción simple del polimorfismo de longitud de fragmento (RFLP)), y otros. Además de los ejemplos ilustrativos de dichas técnicas de análisis taxonómicos
20 como se describe en los Ejemplos 2-3 de la presente descripción, la identificación taxonómica de un microorganismo puede implicar hasta varios niveles diferentes de análisis, y cada análisis se puede basar en una característica diferente del organismo. Dichos análisis taxonómicos pueden incluir análisis con base en ácidos nucleicos (por ejemplo, análisis de genes específicos individuales, ya sea con respecto a su presencia o
25 su secuencia exacta, o la expresión de un gen o una familia de genes particulares), análisis con base en proteínas (por ejemplo, a un nivel funcional mediante ensayos de enzimas directos o indirectos o a un nivel estructural mediante técnicas de inmunodetección), y otros.
- 30 a. Análisis con base en ácidos nucleicos: Un experto en la técnica entenderá que se conoce una amplia variedad de técnicas con base en ácidos nucleicos y que pueden ser útiles en la obtención de la identificación taxonómica de un microorganismo dado. Estas técnicas se pueden utilizar para identificar células mediante la secuencia de genes o para identificar células que presentan genes o familias de genes particulares. Las familias de
35 genes comunes y útiles para los estudios taxonómicos incluyen la familia del gen 16S, la

familia del gen de actina, y la familia del gen de recombinasa A (*recA*). Normalmente estos métodos incluyen la amplificación y secuenciación de genes a partir de pequeñas cantidades de células, y por lo tanto con frecuencia superan los problemas de concentración de células y su ADN de suspensiones diluidas. La frase "amplificación de ácido nucleico" en general hace referencia a técnicas que aumentan la cantidad de copias de una molécula de ácido nucleico en una muestra o espécimen. Las técnicas útiles para amplificar el ácido nucleico son bien conocidas en la técnica. Un ejemplo de amplificación del ácido nucleico es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), donde una muestra biológica tomada de un sujeto entra en contacto con un par de cebadores de oligonucleótidos, en condiciones que permiten la hibridación de los cebadores en plantillas de ácido nucleico en la muestra. Los cebadores se extienden en condiciones adecuadas, se disocian de la plantilla y luego se vuelven a templar, se extienden y se disocian para amplificar la cantidad de copias del ácido nucleico. Otros ejemplos de técnicas de amplificación *in vitro* incluye amplificación por desplazamiento de la hebra; amplificación isotérmica sin transcripción; amplificación de reacción en cadena de reparación; reacción en cadena de ligasa; amplificación de reacción en cadena de ligasa de relleno de huecos; detección de ligasa acoplada y PCR; y amplificación sin transcripción de ARN.

Adicionalmente al ejemplo ilustrativo de cebadores que se proporciona en la presente, véase, por ejemplo, los Ejemplos 2-3 y el Listado de secuencias, los cebadores también han sido diseñados de manera rutinaria, y constantemente se diseñan nuevos, para especies individuales o grupos filogenéticos de microorganismos. Dichos cebadores dirigidos de manera restringida se pueden utilizar con los métodos descritos en la presente para analizar y/o identificar específicamente solo a los microorganismos de interés.

Se describen los métodos para preparar y usar cebadores de ácido nucleico, por ejemplo, en Sambrook *et ál.* (In Molecular Cloning: A Laboratory Manual, CSHL, Nueva York, 1989), Ausubel *et ál.* (ed.) (In Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Nueva York, 1998). Los pares de cebadores para la amplificación pueden derivar de una secuencia conocida, por ejemplo, mediante el uso de programas informáticos destinado a tales fines tal como Primer (Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge, Mass.). Un experto en la técnica entenderá que la especificidad de una sonda o cebador específico aumenta con su longitud. Por lo tanto, por ejemplo, un cebador que comprende 30 nucleótidos consecutivos de un nucleótido que codifica ARNr o región flanqueante de

este se alineará a una secuencia diana con especificidad más alta que un cebador correspondiente con solo 15 nucleótidos. Por lo tanto, a modo de obtener mayor especificidad, se puede seleccionar sondas y cebadores que comprenden al menos 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 o más nucleótidos consecutivos de una secuencia de nucleótidos diana tal como ARNr de 16S.

- Las técnicas normales para la preparación de ácidos nucleicos útiles para las aplicaciones de ácido nucleico (por ejemplo, PCR) incluyen la extracción de fenol/cloroformo o el uso de uno de los muchos kits de extracción de ADN que están disponibles en el mercado.
- 10 Otra manera en que el ADN puede ser amplificado es mediante la adición de células directamente en la mezcla de reacción de la amplificación del ácido nucleico y la dependencia en la etapa de desnaturalización de la amplificación para lisar las células y liberar el ADN.
- 15 El producto de las reacciones de amplificación del ácido nucleico se pueden caracterizar adicionalmente mediante una o más de las técnicas estándar que son bien conocidas en la técnica, inclusive electroforesis, los patrones de escisión de las endonucleasas de restricción, la hibridación o ligación de oligonucleótidos, y/o la secuenciación de ácidos nucleicos. Cuando las técnicas de hibridación se utilizan a los efectos de la identificación
- 20 celular, una variedad de métodos de marcado pueden ser útiles, incluso el marcado fluorescente, marcado radioactivo y el marcado no radioactivo. Cuando se usan las técnicas de secuenciación del ácido nucleico, se puede conducir una búsqueda de homología para la secuencia de nucleótidos de las moléculas de ácido nucleico amplificadas usando varias bases de datos de secuencias conocidas, incluso, de modo no
- 25 taxativo, las bases de datos DDBJ/GenBank/EMBL.

- b. Análisis con base en proteínas: Además del análisis de ácidos nucleicos, los microorganismos se pueden caracterizar de manera taxonómica e identificarse en función de la presencia (o ausencia) de proteínas específicas directamente. Dicho análisis se
- 30 puede basar en la actividad de la proteína específica, por ejemplo, a través de un ensayo de enzimas o mediante la respuesta de un cocultivo de organismos o mediante la mera presencia de la proteína especificada (que puede por ejemplo determinarse usando métodos inmunológicos, tales como la tinción inmunofluorescente con anticuerpos *in situ*.)

Ensayos de enzimas: A modo de ejemplo, los análogos de sustrato fluorescente o cromogénico se pueden incluir en el medio de crecimiento (por ejemplo, placa de microtitulación para cultivos), seguido de la incubación y el análisis para determinar los productos de reacción, lo cual identifica de esta manera los cultivos en función de sus actividades enzimáticas.

Respuesta de cocultivo: En algunas modalidades de la presente invención, la actividad de una enzima llevada a cabo por un microbiano aislado se puede analizar en función de la respuesta (o el grado de respuesta) de un organismo cocultivado (tal como un organismo reportero).

También se puede utilizar una variedad de métodos para la identificación de microorganismos seleccionados y aislados de un entorno fuente mediante la unión de al menos un anticuerpo o molécula derivada de un anticuerpo a una molécula, o más particularmente un epítipo de una molécula, del microorganismo.

Los anticuerpos antimicroorganismo de la proteína se pueden producir haciendo uso de procedimientos estándar descritos en una cantidad de textos que incluyen Harlow y Lane (*Antibodies, A Laboratory Manual*, CSHL, Nueva York, 1988). La determinación de que un agente particular se une básicamente solo a una proteína del microorganismo deseado se puede elaborar fácilmente mediante el uso o el ajuste de procedimientos de rutina. Un ensayo *in vitro* adecuado hace uso del procedimiento de transferencia de Western (descrito en muchos textos estándar que incluyen Harlow y Lane (*Antibodies, A Laboratory Manual*, CSHL, Nueva York, 1988)).

Los fragmentos más cortos de anticuerpos (moléculas derivadas de anticuerpos, por ejemplo, FAbs, Fvs, y Fvs de cadena simple (SCFvs)) también pueden servir como agentes de unión específica. Los métodos para elaborar estos fragmentos son rutinarios.

La detección de anticuerpos que se unen a células en un conjunto de la presente invención se puede llevar a cabo mediante el uso de técnicas estándar, por ejemplo los ensayos ELISA, que proporcionan una señal que se puede detectar, por ejemplo una señal fluorescente o luminiscente.

Cultivos aislados de la invención

- Tal como se describe más detalladamente en la sección de Ejemplos de la presente descripción, los Solicitantes han descubierto varios microorganismos novedosos agrícolamente beneficiosos, por ejemplo, supresores eficaces de fusariosis. En particular, estos microorganismos antagonistas son eficaces para reducir la gravedad de la fusariosis y para la inhibición del crecimiento de *Fusarium graminearum*, el principal agente causante de fusariosis en el trigo. Se identificaron los antagonistas microbianos a partir de un grupo de aproximadamente 5000 cepas microbianas que se obtuvieron a partir de muestras de plantas silvestres tomadas de varias localidades de los Estados Unidos. La selección inicial de microorganismos antagonistas se basó en la capacidad de los microorganismos de suprimir el desarrollo del patógeno de *F. graminearum* y de su teleomorfo *Gibberella zeae* en un ensayo de antagonismo *in vitro*. Luego, los antagonistas microbianos seleccionados se sometieron a un bioensayo en un estudio de invernadero en plántulas de trigo, el cual implica la inoculación de las plántulas con las cepas microbianas, seguido de inoculaciones reiteradas de esporas de *F. graminearum*, para determinar la capacidad de las cepas microbianas para disminuir la gravedad de infestación fúngica y la capacidad de conservar el rendimiento de la semilla. Se descubrió que los microorganismos antagonistas seleccionados de esta manera son eficaces en la disminución de la gravedad de la fusariosis en las pruebas de invernadero.
- Los análisis taxonómicos determinaron adicionalmente que cada uno de los microorganismos antagonistas descritos en la presente descripción se relacionan estrechamente ya sea con el género bacteriano *Microbacterium*, el género bacteriano *Bacillus*, el género bacteriano *Variovorax* o el género fúngico *Mycosphaerella*.
- Generalmente se considera que el género *Microbacterium*, el tipo de género de la familia *Microbacteriaceae*, presenta bacterias baciliformes Gram positivas que no forman esporas, las cuales originalmente se aislaron durante los primeros estudios realizados en bacterias que producen ácido láctico. Los miembros del género *Microbacterium* se caracterizan originariamente a grandes rasgos por su marcada resistencia al calor, la presencia en lácteos, y la producción de pequeñas cantidades de L (+) ácido láctico a partir de glucosa. A diferencia de otros géneros de la familia *Microbacteriaceae* en que las especies se caracterizan mediante un tipo de peptidoglicano coherente, las especies de *Microbacterium* poseen ornitina o lisina ya sea en el puente inter-peptido o en la posición 3 del peptidoglicano tipo B. En otras propiedades quimiotaxanómicas, tales como quinonas isoprenoides (MK-11, MK-12, MK-13), lípidos polares, ácidos grasos y

composición base de ADN, los miembros del género exhiben la gama usual de diversidad que se encuentra en otros géneros de Microbacteriaceae. Los dos géneros bacterianos *Microbacterium* y *Aureobacterium* se pueden unir de conformidad con algunos estudios de taxonomía. A la fecha, los miembros del género *Microbacterium* comprenden al menos 33 especies, las cuales se han aislado de una amplia gama de hábitats, lo cual incluye suelos, productos lácteos, agallas vegetales, insectos o especímenes clínicos. Recientemente, Evtushenko y Takeuchi (2006) han sintetizado varios aspectos de su ecología, filogenia, taxonomía, métodos de cultivo y condiciones de preservación a largo plazo. Un experto en la técnica entenderá fácilmente que un microorganismo del género *Microbacterium* se puede identificar taxonómicamente a grandes rasgos mediante cualquier técnica de identificación taxonómica descrita anteriormente, lo que incluye el análisis quimiotaxonómico del peptidoglicano de la pared celular y el análisis comparativo de la secuencia de ADNr de 16S tal como se describe en Evtushenko y Takeuchi (2006) y las referencias que se citan en este, así como también en aquellas descritas en los Ejemplos 2-3 de la presente descripción. Tal como se trata en detalle más adelante, a la fecha se ha registrado que varios microorganismos de origen natural presentan actividad antagonista contra la fusariosis. Sin embargo, no figuran registros anteriores a la presente invención que describan un microorganismo del género *Mycobacterium* con dicha actividad antagonista. Adicionalmente, previo a la presente invención, los presentes inventores no eran conscientes de la existencia de un método o proceso que utilizara una cepa bacteriana del género *Mycobacterium* como agente de biocontrol en la prevención, la inhibición o el tratamiento del desarrollo de un patógeno causante de la fusariosis.

El género *Bacillus* es un género de bacterias baciliformes, Gram positivas/variables, que forman esporas. De manera similar a otros géneros asociados al inicio de la historia de la microbiología, tales como *Pseudomonas* o *Vibrio*, aproximadamente 266 miembros de la especie del género *Bacillus* se encuentran de forma ubicua, y se considera que es uno de los géneros con la mayor diversidad de 16S y de diversidad ambiental. La especie *Bacillus* puede ser aerobia obligada o anaerobia facultativa, y dar positivo en la prueba de enzima catalasa. De naturaleza ubicua, *Bacillus* incluye tanto especies de vida libre como patógenas. En condiciones ambientales estresantes, las células producen endosporas ovaladas que pueden permanecer inactivas durante períodos de tiempo prolongados. Estas características definieron originalmente el género, pero no todas las especies están estrechamente relacionadas, y se pueden haber trasladado a otros géneros. De hecho, varios estudios han intentado reconstruir la filogenia del género. El estudio específico de

Bacillus que cubre la mayor diversidad es el de Xu y Cote [Intl. J. of Syst. Evol. Microbiol. 53 (3): 695-704; 2003], que usa 16S y la región ITS, donde se divide el género en 10 grupos, que incluye los géneros anidados *Paenibacillus*, *Brevibacillus*, *Geobacillus*, *Marinibacillus* y *Virgibacillus*. Sin embargo, de acuerdo con estudios más recientes, el género *Bacillus* contiene una cantidad muy grande de taxones anidados y especialmente tanto en 16S como en 23S, se considera que es parafilético de Lactobacillales (*Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Listeria*, etc.), debido a *Bacillus coahuilensis* y otros (véase, por ejemplo, Yorda et ál., Syst. Appl. Microbiol. 31 (4): 241-250, 2008; Yorda et ál., Syst. Appl. Microbiol. 33 (6): 291-299, 2010]. Un clado particular, formado por *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. mycoides*, *B. pseudamycoides*, *B. thuringiensis* y *B. weihenstephanensis* según los estándares actuales de clasificación, debería ser una única especie (dentro del 97 % de identidad con 16S), pero a causa de razones médicas, se consideran una especie aparte. Además de los métodos de análisis de taxonomía descritos en los Ejemplos 2-3 de la presente descripción, los análisis filogenéticos y taxonómicos de la especie *Bacillus* se pueden realizar mediante una variedad de técnicas, incluso aquellas que se tratan en detalle en Xu y Cote, 2003; Yorda et ál., 2008; Yorda et ál., 2010.

El género *Variovorax* se creó originariamente mediante la reclasificación de *Alcaligenes paradoxus* como *Variovorax paradoxus* (Willems et ál., 1991), que se considera como el tipo de especie de este género. Se ha estudiado *V. paradoxus* exhaustivamente como un modelo para los agentes de biodegradación novedosos, así como también las interacciones microbio/microbio y microbio/planta. Otras especies incluyen *V. dokdonensis*, *V. soli* (Kim et ál., 2006), y *V. boronicumulans* (Miwa et ál., 2008). Las especies *Variovorax* son catabólicamente muy diversas y entablan interacciones mutuamente beneficiosas con otras especies bacterianas en muchas biodegradaciones, y por lo tanto poseen importancia ecológica y un alto potencial de aplicación. Por ejemplo, un metanotrofo del suelo, solo cuando se cocultivan junto con una cepa *V. paradoxus*, presenta alta afinidad por metano (un potente gas invernadero), y esta característica usualmente no se observa en cultivos de laboratorio. De manera similar, se ha descubierto que un pariente cercano de *Variovorax* es el compañero central, no fotosintético, dentro del consorcio fototrópico "*Chlorochromatium aggregatum*". Algunas especies del género *Variovorax* también tienen la capacidad de interferir con la comunicación de otras bacterias. Aun otras especies del género *Variovorax* pueden interactuar íntimamente con otra biota (por ejemplo, plantas) en varios ecosistemas.

Además, se ha registrado que algunas especies de *Variovorax*, que habitan en el área justo afuera de las raíces de la planta y/o dentro de la planta, son capaces de promover el crecimiento de la planta a través de la reducción de los niveles de etileno, la represión de patogénesis controlada por la percepción de quórum, y el aumento de la resistencia a metales pesados, que en gran medida benefician la fitorremediación. Además de los métodos de análisis de taxonomía descritos en los Ejemplos 2-3 de la presente descripción, los análisis filogenéticos y taxonómicos de la especie *Variovorax* se pueden realizar mediante una variedad de técnicas, incluso aquellas que se tratan en detalle en otra parte de la presente.

Mycosphaerella es un género fúngico muy amplio, con más de 2000 nombres de especies y al menos 500 especies asociadas con más de 40 géneros anamorfos (especialmente *Cercospora*, *Pseudocercospora*, *Septoria*, *Ramularia*, etc.). Además, varios miles de anamorfos carecen de telomorfos. El género de *Mycosphaerella* incluye especies que son patógenos, saprobios, endofitos o asociaciones mutualísticas. Recientemente, se han registrado varios aspectos de su ecología, filogenia, taxonomía, métodos de cultivo y condiciones de preservación a largo plazo (véase, por ejemplo, Crous *et al.*, *Persoonia*, 23:119-146, 2009). Un experto en la técnica entenderá fácilmente que el microorganismo del género *Mycosphaerella* se puede identificar taxonómicamente mediante cualquiera de las técnicas taxonómicas descritas anteriormente o una combinación de estas. Las técnicas más comunes incluyen los análisis de secuencia comparativa usando secuencias de ADNr de 16S y las regiones espaciadoras transcritas internas, tal como se describe en, por ejemplo, Crous *et al.*, *Studies in Mycology*, 55:235-253, 2006; Crous *et al.*, 2009, *supra*; Goodwin *et al.*, *Phytopathology* 91: 648-658, 2001; y las que se describen en los Ejemplos 2-3 de la presente descripción.

Depósito de material biológico

Los cultivos purificados de cepas microbianas, identificados como los que presentan una actividad supresora contra fusariosis, se depositaron en la Colección de Cultivos del Servicio de Investigación Agrícola ubicado en 1815 N. University Street, Peoria, IL 61604, EUA (NRRL) de conformidad con el Tratado de Budapest a los efectos del procedimiento en materia de patentes y las regulaciones de este (Tratado de Budapest). Los números de registro de estos depósitos son los siguientes:

Id. de Cepa SGI	N.º de registro	Taxonomía Provisional
SGI-005-G08	NRRL -	<i>Microbacterium sp.</i>
SGI-010-H11	NRRL 50471	<i>Mycosphaerella sp.</i>
SGI-014-C06	NRRL B-50470	<i>Microbacterium sp.</i>
SGI-014-G01	NRRL B-50469	<i>Variovorax sp.</i>
SGI-015-F03	NRRL B-50760	<i>Bacillus sp.</i>
SGI-015-H06	NRRL B-50761	<i>Bacillus sp.</i>

- Las cepas microbianas se han depositado en condiciones que aseguran que el acceso al cultivo estará disponible, mientras que esta solicitud de patente se encuentre pendiente, para quien designe con este derecho el Comisionado de Patentes y Marcas Comerciales de conformidad con el artículo 37 del C.F.R. §1.14 y el título 35 del U.S.C. §122. Los depósitos representan básicamente cultivos puros de las cepas depositadas. Los depósitos están disponibles según lo requiera la legislación extranjera en materia de patentes en los países donde se presentan los equivalentes a la presente solicitud o su progenie. Sin embargo, debe entenderse que la disponibilidad de un depósito no constituye una licencia para poner en la práctica el objeto de la invención en menoscabo de los derechos de patente otorgados mediante acciones gubernamentales.
- Los microorganismos preferidos de la presente invención presentan todas las características identificatorias de las cepas depositadas y, en particular, las características identificatorias de la capacidad de suprimir el desarrollo de la fusariosis tal como se describe en la presente, y la capacidad de suprimir el desarrollo del patógeno *Fusarium graminearum* y su teleomorfo *Gibberella zeae* tal como se describe en la presente. En particular, los microorganismos preferidos de la presente invención hacen referencia a los microorganismos depositados tal como se describe anteriormente, y los mutantes de estos.

Composiciones microbiológicas

- Las composiciones microbiológicas de la presente invención que comprenden las cepas microbianas aisladas o cultivos de estas pueden encontrarse en una variedad de formas, inclusive, de modo no taxativo, cultivos inmóviles, cultivos enteros, solución de células, micelio y/o hifas almacenadas (en particular, soluciones de glicerol), tiras de agar, tapones de agar almacenados en glicerol/agua, soluciones liofilizadas y soluciones secas tales

como liofilizado o micelio secado en papel de filtro o semillas de grano. Tal como se define en la presente, se entiende que "cultivo aislado" o los equivalentes gramaticales, según se emplean en esta descripción y en la técnica, quiere decir que el cultivo al que se hace referencia es un cultivo de fluido, sedimento, raspado, muestra en seco, liofilado o sección
 5 (por ejemplo, hifa o micelio); o un soporte, contenedor, o medio tal como una placa, papel, filtro, matriz, paja, pipeta o punta de pipeta, fibra, aguja, gel, hisopo, tubo, recipiente, partícula, etc. que contiene un único tipo de organismo. En la presente invención, un cultivo aislado de un antagonista microbiano es un fluido de cultivo o un raspado, sedimento, preparación en seco, liofilado o sección del microorganismo, o un soporte,
 10 contenedor o medio que contiene el microorganismo, en ausencia de otros organismos.

La presente descripción proporciona adicionalmente composiciones que contienen al menos una cepa microbiana aislada o cultivos de esta de la presente invención y un portador. El portador puede ser cualquiera de uno o más de una cantidad de portadores
 15 que confieren una variedad de propiedades tales como mayor estabilidad, humectabilidad, dispersabilidad, etc. Los agentes humectantes tales como tensioactivos naturales o sintéticos, que pueden ser tensioactivos no iónicos o iónicos, o una combinación de estos se puede incluir en una composición de la invención. Las emulsiones de agua en aceite también se pueden utilizar para formular una composición que incluya al menos un
 20 microorganismo aislado de la presente invención (véase, por ejemplo, la patente estadounidense N.º 7,485,451, la cual se incorpora a la presente mediante esta referencia). Las formulaciones adecuadas que se pueden preparar incluyen polvos humedecibles, gránulos, geles, tiras de agar o sedimentos, espesantes y similares, partículas microencapsuladas, y similares, líquidos tales como fluidos acuosos,
 25 suspensiones acuosas, emulsiones de agua en aceite, etc. La formulación puede incluir productos en grano o legumbre (por ejemplo, grano de tierra o porotos, caldo o harina derivados del grano o porotos), almidón, azúcar o aceite. El portador puede ser un portador agrícola. En determinadas modalidades preferidas, el portador es una semilla, y la composición se puede aplicar o usar como recubrimiento sobre la semilla o dejar que
 30 sature a la semilla.

En algunas modalidades, el portador agrícola puede ser la tierra o un medio de crecimiento vegetal. Otros portadores agrícolas que se pueden utilizar incluyen agua, fertilizantes, aceites con base en vegetales, humectantes o combinaciones de estos. De
 35 manera alternativa, el portador agrícola puede ser un sólido, tal como tierra diatomácea,

marga, sílice, alginato, arcilla, bentonita, vermiculita, vainas, otros productos animales y vegetales o combinaciones, que incluyen gránulos, sedimentos o suspensiones. Las mezclas de cualquiera de los ingredientes antemencionados también se consideran portadores, tales como de modo no taxativo, pesta (harina y arcilla de caolín), sedimentos a base de agar o harina en marga, arena o arcilla, etc. Las formulaciones pueden incluir

5 fuentes alimenticias para los organismos cultivados, tal como cebada, arroz, u otros materiales biológicos como semilla, partes de planta, bagazo de caña de azúcar, cáscaras o cañas a partir del procesamiento del grano, material de la planta sobre la tierra (por ejemplo, "desechos de jardín") o madera de los desechos de un sitio de construcción,

10 aserrín o pequeñas fibras del reciclaje de papel, tela o madera. Otras formulaciones adecuadas serán conocidas para los expertos en la técnica.

En la forma líquida, por ejemplo, las soluciones o suspensiones, los microorganismos se pueden mezclar o suspender en agua o en soluciones acuosas. Los diluyentes o

15 portadores líquidos adecuados incluyen agua, soluciones acuosas, destilados de petróleo u otros portadores líquidos.

Las composiciones sólidas se pueden preparar mediante la dispersión de microorganismos antagonistas en y sobre un portador sólido adecuadamente dividido, tal como turba, trigo, salvado, vermiculita, arcilla, talco, bentonita, tierra diatomácea, tierra de

20 Fuller, suelo pasteurizado, y similares. Cuando dichas formulaciones se utilizan como polvos humedecibles, se puede emplear agentes dispersantes biológicamente compatibles tales como agentes dispersantes y emulsionantes no iónicos, aniónicos, anfotéricos o catiónicos.

25 En una modalidad preferida, las composiciones contempladas en la presente previenen el ataque de la fusariosis sobre las plantas, en particular las plantas gramíneas, tales como trigo, cebada, avena y maíz y, si se usan en cantidades suficientes, actúan como antagonistas microbianos. Estas composiciones, de manera similar a los demás agentes

30 de biocontrol, tienen un alto margen de seguridad ya que normalmente no quema ni daña la planta.

Tal como se describe en mayor detalle en la presente descripción, el control de la fusariosis se puede efectuar mediante la aplicación de uno o más composiciones

35 microbiológicas de la presente invención a una planta hospedadora o partes de una planta

hospedadora. Las composiciones se pueden aplicar en una cantidad eficaz para reducir el nivel de fusariosis con relación a la del control sin tratar. Los constituyentes activos se utilizan en una concentración suficiente para inhibir el desarrollo del patógeno de la planta del patógeno de la planta diana cuando se aplica a la planta gramínea. Como será

5 evidente para un experto en la técnica, las concentraciones eficaces pueden variar en función de factores tales como: (a) el tipo de la planta o materia prima agrícola; (b) el estado fisiológico de la planta o materia prima agrícola; (c) la concentración de patógenos que afectan la planta o materia prima agrícola; (d) el tipo de daño de la enfermedad a la

10 planta o materia prima agrícola; (e) condiciones climáticas (por ejemplo, temperatura, humedad); y (f) la etapa de la enfermedad de la planta. De acuerdo con la invención, las concentraciones normales son aquellas mayores que 1×10^2 CFU/mL de portador. Las concentraciones preferidas oscilan entre alrededor de 1×10^4 a alrededor de 1×10^9 CFU/mL, tal como las concentraciones que oscilan entre 1×10^6 y 1×10^8 CFU/mL. Las concentraciones más preferidas son aquellas de alrededor de 35 a alrededor de 150 mg

15 de masa microbiana seca por gramo de portador (formulación seca) o por mililitro de portador (composición líquida). En las formulaciones sólidas, la tasa de aplicación debería controlarse para lograr una cantidad similar de células viables por área de unidad de superficie de tejido de plantas, como la obtenida mediante las tasas antemencionadas de tratamiento líquido. Típicamente, los agentes de control biológico de la presente invención

20 son efectivos biológicamente cuando se administran a una concentración en exceso de 10^6 CFU/g (unidades formadoras de colonias por gramo), preferentemente en exceso de 10^7 CFU/g, más preferentemente 10^8 CFU/g y más preferentemente a 10^9 CFU/g.

En algunas modalidades, la cantidad de uno o más de los agentes de control biológico en

25 las composiciones microbianas de la presente invención pueden variar en función de la formulación final así como también el tamaño o el tipo de planta o semilla utilizada. Preferentemente, el uno o más agentes de control biológico en las composiciones microbianas están presentes en aproximadamente 2 % p/p a aproximadamente 80 % p/p de la formulación total. Más preferentemente, el uno o más agentes de control biológico

30 empleados en las composiciones es aproximadamente 5 % p/p a aproximadamente 65 % p/p y más preferentemente aproximadamente 10 % p/p a aproximadamente 60 % p/p en peso de la formulación total.

Tal como lo entenderán los expertos en la técnica, las composiciones microbiológicas de

35 la invención se pueden aplicar en las plantas de trigo u otros cereales usando una

variedad de métodos convencionales tales como espolvoreo, recubrimiento, inyección, frotación, con rodillo, inmersión, pulverización o cepillado, o cualquier otra técnica adecuada que no dañe significativamente la planta de trigo u otros cereales a ser tratados. Particularmente se prefiere el método de pulverización.

5

Normalmente, las composiciones de la invención son químicamente inertes; por lo tanto son básicamente compatibles con cualquier constituyente del programa de pulverización. También se pueden utilizar en combinación con agentes pesticidas activos biológicamente compatibles como, por ejemplo, herbicidas, nematocidas, fungicidas, insecticidas, y

10

similares. También se pueden utilizar en combinación con sustancias que afectan el crecimiento de las plantas, tales como fertilizantes, reguladores del crecimiento de las plantas, y similares, siempre que dichos compuestos o sustancias sean biológicamente compatibles.

15

Cuando se usan como pesticidas o fungicidas en sus formulaciones comercialmente disponibles y en las formas de uso, preparadas a partir de estas formulaciones, los antagonistas microbianos activos y las composiciones de acuerdo con la presente invención pueden estar adicionalmente presentes en la forma de una mezcla con sinergistas. Los sinergistas son compuestos mediante los cuales se incrementa la

20

actividad de las composiciones activas sin que sea necesario que el sinergista agregado sea activo en sí mismo.

Cuando se usan como pesticidas en sus formulaciones comercialmente disponible y en sus formas de uso, preparados a partir de estas formulaciones, los antagonistas

25

microbianos activos y las composiciones de acuerdo con la invención pueden además estar presentes en la forma de una mezcla con inhibidores que reducen la degradación de las composiciones activas después de la aplicación en el hábitat de la planta, en la superficie de partes de las plantas o en los tejidos de la planta.

30

Los antagonistas microbianos activos y las composiciones de acuerdo con la invención, como tales o en sus formulaciones, también se pueden usar como una mezcla con acaricidas, bactericidas, fungicidas, insecticidas, microbicidas, nematocidas, pesticidas conocidos o combinaciones de estos, por ejemplo, a fin de ampliar el espectro de acción o impedir el desarrollo de resistencias de este modo. En muchos casos, dan como resultado

35

efectos sinérgicos, es decir, la actividad de la mezcla puede superar la actividad de los

componentes individuales. También se contempla una mezcla con otros compuestos activos conocidos, tales como fertilizantes, reguladores del crecimiento, protectores y/o semiquímicos.

- 5 En una modalidad preferida de la presente invención, las composiciones pueden incluir adicionalmente al menos un pesticida químico o biológico. La cantidad de al menos un pesticida químico o biológico empleado en las composiciones puede variar en función de la formulación final así como también el tamaño de la planta y la semilla a tratar. Preferentemente, el al menos un pesticida químico o biológico empleado es alrededor de
- 10 0,1 % p/p a alrededor de 80 % p/p con base en la formulación total. Más preferentemente, el al menos un pesticida químico o biológico está presente en una cantidad de alrededor de 1 % p/p a alrededor de 60 % p/p y más preferentemente alrededor de 10 % p/p a alrededor de 50 % p/p.
- 15 Una variedad de pesticidas es evidente para un experto en la técnica y los puede utilizar. Los pesticidas químicos de ejemplo incluyen los que se encuentran en las clases de carbamato, organofosfato, organoclorado, y piretroide. También incluye agentes de control químico tales como, de modo no taxativo, benomil, borax, captafol, captan, clorotalonil, formulaciones que contienen cobre; formulaciones que contienen diclon, dicloran, yodo,
- 20 cinc; fungicidas que inhiben biosíntesis de ergosterol tales como de modo no taxativo blasticidina, cimoxanilo, fenarimol, flusilazol, folpet, imazalil, iprodiona, maneb, mancozeb, metalaxilo, oxicarboxina, miclobutanilo, oxitetraciclina, PCNB, pentaclorofenol, procloraz, propiconazol, quinometionato, arsenito de sodio, DNOC de sodio, hipoclorito de sodio, fenilfenato de sodio, estreptomycin, azufre, tebuconazol, terbutrazol, tiabendazol,
- 25 tiofanato de metilo, triadimefón, triciclazol, triforina, validamicina, vinclozolin, zineb y ziram. Una variedad de compuestos insecticidas pueden ser útiles para las composiciones de la invención, que incluye de modo no taxativo los que se citan en la solicitud de patente estadounidense N.º 20110033432A1.
- 30 Las composiciones microbiológicas de la presente invención incluyen preferentemente al menos un pesticida biológico. Los pesticidas biológicos de ejemplo que son adecuados para su uso en la presente y que se pueden incluir en una composición microbiológica de acuerdo con la presente invención para prevenir una enfermedad patógena de la planta que incluye microbios, animales, bacterias, hongos, material genético, planta y productos
- 35 naturales de organismos vivos. En estas composiciones, el microorganismo de la presente

invención se halla aislado antes de la formulación con un organismo adicional. Por ejemplo, los microbios tales como, de modo no taxativo, especies de *Ampelomyces*, *Aureobasidium*, *Bacillus*, *Beauveria*, *Candida*, *Chaetomium*, *Cordyceps*, *Cryptococcus*, *Dabaryomyces*, *Erwinia*, *Exophiala*, *Gliocladium*, *Mariannaea*, *Paecilomyces*, *Paenibacillus*,
 5 *Pantoea*, *Pichia*, *Pseudomonas*, *Sporobolomyces*, *Talaromyces* y *Trichoderma*, se pueden proveer en una composición, de manera particular se prefieren los microorganismos antagonistas de la presente invención, con cepas fúngicas del género *Muscodora*. El uso de las composiciones microbiológicas de acuerdo con la presente invención en combinación con los antagonistas microbianos descritos en la patente estadounidense N.º
 10 7,518,040; la patente estadounidense N.º 7,601,346; la patente estadounidense N.º 6,312,940 también se prefiere de manera particular.

Los ejemplos de hongos que se pueden combinar con antagonistas microbianos y composiciones de la presente invención en una composición incluyen, de modo no
 15 taxativo, especies *Muscodora*, *Aschersonia aleyrodis*, *Beauveria bassiana* ("muscarina blanca"), *Beauveria brongniartii*, *Chladosporium herbarum*, *Cordyceps clavulata*, *Cordyceps entomorrhiza*, *Cordyceps facis*, *Cordyceps gracilis*, *Cordyceps melolanthae*, *Cordyceps militaris*, *Cordyceps myrmecophila*, *Cordyceps ravenelii*, *Cordyceps sinensis*, *Cordyceps sphecocephala*, *Cordyceps subsessilis*, *Cordyceps unilateralis*, *Cordyceps*
 20 *variabilis*, *Cordyceps washingtonensis*, *Culicinomyces clavosporus*, *Entomophaga grylli*, *Entomophaga maimaiga*, *Entomophaga muscae*, *Entomophaga praxibulli*, *Entomophthora plutellae*, *Fusarium lateritium*, *Hirsutella citrifomis*, *Hirsutella thompsoni*, *Metarhizium anisopliae* ("muscarina verde"), *Metarhizium flctviride*, *Muscodora albus*, *Neozygitesfloridana*, *Nomuraea rileyi*, *Paecilomyces farinosus*, *Paecilomyces*
 25 *fumosoroseus*, *Pandora neoaphidis*, *Tolypocladium cylindrosporum*, *Verticillium lecanii*, *Zoophthora radicans* y especies micorriza tales como *Laccaria bicolor*. Otras especies micopesticidas serán evidentes para los expertos en la técnica.

La presente invención también proporciona métodos para el tratamiento de una planta
 30 mediante la aplicación de cualquiera de una variedad de formulaciones habituales en una cantidad eficaz ya sea al suelo (es decir, en el surco), a una parte de la planta (es decir, mojar) o a la semilla antes de plantarla (es decir, recubrimiento de la semilla o abono). Las formulaciones habituales incluyen soluciones, concentrado emulsionable, polvos humedecibles, concentrado de suspensión, polvos solubles, gránulos, concentrado de
 35 suspensión-emulsión, materiales naturales y sintéticos impregnados con el compuesto

activo, y cápsulas de liberación controlada muy finas en sustancias poliméricas. En determinadas modalidades de la presente invención, las composiciones de control biológico son formuladas en polvos que están disponibles ya sea en una formulación lista para su uso o son mezcladas entre sí al momento del uso. En cualquiera de estas
5 modalidades, el polvo se puede mezclar con el suelo antes o en el momento de la plantación. En una modalidad alternativa, uno o ambos de ya sea el agente de control biológico o el agente de control de insectos es una formulación líquida que se mezcla al momento del tratamiento. Un experto en la técnica entiende que una cantidad eficaz de las composiciones de la invención depende de la formulación final de la composición así
10 como del tamaño de la planta o el tamaño de la semilla a ser tratada.

Dependiendo de la formulación final y el método de aplicación, uno o más aditivos adecuados también pueden introducirse a las composiciones de la presente invención. Pueden agregarse adhesivos, tal como carboximetilcelulosa y polímeros naturales y
15 sintéticos en la forma de polvos, gránulos o látex, tal como goma arábica, quitina, alcohol polivinílico y acetato de polivinilo, así como fosfolípidos naturales, tal como cefalinas y lecitinas, y fosfolípidos sintéticos, a las composiciones de la presente.

En una modalidad preferida, las composiciones microbiológicas están formuladas en una
20 solución, emulsión o suspensión individual y estable. Para las soluciones, los compuestos químicos activos (es decir, los agentes de control de plagas) se disuelven típicamente en solventes antes de que se agregue el agente de control biológico. Los solventes líquidos adecuados incluyen aromáticos a base de petróleo, tal como xileno, tolueno o alquilnaftalenos, hidrocarburos alifáticos, tal como ciclohexano o parafinas, por ejemplo
25 fracciones de petróleo, aceites minerales y vegetales, alcoholes, tal como butanol o glicol así como sus éteres y ésteres, cetonas, tal como metil etil cetona, metil isobutil cetona o ciclohexanona, solvente altamente polares, tal como dimetilformamida y dimetil sulfóxido. Para emulsiones y suspensiones, el medio líquido es agua. En una modalidad, el agente de control químico y el agente de control biológico se suspenden en líquidos separados y
30 se mezclan al momento de la aplicación. En una modalidad preferida de suspensión, el agente de control de insectos y el biológico se combinan en una formulación lista para utilizar, que presenta una vida útil de al menos dos años. En el uso, el líquido puede pulverizarse o puede aplicarse foliarmente como por pulverización o en el surco al momento de plantar el cultivo. La composición líquida puede introducirse en el suelo antes
35 de la germinación de la semilla o directamente en el suelo en contacto con las raíces

mediante la utilización de una variedad de técnicas conocidas en la técnica, incluyendo, de modo no taxativo, irrigación por goteo, rociadores, inyección en el suelo o mediante el empapado del suelo.

- 5 Opcionalmente, se pueden agregar estabilizadores y amortiguadores, incluyendo sales de metales alcalinos y alcalinotérreos y ácidos orgánicos, tal como ácido cítrico y ácido ascórbico, ácidos inorgánicos, tal como ácido clorhídrico o ácido sulfúrico. También pueden agregarse biocidas y pueden incluirse formaldehídos o agentes de liberación de formaldehído, y derivados de ácido benzoico, tal como ácido p-hidrobenczoico.

10

Formulación de recubrimiento de semillas

- En algunas modalidades preferidas en particular, las composiciones de biocontrol de la presente invención se formulan como un tratamiento de semillas. El tratamiento de
- 15 semillas comprende preferentemente al menos un agente de control de insectos y al menos un agente de control biológico. Se contempla que las semillas puedan cubrirse sustancialmente de manera uniforme con una o más capas de las composiciones de biocontrol divulgadas en la presente usando métodos convencionales de mezcla, pulverización o una combinación de estos a través del uso de equipamiento de aplicación
- 20 de tratamiento que se diseña y fabrica específicamente para aplicar de manera precisa, segura y eficiente los productos de tratamiento de semillas a las semillas. Dicho equipamiento utiliza varios tipos de tecnología de recubrimiento tal como recubridores rotatorios, recubridores de tambor, técnicas de lecho fluidizado, de lechos con salida a chorro, rociadores rotatorios o una combinación de estos. Los tratamientos para semillas
- 25 líquidos tal como los de la presente invención pueden aplicarse por medio ya sea de un disco rotatorio "atomizador" o una boquilla pulverizadora que distribuye de forma pareja el tratamiento de semilla en las semillas mientras se mueve a lo largo de un patrón de pulverización. Preferentemente, la semilla luego se mezcla o se precipita durante un período de tiempo adicional para lograr la distribución adicional del tratamiento y el
- 30 secado. Las semillas pueden estar imprimadas o no antes del recubrimiento con las composiciones de la invención para aumentar la uniformidad de germinación y surgimiento. En una modalidad alternativa, una formulación de polvo seco puede colocar de forma medida en las semillas en movimiento y se deja mezclar hasta que se distribuye por completo.

35

Otro aspecto de la invención proporciona semillas tratadas con las composiciones microbiológicas de la presente. Una modalidad proporciona semillas que tienen al menos parte del área de superficie recubierta con una composición microbiológica de acuerdo con la presente invención. En una modalidad específica, las semillas tratadas con microorganismos tienen una concentración de esporas o una concentración de células microbianas de alrededor de 10^6 a alrededor de 10^9 por semilla. Las semillas también pueden tener más esporas o células microbianas por semilla, tal como, por ejemplo 10^{10} , 10^{11} o 10^{12} esporas por semilla. Las esporas microbianas y/o las células pueden recubrir libremente las semillas o, preferentemente, pueden formularse en una composición líquida o sólida antes de recubrir las semillas. Por ejemplo, una composición sólida que comprende los microorganismos puede prepararse por mezclado de un portador sólido con una suspensión de las esporas hasta que los portadores sólidos están impregnados con la suspensión de esporas o células. Esta mezcla puede entonces secarse para obtener las partículas deseadas.

En algunas otras modalidades, se contempla que las composiciones de biocontrol sólidas o líquidas de la presente invención contengan adicionalmente agentes funcionales capaces de proteger las semillas de los efectos dañinos de herbicidas seleccionados, tal como carbono activado, nutrientes (fertilizantes) y otros agentes capaces de mejorar la germinación y la calidad de los productos o una combinación de estos.

Los métodos y composiciones de recubrimiento de semillas que son conocidos en la técnica pueden ser particularmente útiles cuando se modifican mediante la adición de una o más de las modalidades de la presente invención. Dichos métodos y aparatos de recubrimiento para su aplicación se describen en, por ejemplo, las patentes estadounidenses n.º 5,918,413; 5,554,445; 5,389,399; 4,759,945; y 4,465,017. Varias composiciones de recubrimiento de semillas se describen, por ejemplo, en las solicitudes de patente estadounidense n.º US20110033432, US20100154299, las patentes estadounidenses n.º 5,939,356; 5,876,739, 5,849,320; 5,791,084, 5,661,103; 5,580,544, 5,328,942; 4,735,015; 4,634,587; 4,372,080, 4,339,456; o 4,245,432, entre otras.

Puede agregarse una variedad de aditivos a las formulaciones de tratamiento de semillas que comprenden las composiciones de la invención. Pueden agregarse aglutinantes, incluyendo aquellos compuestos preferentemente de un polímero adhesivo que puede ser natural o sintético sin efectos fitotóxicos en la semilla que va a ser recubierta. El

aglutinante puede seleccionarse de acetatos de polivinilo; copolímeros de acetato de polivinilo; copolímeros de acetato de etilenvinilo (EVA); alcoholes polivinílicos; copolímeros de alcohol polivinílico; celulosas, incluyendo etilcelulosas, metilcelulosas, hidroximetilcelulosas, hidroxipropilcelulosas y carboximetilcelulosa; polivinilpirrolidonas; polisacáridos, incluyendo almidón, almidón modificado, dextrinas, maltodextrinas, alginato y quitosanos; grasas; aceites; proteínas, incluyendo gelatina y zeínas; goma arábica; goma laca; cloruro de vinilideno y copolímeros de cloruro de vinilideno; lignosulfonatos de calcio; copolímeros de acrílico; polivinilacrilatos; óxido de polietileno; polímeros y copolímeros de acrilamida; acrilato de polihidroxietilo, monómeros de metilacrilamida; y policloropreno.

Puede emplearse cualquiera de una variedad de colorantes, incluyendo cromóforos orgánicos clasificados como nitroso, nitro, azo, incluyendo monoazo, bisazo y poliazos; acridina, antraquinona, azina, difenilmetano, indamina, indofenol, metina, oxazina, ftalocianina, tiazina, tiazol, triarilmetano, xanteno. Se pueden agregar otros aditivos, incluyendo oligonutrientes tal como sales de hierro, manganeso, boro, cobre, cobalto, molibdeno y cinc. Puede aplicarse un polímero u otro agente de control de polvo para conservar el tratamiento en la superficie de la semilla.

En algunas modalidades específicas, además de células microbianas y las esporas, los recubrimientos pueden comprender adicionalmente una capa de adherente. El adherente debería ser no tóxico, biodegradable y adhesivo. Los ejemplos de dichos materiales incluyen, de modo no taxativo, acetatos de polivinilo; copolímeros de acetatos de polivinilo; alcoholes polivinílicos; copolímeros de alcoholes polivinílicos; celulosas, tal como metilcelulosas, hidroximetil celulosas e hidroximetil propil celulosas; dextrinas; alginatos; azúcares; melaza; polivinil pirrolidonas; polisacáridos; proteínas; grasas; aceites; goma arábica; gelatinas; jarabes; y almidones. Pueden encontrarse ejemplos en, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 7,213,367 y en la solicitud de patente estadounidense n.º US20100189693.

También pueden incluirse diversos aditivos, tal como adherentes, dispersantes, tensioactivos y nutrientes, e ingredientes amortiguadores, en la formulación de tratamiento de semillas. Otros aditivos de tratamiento de semillas convencionales incluyen, de modo no taxativo, agentes de recubrimiento, agentes humectantes, agentes amortiguadores y polisacáridos. Puede agregarse al menos un excipiente agrícolamente aceptable a la

formulación de tratamiento de semillas tal como agua, sólidos o polvos secos. Los polvos secos pueden derivar de una variedad de materiales, tal como carbonato de calcio, yeso, vermiculita, talco, humus, carbón activado y varios compuestos de fósforo.

- 5 En algunas modalidades, la composición de recubrimiento de semillas puede comprender al menos un relleno que es un compuesto natural o sintético, orgánico o inorgánico, con el cual se combinan los componentes activos para facilitar su aplicación sobre la semilla. Preferentemente, el relleno es un sólido inerte tal como arcilla, silicatos naturales o sintéticos, sílice, resinas, ceras, fertilizantes sólidos (por ejemplo, sales de amonio),
 10 minerales del suelo naturales, tal como caolinas, arcillas, talco, cal, cuarzo, atapulgita, montmorillonita, bentonita o tierras diatomáceas, o minerales sintéticos, tal como sílice, alúmina o silicatos, en particular silicatos de aluminio o magnesio.

- La formulación de tratamiento de semillas puede incluir adicionalmente uno o más de los
 15 siguientes ingredientes: otros pesticidas, incluyendo compuestos que actúan únicamente debajo del suelo; fungicidas, tal como captan, tiram, metalaxilo, fludioxonilo, oxadixilo e isómeros de cada uno de estos materiales, y similares; herbicidas, incluyendo compuestos seleccionados de glifosato, carbamatos, tiocarbamatos, acetamidas, triazinas, dinitroanilinas, éteres de glicerol, piridazinonas, uracilos, fenoxis, ureas y ácidos
 20 benzoicos; protectores herbicidas tal como benzoxazina, derivados de benzhidrido, N,N-dialil dicloroacetamida, varios compuestos de dihaloacilo, oxazolidinilo y tiazolidinilo, etanona, compuestos de anhídrido naftálico, y derivados de oxima; fertilizantes; y agentes de biocontrol tales como bacterias de origen natural o recombinantes y hongos de los géneros *Rhizobium*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Trichoderma*, *Glomus*, *Gliocladium*
 25 y hongos micorrizales. Estos ingredientes pueden agregarse como una capa separada en la semilla o, alternativamente, pueden agregarse como parte de la composición de recubrimiento de semillas de la invención.

- Preferentemente, la cantidad de composición novedosa o de otros ingredientes usados en
 30 el tratamiento de semillas no debería inhibir la germinación de la semilla, o causar daño fitotóxico a la semilla.

- Las semillas tratadas con microorganismos pueden también recubrirse adicionalmente con una película de segundo recubrimiento para proteger el recubrimiento. Dichos
 35 segundos recubrimientos son conocidos en la técnica y pueden aplicarse usando técnicas

de recubrimiento de película de tambor y lecho fluidizado.

- En principio, cualquier semilla de planta capaz de germinar para formar una planta que es susceptible al ataque de nemátodos y/o hongos patogénicos puede ser tratada de acuerdo con la invención. Las semillas adecuadas incluyen aquellas de cereales, café, cultivos de coles, cultivos de fibras, flores, frutas, legumbres, cultivos de aceite, árboles, cultivos de tubérculos, verduras, así como otras plantas de las especies monocotiledóneas y dicotiledóneas. Preferentemente se recubren semillas de cultivo, que incluyen, de modo no taxativo, semillas de poroto, zanahoria, maíz, algodón, pastos, lechuga, maní, morrón, papa, colza, arroz, centeno, sorgo, soja, remolacha azucarera, girasol, tabaco y tomate. Más preferentemente, se recubren semillas de cebada o trigo (especialmente trigo de primavera o trigo de invierno) con las composiciones de la presente invención.
- 15 También se proporciona, en otro aspecto de la presente invención, una planta gramínea novedosa creada mediante la introducción artificial de un endófito microbiano de la invención en una planta gramínea que está libre de microorganismos endofíticos. En algunas modalidades de este aspecto, el endófito microbiano que se introduce en la planta gramínea puede ser un antagonista endofítico que tiene actividad supresora contra la fusariosis o contra un agente que causa la fusariosis. Además, el antagonista endofítico introducido en la planta gramínea puede ser la cepa fúngica SGI-010-H11. Se conocen en la técnica una variedad de métodos que se descubrió previamente que eran eficaces para la introducción de un endófito microbiano en una especie de pasto cereal. Ejemplos de dichos métodos incluyen los descritos en la solicitud de patente estadounidense n.º 20030195117A1, solicitud de patente estadounidense n.º 20010032343A1 y la patente estadounidense n.º 7,084,331, entre otras. Será evidente para los expertos en la técnica que muchos de los métodos antemencionados pueden ser útiles para producir una planta gramínea novedosa de la invención.
- 25
- 30 Después de la infección artificial, se prefiere que el ADN del antagonista endofítico aislado esté amplificado mediante PCR y el antagonista esté confirmado al llevar a cabo una búsqueda de homología para el ADN amplificado. Preferentemente se prefiere que el gen extraño que expresa un medio identificable se introduzca en el antagonista endofítico antemencionado, y la presencia de colonización del antagonista endofítico antemencionado que infecta la planta se confirma mediante el medio identificable
- 35

antemencionado, usando el gen extraño.

Preparación de las composiciones de biocontrol de acuerdo con la presente invención

- 5 Los cultivos de antagonistas microbianos pueden prepararse para su uso en las composiciones de biocontrol de la invención usando técnicas de secado estático y fermentación líquida estándar conocidas en la técnica. El crecimiento se lleva comúnmente a cabo en un biorreactor.
- 10 Un biorreactor se refiere a cualquier dispositivo o sistema que sustenta un entorno biológicamente activo. Como se describe en la presente, un biorreactor es un recipiente en el cual se cultivan microorganismos, incluidos los antagonistas microbianos de la presente invención. Un biorreactor puede ser de cualquier forma o tamaño adecuados para el cultivo de microorganismos. Un biorreactor puede tener un tamaño en el rango de
- 15 10 mL hasta litros hasta metros cúbicos y puede estar hecho de acero inoxidable o cualquier otro material adecuado como se conoce y utiliza en la técnica. El biorreactor puede ser un reactor de tipo por lotes, uno del tipo de alimentación por lotes o un biorreactor de tipo continuo (por ejemplo, un biorreactor de agitación continua). Por ejemplo, un biorreactor puede ser un quimiostato conocido y usado en la técnica de la
- 20 microbiología para cultivar y recoger bacterias. Puede obtenerse un biorreactor de cualquier proveedor comercial (ver también Bioreactor System Design, Asenjo y Merchuk, CRC Press, 1995).

- 25 Para operaciones a baja escala se puede utilizar un biorreactor por lotes, por ejemplo, para evaluar y desarrollar nuevos procesos, y para los procesos que no pueden convertirse en operaciones continuas.

- 30 Los microorganismos cultivados en un biorreactor pueden suspenderse o inmovilizarse. El cultivo en el biorreactor es generalmente bajo condiciones aeróbicas a temperaturas y pH adecuados para el crecimiento. Para los organismos de la invención, el cultivo celular se puede llevar a cabo a una temperatura entre 5 y 37 °C, con la temperatura preferida en el intervalo de 15 a 30 °C, 15 a 28 °C, 20 a 30 °C, o 15 a 25 °C. El pH del medio nutriente puede variar entre 4,0 y 9,0, pero el intervalo operativo preferido es usualmente de ligeramente ácido hasta neutro, con pH 4,0 a 7,0, o 4,5 a 6,5, o pH 5,0 a 6,0. Típicamente,
- 35 el rendimiento máximo de células se obtiene a las 20-72 horas después de la inoculación.

Las condiciones óptimas para el cultivo de antagonistas de esta invención dependerán, por supuesto, de la cepa particular. Sin embargo, en virtud de las condiciones aplicadas en el proceso de selección y requisitos generales de la mayoría de los microorganismos, un experto en la técnica será capaz de determinar nutrientes y condiciones esenciales.

5 Los antagonistas microbianos se cultivarían típicamente en cultivos líquidos aeróbicos en medios que contiene fuentes de carbono, nitrógeno o sales inorgánicas que pueden ser asimiladas por el organismo y sustentar el crecimiento celular eficaz. Las fuentes de carbono preferidas son hexosas, tal como glucosa, pero pueden sustituirse con otras fuentes que son asimiladas fácilmente, tal como los aminoácidos. Pueden utilizarse
10 muchos materiales inorgánicos y proteináceos como fuentes de nitrógeno en los procesos de cultivo. Las fuentes de nitrógeno preferidas son los aminoácidos y la urea, pero otros incluyen amoníaco gaseoso, sales inorgánicas de nitrato y amonio, vitaminas, purinas, pirimidinas, extracto de levadura, extracto de ternera, proteosa peptona, harina de soja, hidrolizado de caseína, solubles de destilados y similares. Entre los minerales inorgánicos
15 que pueden incorporarse en el medio nutriente están las sales comunes que son capaces de producir calcio, cinc, hierro, manganeso, magnesio, cobre, cobalto, potasio, sodio, molibdato, fosfato, sulfato, cloruro, borato y iones similares. Sin limitarse a este, se prefiere el uso de medio líquido de dextrosa y papa para los antagonistas fúngicos y premezcla de caldo R2A para cepas bacterianas.

20 A lo largo de esta descripción, se mencionan y se incorporan varias fuentes de información mediante esta referencia. Estas fuentes de información incluyen, por ejemplo, artículos de diarios científicos, documentos de patentes, libros de texto y direcciones de páginas web inactivas en el navegador. La referencia a dichas fuentes de información es
25 meramente a fines de proporcionar una indicación del estado general de la técnica al momento de realizar la presentación. Mientras que el contenido y lo descrito por cada fuente de información puede servir como apoyo y puede ser usado por un experto en la técnica para llevar a cabo las modalidades de la presente invención, cualquier discusión y comentario en una fuente de información específica no debe considerarse de ningún
30 modo como una admisión de que dicho comentario era ampliamente aceptado como una opinión general en ese ámbito.

La discusión de los métodos generales proporcionada en la presente se pretende que tenga únicamente fines ilustrativos. Otros métodos y modalidades alternativas serán
35 evidentes para los expertos en la técnica al examinar esta descripción, y deben incluirse

dentro del espíritu y el ámbito de esta solicitud.

Debe también entenderse que los siguientes ejemplos se ofrecen para ilustrar, pero no para limitar la invención.

5

EJEMPLOS

EJEMPLO 1: Descubrimiento de los microorganismos antagonistas capaces de suprimir el desarrollo de *Fusarium graminearum* y *Gibberella zeae*, agentes causantes de la fusariosis.

10

Este ejemplo describe un proceso de alto rendimiento para recoger y seleccionar microorganismos candidatos que ha sido desarrollado internamente en Synthetic Genomics, Inc., para aislar cepas de microorganismos que tengan actividad supresora contra agentes causantes de fusariosis, particularmente contra *Fusarium graminearum*.

15

Las cepas antagonistas microbianas se aislaron de muestras de tejido vegetal recogidas en varias ubicaciones a lo largo de los Estados Unidos. Las cepas bacterianas SGI-014-C06, SGI-014-G01, SGI-015-F03 y SGI-015-H06 se aislaron de tejidos de raíces de plantas recogidas en Eagle Peak Preserve, cerca de Julian, CA. La cepa fúngica SGI-010-H11 y la cepa bacteriana SGI-005-G08 se aislaron de tejidos del tallo de dos muestras diferentes de planta recogidas en San Elijo Lagoon, Encinitas, CA.

20

Se aislaron los microorganismos de la forma que se detalla a continuación. Para el aislamiento de cepas bacterianas, se sonicaron tejidos de la raíz de la planta y se sometieron a diluciones en serie de 2xYT (extracto de levadura y triptona) y placas de medio de agar libre de N. Luego se seleccionaron las colonias individuales basándose en características morfológicas, y se cultivaron individualmente en medio de caldo líquido. Para el aislamiento fúngico, primero se esterilizó la superficie del tejido vegetal mediante la sumersión en etanol al 70 % y pasándolo brevemente sobre una llama. El tejido se luego se diseccionó y se colocó en medio de agar de dextrosa y papa (PDA), seguido de incubación a temperatura ambiente. Cuando se observó crecimiento micelial, entonces se transfirió un segmento del crecimiento micelial a otra placa de PDA. Las cepas de microorganismos se aislaron, se purificaron y se preservaron a -80 °C en glicerol al 15 % para las cepas bacterias y en semillas de cebada secas para las cepas fúngicas.

25

30

35

Las cepas de microorganismos aislados como se describió anteriormente se analizaron

luego para verificar su capacidad de suprimir el crecimiento micelial de *F. graminearum* en una prueba de antagonismo *in vitro*, la cual se llevó a cabo en placas de agar que contenían medio de cultivo de agar de dextrosa y papa (PDA), de acuerdo con un placa de selección de alto rendimiento descrito en la solicitud de patente estadounidense n.º

5 US20120107915A1, que se incorpora a la presente en su totalidad mediante esta referencia, con modificaciones mínimas. A grandes rasgos, se cultivaron cepas aisladas de microorganismos en agar caldo de soja triptica (TSBA/5) durante 24 horas antes de su uso. El inóculo conidial de *F. graminearum* NRRL-5883 se produjo mediante la exposición

10 de la hifa a una colonia en crecimiento activo del hongo y transferir los hilos de hifa al medio de agar PDA. Después de incubar las placas durante 7 días a 25 °C usando un fotoperíodo de 12 h/día, se lavaron las placas de PDA de los conidios usando amortiguador fosfato débil (amortiguador fosfato al 0,004 %, pH 7,2, con MgCl₂ al 0,019 %). Luego se esparció una suspensión de conidios de *F. graminearum* en amortiguador

15 fosfato débil (1 x 10⁵ conidios/ml) sobre la superficie de agar, y se incubaron las placas a 25°C durante 48-72 horas. Para iniciar la prueba de antagonismo, células de cepas microbianas aisladas se inocularon puntualmente a distancias iguales dentro del perímetro de la placa. Luego de cinco días, las cepas se evaluaron como positivas a la antibiosis cuando existía un área clara visible que carecía de crecimiento micelial alrededor del

20 perímetro de las colonias microbianas.

Se aislaron y evaluaron más de 4.000 cepas microbianas mediante el procedimiento descrito anteriormente. De estas, se descubrió que seis cepas suprimían significativamente el crecimiento micelial de *F. graminearum* NRRL-5883 en medio PDA. Estos antagonistas microbianos nuevos se identifican como SGI-005-G08, SGI-010-H11,

25 SGI-014-C06, SGI-014-G01, SGI-015-F03 y SGI-015-H06.

También se llevó a cabo una prueba de antagonismo para los antagonistas microbianos nuevos, para verificar su capacidad de suprimir el crecimiento del patógeno fúngico *Gibberella zeae*, que es la especie teleomorfa de *Fusarium graminearum*. Todos los

30 procedimientos fueron idénticos a los descritos anteriormente, excepto que la cepa patogénica evaluada en este ensayo fue una cepa patogénica del hongo *Gibberella zeae*. De estos seis antagonistas microbianos, se descubrió que cuatro cepas, SGI-010-H11, SGI-014-C06, SGI-015-F03, y SGI-015-H06, suprimían significativamente el crecimiento micelial de *Gibberella zeae*.

35

EJEMPLO 2: Extracción de ADN. Secuenciación y taxonomía

Lisis celular fúngica y adquisición de la información de secuencia de ADNr de ITS-5.8S

- 5 La biomasa fúngica se transfirió a una microplaca de PCR de 96 pocillos que contenía 50 μ L de 2 x amortiguador de lisis (Tris HCl 100 mM, pH 8,0, EDTA 2 mM, pH 8,0, SDS 1 %, 400 μ g/ml de Proteinasa K). Las condiciones de lisis fueron las siguientes: 55 °C durante 60 minutos, 94 °C durante 4 minutos. Se utilizó una alícuota de producto de lisis como la fuente de la plantilla de ADN para la amplificación por PCR. La secuencia de ADNr de
10 ITS-5.8S se amplificó mediante PCR usando dos cebadores M13-ITS1 (SEQ ID NO: 15) y ITS4 M13 con cola (SEQ ID NO: 16).

- Para la amplificación de la región de ADNr de ITS-5.8S, cada mezcla de PCR se preparó en una reacción de volumen final de 20 μ L que contenía 4 μ L de la reacción de lisis
15 fúngica, 0,2 μ M de cada cebador (ITS1/ITS4), Tween-20 al 6 % y 10 μ L de 2x ImmoMix (Bioline USA Inc, Taunton, MA). Las condiciones de PCR fueron las siguientes: 94 °C durante 10 minutos; 94 °C durante 30 segundos, 52 °C durante 30 segundos, 72 °C durante 75 segundos, durante 30 ciclos; 72 °C durante 10 minutos. Una alícuota de 2 μ L del producto de PCR se agregó a gel agarosa al 1,0 % para confirmar una única banda
20 del tamaño esperado. Las bandas positivas se enviaron para realizarles el método de secuenciación de Sanger en sentido directo e inverso usando cebadores M13. La secuencia de la región intergénica de 5.8S (ITS) de la cepa fúngica SGI-010-H11 se proporciona en el listado de secuencias como SEQ ID NO: 11. La búsqueda de homología para la secuencia de nucleótidos determinada de la región intergénica 5.8S
25 (ITS) se llevó a cabo usando la base de datos DDBJ/GenBank/EMBL. Luego, la relación filogenética de la secuencia de nucleótidos de la región intergénica de 5.8S (ITS) se analizó entre el antagonista fúngico aislado SGI-010-H11 descrito en la presente, microorganismos del género y especie que muestran homologías de secuencia altas con respecto al antagonista fúngico aislado SGI-010-H11, y otra variedades amplias de
30 géneros y especies de microorganismos, usando el programa para crear árboles filogénicos ClustaW. La cepa fúngica SGI-010-H11 se considera que está relacionada con la familia de *Mycosphaerellaceae* basándose en el ~97 % de similitud de sus secuencias de ADNr ITS-5.8S con aquellas de *Mycosphaerellapunctiformis* (GenBank EU343182) y *Ramulariapratensis* (GenBank EU019284), cuyas secuencias de ITS 5.8S muestran un
35 relacionamiento claro con *Mycosphaerellaceae*.

Lisis celular bacteriana y adquisición de información de secuencia de ARNr de 16S

Se transfirió una alícuota de 20 μ L a una placa de PCR de 96 pocillos que contenía 20 μ L de 2 x amortiguador de lisis (Tris HCl 100 mM, pH 8,0, EDTA 2 mM, pH 8,0, SDS 1 %, 400 μ g/ml de Proteinasa K). Las condiciones de lisis fueron las siguientes: 55 °C durante 30 minutos, 94 °C durante 4 minutos. Se utilizó una alícuota de producto de lisis como la fuente de la plantilla de ADN para la amplificación por PCR. La secuencia de ARNr de 16S se amplificó mediante PCR usando M13-27F (SEQ ID NO: 17) y cebadores 1492R M13 con cola (SEQ ID NO: 18).

Para la amplificación de la región de ARNr de 16S, cada mezcla de PCR se preparó en una reacción de volumen final de 20- μ L que contenía 4 μ L de la reacción de lisis bacteriana, 2 μ M de cada cebador (27F/1492R), Tween-20 al 6 % y 10 μ L de 2x ImmoMix (Bioline USA Inc, Taunton, MA). Las condiciones de PCR fueron las siguientes: 94 °C durante 10 minutos; 94 °C durante 30 segundos, 52 °C durante 30 segundos, 72 °C durante 75 segundos; durante 30 ciclos; 72 °C durante 10 minutos. Una alícuota de 2- μ L del producto de PCR se agregó a gel agarosa al 1,0 % para confirmar una única banda del tamaño esperado. Las bandas positivas se enviaron para realizarles el método de secuenciación de Sanger en sentido directo e inverso usando cebadores M13. La secuencias de ARNr de 16S de las cepas bacterianas SGI-014-C06, SGI-005-G08, SGI-014-G01, SGI-015-F03 y SGI-015-H06 tienen una longitud de 1,4 Kb y se proporcionan en el listado de secuencias como las SEQ ID NO: 1, 10, 12, 13 y 14, respectivamente. La búsqueda de homología para la secuencia de nucleótidos determinada se llevó a cabo usando la base de datos DDBJ/GenBank/EMBL. Luego, la relación filogenética de la secuencia de nucleótidos de los 16 genes de ARNr se analizó entre el antagonista bacteriano aislado descrito en la presente, bacterias del género y especie que muestran homologías de secuencia altas con respecto al antagonista bacteriano aislado, y otra variedades amplias de géneros y especies de microorganismos, usando el programa para crear árboles filogenéticos ClustalW. La identidad y similitud de secuencia se determinó usando el software GenomeQuest™ (Gene-IT, Worcester Mass. EUA). El resultado del análisis de secuencia reveló que el aislado bacteriano SGI-014-G01 puede considerarse como relacionado con el género de *Variovorax* basándose en la similitud de ~99% de su secuencia de ARNr 16S con respecto a varias especies de *Variovorax*, incluyendo *Variovorax* sp. R-21938 (GenBank AJ786799) y *Variovorax paradoxus* (GenBank GU 186109), cuyas secuencias de ARNr de 16S muestran una relación clara con *Variovorax*

sp. Además, el resultado del análisis de secuencia también reveló que los dos aislados bacterianos SGI-015-F03 y SGI-015-H06 pueden considerarse como relacionados con la familia de *Bacillaceae*, basándose en la similitud de >99 % de sus secuencias de 16S respectivas con aquellas de varios *Bacillus* spp.

5

El resultado del análisis de secuencia reveló que los dos aislados bacterianos SGI-014-C06 y SGI-055-G08 pueden considerarse relacionados a la familia de *Microbacteriaceae* basándose en la similitud de >99 % de sus secuencias de 16S respectivas con aquellas de varias *Microbacterium* spp. Cabe destacar que la secuencia de 1430-nt del gen de ARNr de 16S de SGI-014-C06 (SEQ ID NO: 1) es idéntica a la del gen de ARNr de 16S de una cepa de *Microbacterium oxydans* DSM 20578 y de varias otras cepas de *Microbacterium* sp. (por ejemplo, las secuencias GenBank Y17227.1, FJ200406, EU086800 y EU714335) a través de toda la longitud de 1430-nt.

10

En particular, entre las miles de cepas microbianas que fueron aisladas y evaluadas para verificar su capacidad de suprimir el desarrollo de *Fusarium* en ensayos de antagonismo descritos en el Ejemplo 1, un total de ochenta y ocho cepas fueron identificadas subsiguientemente como de la especie *Microbacterium*, basándose en la similitud de secuencia de sus secuencias 16S con aquellas de *Microbacterium* spp. conocidas. Sin embargo, los solicitantes han descubierto que SGI-014-C06 y SGI-055-G08 fueron las únicas dos cepas de *Microbacterium* que poseían actividad supresora contra *Fusarium graminearum*. A la fecha, como se discutió anteriormente, se ha informado que varios microbios de origen natural presentan actividad antagonista contra la fusariosis. Sin embargo, no figuran registros anteriores a la presente invención que describan un microorganismo del género *Mycobacterium* con dicha actividad antagonista. Adicionalmente, previo a la presente invención, los presentes inventores no eran conscientes de la existencia de un método o proceso que utilizara una cepa bacteriana del género *Mycobacterium* como agente de biocontrol en la prevención, la inhibición o el tratamiento del desarrollo de un patógeno causante de la fusariosis.

20

25

30

EJEMPLO 3: Análisis de secuencia de genes constitutivos de SGI-014-C06 aislado

Ha sido informado recientemente acerca de un estudio filogénico de varios genes constitutivos de 27 especies de género *Microbacterium*, por Richert *et ál.* (*Syst. Appl. Microbiol.* 30:102-108, 2007). El estudio concluyó que aunque los méritos del análisis de

35

secuencia de ARNr de 16S para la taxonomía sistemática son insuperables, el mero énfasis en un único parámetro taxonómico no debería guiar conclusiones taxonómicas. Como se describió anteriormente, la secuencia de nucleótidos del gen de ARNr de 16S de SGI-014-C06 (SEQ ID NO: 1) es idéntica a la del gen ARNr de 16S de varias cepas de *Microbacterium* sp., incluyendo la secuencia de nucleótidos de un gen de ARNr de 16S de una cepa de *Microbacterium oxydans* DSM 20578 que fue incluida en un estudio de Richert *et ál.* (2007) (GenBank registro Y17227.1). Los solicitantes proceden a llevar a cabo un análisis filogénico de cuatro genes constitutivos de SGI-014-C06 aislado, que son la subunidad B de ADN girasa (*gyrB*), subunidad B de ARN polimerasa (*rpoB*), recombinasa A (*recA*) y cinasa polifosfato (*ppk*). Para este propósito, se secuenció con el método de escopeta el SGI-014-C06 aislado, ensamblado y anotado mediante el uso de los procedimientos descritos en la solicitud de patente PCT n.º W02010115156A2. El ADN genómico se preparó a partir de un cultivo nuevo de SGI-014-C06. El sedimento celular se usó para la extracción de ADN de alto peso molecular usando el kit UltraClean® Mega Soil DNA Isolation (n.º de catálogo 12900-10) de MO BIO Laboratories, Inc., usando el protocolo recomendado por el fabricante. El ADN genómico de SGI-014-C06 luego se preparó para pirosecuenciación 454 por el método de escopeta. Se usó ADN genómico (7,5 µg) para la construcción de bibliotecas de acuerdo con el protocolo recomendado (454 Life Sciences) para lecturas largas simples. Las secuencias se generaron mediante dos corridas de secuenciación en serie de GS FLX Titanium.

Las secuencias de cuatro genes constitutivos *gyrB*, *rpoB*, *recA*, y *ppk* of del SGI-014-C06 aislado se proporcionan en el listado de secuencias. La búsqueda de homología para la secuencia de nucleótidos determinada se llevó a cabo usando la base de datos DDBJ/GenBank/EMBL. La identidad y similitud de secuencia se determinó usando el software GenomeQuest™ (Gene-IT, Worcester Mass. EUA). Como se discute en detalle más adelante, el resultado del análisis de secuencia de los genes constitutivos reveló que el SGI-014-C06 aislado descrito en la presente divulgación es una cepa bacteriana novedosa y puede considerarse relacionada con la familia de *Microbacteriaceae*.

La secuencia de polinucleótidos del gen *gyrB* de SGI-014-C06 tiene la mayor identidad de secuencia con un gen *gyrB* de *Microbacterium testaceum* con el número de registro GenBank AP012052 (82,69 % en una alineación de 936/2172 nucleótidos). Cuando se compara con el gen *gyrB* de la cepa de *Microbacterium oxydans* DSM 20578 (GenBank AM181493; Richert *et ál.*, 2007), las homologías de secuencia entre los dos genes fue

~62 % idéntica a nivel de nucleótidos y ~37 % idéntica a nivel de aminoácidos.

La secuencia de polinucleótidos del gen *rpoB* de SGI-014-C06 tiene la mayor identidad de secuencia con un gen *rpoB* de *Microbacterium maritropicum* con el número de registro
 5 GeneBank AM181582 (96,98 % en una alineación de 1093/3504 nucleótidos). Cuando se compara con el gen *rpoB* de la cepa de *Microbacterium oxydans* DSM 20578 (GenBank AM181583; Richert *et ál.*, 2007), las homologías de secuencia entre los dos genes fue ~96 % idéntica a nivel de nucleótidos y 99 % idéntica a nivel de aminoácidos.

10 La secuencia de polinucleótidos del gen *recA* de SGI-014-C06 tiene la mayor identidad de secuencia con un gen *recA* de *Microbacterium testaceum* con el número de registro GeneBank AP012052 (85,45 % en una alineación de 962/1188 nucleótidos). Cuando se
 15 compara con el gen *recA* de la cepa de *Microbacterium oxydans* DSM 20578 (GenBank AM181527; Richert *et ál.*, 2007), las homologías de secuencia entre los dos genes fue ~92 % idéntica a nivel de nucleótidos y 100 % idéntica a nivel de aminoácidos.

La secuencia de polinucleótidos del gen *ppk* de SGI-014-C06 tiene la mayor identidad de secuencia con un gen *ppk* de *Microbacterium luteolum* con el número de registro GenBank AM181554 (91,38 % en una alineación de 1380/2175 nucleótidos). Cuando se
 20 compara con el gen *ppk* de la cepa de *Microbacterium oxydans* DSM 20578 (GenBank AM181556; Richert *et ál.*, 2007), las homologías de secuencia entre los dos genes fue ~91 % idéntica a nivel de nucleótidos y ~98 % idéntica a nivel de aminoácidos.

EJEMPLO 4: Protección de trigo contra la infección de *Fusarium graminearum* usando los
 25 antagonistas microbianos *Microbacterium* sp. (NRRL B-50470) *Mycophaeerella* sp. (NRRL 50471) y *Variovorax* sp. (NRRL B-50469)

Las cepas microbianas que se descubrió que eran positivas para la antibiosis en el análisis de antagonismo descrito en el Ejemplo 1 se evaluaron adicionalmente a través de
 30 un bioensayo vegetal donde las células de las cepas microbianas se aplicaron directamente a las semillas de una variedad cultivada de cereales susceptible, seguido de la inoculación con esporas del conidio de *F. graminearum*. Las cepas microbianas se cultivaron hasta una turbidez suficiente y se diluyeron en agua. Dos gramos de semillas de trigo de una variedad cultivada de trigo susceptible (Hank; WestBred LLC, Bozeman,
 35 MT) se sembraron en recipientes de un litro que contenían medio de tierra pasteurizada.

Luego de la siembra, se transfirieron 20 mL de la dilución de cultivo microbiano sobre las semillas sembradas. Las semillas de trigo se dejaron germinar en condiciones de invernadero en luz fluorescente con un fotoperíodo de 14 horas. Al inicio de la floración del trigo, las espigas de trigo se expusieron mediante la aspersión con esporas del conidio de *F. graminearum* NRRL 5883. Las esporas del conidio se cosecharon a partir de placas de FDA de cinco días vertiendo agua con 0,01 % Tween20 sobre las placas y rociando esporas en la suspensión. Luego de rociar esporas, las plantas de trigo se transfirieron a una cámara de rocío con 100 % de humedad durante tres días para permitir la infección. Los tratamientos fueron:

10

1. No tratado: sin tratamiento fúngico microbiano o químico + exposición a *Fusarium*.
2. No infectado: sin tratamiento fúngico microbiano o químico, sin exposición a *Fusarium*.
3. SGI-010-H11: tratamiento fúngico + exposición a *Fusarium*.
- 15 4. SGI-014-G01: tratamiento bacteriano + exposición a *Fusarium*.
5. SGI-014-C06: tratamiento bacteriano + exposición a *Fusarium*.

Veinte días luego de la infección, se detuvo el riego y se permitió que las plantas de trigo se secaran durante tres semanas antes de la cosecha. Se cosecharon y recogieron espigas de trigo individuales. Se determinó la gravedad de la enfermedad para cada espiga que muestra síntomas de fusariosis. La gravedad de la enfermedad se calculó como la cantidad de espiguillas afectadas dividida por la cantidad total de espiguillas por espiga. Los resultados (TABLA 2) revelaron que las plantas de trigo tratadas con cada uno de los tres antagonistas microbianos analizados, SGI-014-C06 (NRRL B-50470), SGI-010-H11 (NRRL 50471) y SGI-014-G01 (NRRL B-50469), tenían una gravedad considerablemente más baja e incidencia de infección de *Fusarium graminearum* cuando se comparan con el control "no tratado" que crece en las mismas condiciones ($P < 0,05$).

Las semillas de cada espiga se cosecharon manualmente y se pesó la masa de semillas. Se calculó el promedio del peso de semillas por recipiente en cada uno de los tratamientos. Como se registra en la TABLA 3, se demostró que cada uno de los antagonistas microbianos redujo considerablemente la pérdida de rendimiento causada por la infección de fusariosis.

TABLA 2. Eficacia de los antagonistas microbianos en la reducción de la incidencia de fusariosis en el trigo.

Tratamiento	Porcentaje de gravedad (%)	STDEV	valor P
No infectado	1,30	0,0025	<,0001
No tratado	15,46	0,0364	no indicado
SGI-010-H11	7,42	0,0219	0,0005
SGI-014-G01	6,59	0,0315	0,0001
SGI-014-C06	7,21	0,0225	0,0004

TABLA 3. Eficacia de los antagonistas microbianos para conservar el rendimiento de la semilla en plantas de trigo con fusariosis.

Tratamiento	Masa de semillas (g)	valor P
No infectado	0,8438 ±0,1633	0,0191
No tratado	0,4669 ±0,1209	no indicado
SGI-010-H11	0,6200 ±0,1844	0,7025
SGI-014-G01	0,7963 ± 0,2032	0,5277
SGI-014-C06	0,6744 ± 0,0948	0,0551

EJEMPLO 5: Inhibición del crecimiento de *Fusarium graminearum* mediante antagonistas microbianos en plántulas de trigo

Las cepas microbianas que se descubrió que poseían actividad supresora contra *F. graminearum* en ensayo de placa del antagonismo se analizaron adicionalmente para determinar su capacidad para reducir la incidencia de fusariosis en el trigo. Las semillas de una variedad cultivada de trigo susceptible (Hank; WestBred LLC, Bozeman, MT) se sembraron en recipientes de 1 litro, cada uno de los cuales contenía un medio de tierra pasteurizada en recipientes de plástico de 20 cm de diámetro. Las suspensiones de células microbianas se prepararon de la siguiente manera. El 2YT, o un medio de cultivo similar, los cultivos de caldo se inocularon a partir de soluciones madre de glicerol aisladas o placas estriadas. En general, los cultivos se iniciaron 48 - 72 horas antes del uso en la cámara de crecimiento, invernadero o campo permitiendo que el cultivo alcance la fase exponencial tardía. Los aislados que presentan mayores tiempos de duplicación se iniciaron de forma anticipada. Los cultivos se incubaron a 30 °C en un agitador giratorio a

- 200 rpm. Luego del crecimiento, las células se sedimentaron a $10.000 \times g$ durante 15 min a 4°C y se volvieron a suspender en 10 mM de amortiguador de MgSO_4 (pH 7,0). Las densidades celulares se normalizaron para cada aislado en CFU/mL (unidades de formación de células por mililitro). En general, se prepararon suspensiones de $\sim 10^9$ CFU/mL para cada aislado y se transportaron al sitio de inoculación sobre hielo. Las inoculaciones se realizaron diluyendo estas suspensiones celulares 1/20 en agua de riego hasta una densidad final de 5×10^7 CFU/mL. Para ensayos en recipientes de 1 litro, 20 mL de esta suspensión celular diluida se distribuyó uniformemente sobre la superficie de cada recipiente por duplicado. Para ensayos en microensayos, las suspensiones celulares no se diluyeron y se aplicó 1 mL de cada suspensión de 10^9 CFU/mL mediante pipeta directamente sobre la superficie de cada recipiente por duplicado empapando la tierra sobre las semillas sumergidas. Las semillas y las plantas se mantuvieron en un invernadero a temperatura ambiente con un fotoperíodo de luz de 14 horas.
- El micelio de la cepa *Fusarium graminearum* NRRL-5883 se cultivó en placas de PDA durante 5 días a luz constante. Se cosecharon hifas y conidios vertiendo unos pocos mL de agua estéril (0,01 % Tween 20) sobre las placas y raspando la superficie de agar con una espátula estéril. La concentración de esporas en el inóculo era de aproximadamente 2×10^5 esporas/mL, pero no se determinó la concentración de fragmento de hifa.
- La inoculación con *F. graminearum* comenzó luego de que emergieron brotes de las semillas y continuó noche por medio durante 10 días. El inóculo de *F. graminearum* se aplicó con un rociador a alrededor de 30 mL por recipiente. Inmediatamente después de cada inoculación, las plantas se nebulizaron con nebulizador superior. Cuando se usó el fungicida químico, el fungicida (Banner Maxx, Syngenta) se preparó diluyendo 2 mL de solución madre de fungicida en 1 L de agua destilada, y se aplicó con un rociador a alrededor de 30 mL por recipiente.
- Se evaluó la fusariosis según la gravedad de infección de *Fusarium*, como se determinó por la cantidad de unidades formadoras de colonias por gramo (CFU/g) de *Fusarium* de tejidos vegetales. Se realizaron todos los tratamientos en cuatro bloques con cuatro recipientes replicados. Los tratamientos fueron:
1. No tratado: sin tratamiento con fungicida microbiano o químico + exposición a *Fusarium*.

- 2. No infectado: sin tratamiento con fungicida microbiano o químico, sin exposición a *Fusarium*.
- 3. Fungicida: tratamiento con fungicidas químico + exposición a *Fusarium*.
- 4. SGI-010-H11: tratamiento fúngico + exposición a *Fusarium*.
- 5. SGI-014-G01: tratamiento bacteriano + exposición a *Fusarium*.
- 6. SGI-014-C06: tratamiento bacteriano + exposición a *Fusarium*.

Los resultados, según se registran en la TABLA 4, revelaron que los tres tratamientos microbianos proporcionaron una disminución considerable en la gravedad de FHB, en comparación con el control infectado. En particular, dos antagonistas microbianos, SGI-014-C06 y SGI-010-H11, redujeron considerablemente la infección de plantas de trigo mediante *Fusarium graminearum* en comparación con el control no tratado cultivado en las mismas condiciones. La protección de plantas de trigo de infección de *Fusarium* proporcionada por cada uno de los dos microorganismos SGI-014-C06 y SGI-010-H11 fue comparable en términos estadísticos con la protección proporcionada por el fungicida químico comercial. Cuando se aplicó el microorganismo SGI-014-G01, la protección observada de las plantas de trigo de infección de *Fusarium* fue mucho menos notoria y su eficacia varió mucho entre los recipientes replicados.

TABLA 4: Efecto de antagonistas microbianos sobre infección de *Fusarium*.

Tratamiento	CFU/g	valor P
No tratado	1487 ± 600	no indicado
No infectado	0±0	<,0001
Fungicida químico	290 ±146	<,0001
SGI-010-H11	671± 450	0,0077
SGI-014-G01	1246 ± 465	0,8387
SGI-014-C06	367 ± 234	0,0001

EJEMPLO 6: Crecimiento y almacenamiento de los antagonistas microbianos

Mycosphaerella sp.: Se usaron varios métodos para almacenar los hongos aislados como cultivo puro, uno de los cuales fue la técnica de papel de filtro. También se dejó que el hongo creciera en PDA, y luego se cortó en cuadrados pequeños que se colocaron en recipientes que contenían 15 % de glicerol y se almacenaron a -70 °C. El hongo también se almacenó a 4 °C mediante un método similar, usando agua destilada en lugar de

glicerol. Sin embargo, uno de los métodos preferidos de almacenamiento fue en semillas de cebada estériles infectadas a -80 °C.

Bacillus sp., *Microbacterium* sp. y *Variovorax* sp.: Las bacterias aisladas se almacenaron como un cultivo puro. Se transfirió una colonia bacteriana a un recipiente que contenía medio líquido de caldo R2A (Tecknova) y se dejó cultivar a 30 °C con agitación a 250 rpm durante dos días. Luego, el cultivo se transfirió a recipientes que contenían 15 % de glicerol y se almacenaron a -80 °C.

10 EJEMPLO 7: Producción de esporas y tratamientos de recubrimiento de semillas

Producción de esporas: En un típico procedimiento de producción de esporas, se inoculó un litro de medio de cultivo 2x YT (16 g/L de triptona, 10 g/L de extracto de levadura, 5 g/L de NaCl) con 5 mL de cultivo de inicio o raspado de placa de petri y se incubó durante la noche a 30 °C en un agitador giratorio que se configuró a 225 rpm. Las células bacterianas se sedimentaron mediante centrifugación, y se lavaron 1x con amortiguador de PBS (8 g/L de NaCl; 0,2 g/L de KCl; 1,44 g/L de Na₂HPO₄; 0,24g de KH₂PO₄; pH 7,4). Las células se volvieron a suspender en medio de CDSM (Hageman *et ál.*, *J. Bacteriol.*, 438-441,1984), y se cultivaron durante cuatro noches adicionales a 30 °C en el agitador giratorio. La esporulación en el cultivo bacteriano se controló a diario usando microscopio de contraste de fase hasta que todo el cultivo estuvo prácticamente compuesto de esporas que flotan libremente. En general, el tiempo de incubación llevó menos de cuatro días o más de seis días dependiendo de la especie. En el microscopio de contraste de fase, se detectaron endoesporas dentro de las células como esferoides oblatos blancos brillantes. Las esporas bacterianas se sedimentaron mediante centrifugación a 10.000 X g durante 15 minutos, se lavaron dos veces con dH₂O estéril y, si fuera necesario, se concentraron hasta 50 mL y se podrían usar inmediatamente o se podrían refrigerar para uso posterior. La concentración de esporas se midió a OD₆₀₀. En general, este procedimiento produjo al menos 2000 OD de esporas de bacterias.

En particular, varias cepas bacterianas de la presente invención, por ejemplo, *Bacillus* sp. SGI-015-F03, podrían producir convenientemente grandes cantidades de esporas luego de 4 días de incubación con una inoculación simple de un gran cultivo inicial durante la noche (~15 mL) en 1 litro de medio de cultivo 2x SG, seguido de incubación durante 4 días a la temperatura apropiada en un agitador giratorio configurado a 225 rpm. La receta

del medio de cultivo 2x SG fue la siguiente: 16 g/L de caldo nutritivo; 0,25 g/L de MgSO_4 ; 2,0 g/L de KCl; 0,15 g/L de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,025 g/L de $\text{MnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,28 mg/L de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1,0 g/L de Dextrosa.

- 5 Tratamiento de recubrimiento de semillas de trigo y maíz: Los experimentos de tratamiento de semillas a pequeña escala se realizaron de acuerdo con un procedimiento descrito en Sudisha *et al.*, 2009 con pequeñas modificaciones. En general, se elaboró una solución madre de biopolímero agregando 6 gramos de polvo de goma arábica (MP Biomedical) a 36 mL de agua en un tubo Falcon de 50 mL, que se mezcló posteriormente
- 10 hasta que se volvió homogénea usando un mezclador de rueda. Se usó una placa de agitación para mezclar cuando se requirieron mayores cantidades de semillas recubiertas.

- Cuando se usaron células vegetativas, se lavaron cultivos turbios de células microbianas que crecen activamente con PBS y se ajustaron hasta un OD_{600} de ~5,0. De manera
- 15 alternativa, las suspensiones de esporas microbianas se prepararon como se describe anteriormente. Las esporas bacterianas y/o células vegetativas se volvieron a suspender por completo en una solución madre de biopolímero de goma arábica de ~32 mL preparada como se describe anteriormente, y la suspensión resultante se mezcló por completo en una botella de 1 L. Se agregaron aproximadamente 400 g de semillas (trigo o
- 20 maíz) a la botella y se agitaron vigorosamente o sometieron a vórtice para garantizar una distribución uniforme de la suspensión de goma/célula. Luego, las semillas recubiertas se diseminaron en recipientes para pesaje de plástico estéril para secarlas en una campana de flujo laminar hasta que dejan de ser pegajosas, generalmente 3-6 horas con mezcla periódica. En algunos casos, las semillas recubiertas con esporas podrían secarse
- 25 durante la noche. Sin embargo, en general, las semillas recubiertas con cultivos vegetativos se almacenan antes de disecarse por completo. La prueba de viabilidad realizada periódicamente en los microbios usados en la formulación de recubrimiento de semillas mostró que los microbios seguían siendo viables durante al menos tres meses. Se determinó que el índice de germinación de las semillas recubiertas fue básicamente
- 30 idéntico al de las semillas no recubiertas de control.

EJEMPLO 8: Efecto de tratamientos de semillas microbianas en el desarrollo de fusariosis de Fusarium.

Las semillas de una variedad cultivada de trigo susceptible a FHB (RB07) se recubrieron con cada uno de los microorganismos SGI-014-C06; SGI-015-F03 y SGI-015-H06, de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 8. Las semillas recubiertas se sembraron posteriormente en recipientes de un litro que contenían medio de tierra
 5 pasteurizada [(Metromix-Mix 200; Scotts-Sierra Horticultural Products, Marysville, OH; y 3 gramos de fertilizante 14-14-14 (N-P-K)]. Los recipientes se sembraron a 7-8 plantas por recipiente y se redujeron a 5 plantas por recipiente en la etapa de 3 hojas. Los recipientes se dispusieron en bloques aleatorios con 5 recipientes por tratamiento. Luego, las semillas recubiertas se dejaron germinar en condiciones de invernadero en luz fluorescente con un
 10 período de luz de 16 horas. Al inicio de la floración del trigo (antes de la antesis), las espigas de trigo se expusieron mediante la aspersión con esporas del macroconidio de *F. graminearum* NRRL 5883 a una concentración de 100.000 esporas/mL. Luego de rociar esporas, las plantas de trigo se transfirieron a una cámara de rocío con 100 % de humedad durante tres días para permitir la infección. Los tratamientos fueron:

15

1. No tratado: sin tratamiento con fungicida microbiano o químico + exposición a *Fusarium*.
2. SGI-014-C06: tratamiento con semillas bacterianas + exposición a *Fusarium*.
3. SGI-015-F03: tratamiento con semillas bacterianas + exposición a *Fusarium*.
- 20 4. SGI-015-H06: tratamiento con semillas bacterianas + exposición a *Fusarium*.

La gravedad de la fusariosis se evaluó visualmente a los diez días y veintiún días luego de la infección. Se determinó la gravedad de la enfermedad para cada espiga que muestra síntomas de fusariosis, y se calculó como el porcentaje de espiguillas sintomáticas, es
 25 decir, la cantidad de espiguillas que muestran síntomas de FHB dividida por la cantidad total de espiguillas. Los resultados (TABLA 5) revelaron que las semillas de trigo recubiertas con cada uno de los tres antagonistas microbianos analizados, SGI-014-C06; SGI-015-F03 y SGI-015-H06, tenían una gravedad considerablemente más baja de infección de *Fusarium graminearum* cuando se comparan con el control "no tratado" que
 30 crece en las mismas condiciones ($P < 0,05$).

Tabla 5: Desarrollo de síntomas de fusariosis en trigo luego de los tratamientos con semillas con microorganismos antagonistas

Tratamiento	Gravedad de la infección (%)	
	10 días luego de la infección	21 días luego de la infección
Control no tratado	49,31	66,10
SGI-014-C06	2,08	7,74
SGI-015-F03	23,12	31,53
SGI-015-H06	9,42	19,81

EJEMPLO 9: Biocontrol de la fusariosis del trigo en ensayos en invernaderos

Cada uno de los microorganismos SGI-014-C06; SGI-015-F03 y SGI-015-H06 se analizaron adicionalmente en ensayos en invernadero a mayor escala. Los ensayos se realizaron en una "sala de contención de crecimiento vegetal" (PGCR) ubicado en Synthetic Genomics, Inc., e incluía los siguientes tratamientos de control: control infectado, control no infectado, así como cuatro referencias de fungicidas comerciales. Los fungicidas químicos de referencia fueron Banner MAXX® (Syngenta) a una concentración de 2 ml/L y Prosaro® (Bayer CropScience) a una concentración de 3 ml/L, cada uno se aplica como rocío foliar, según la recomendación del fabricante. Los fungicidas biológicos de referencia fueron Actinovate® (Natural Industries) y RhizoVital® (ABiTEP GmbH), cada uno se aplica empapando la tierra según los manuales de instrucción recomendados por los fabricantes.

Los tratamientos microbianos se prepararon y aplicaron empapando la tierra o recubriendo semillas. Cuando se aplicaron tratamientos microbianos empapando la tierra, las suspensiones celulares de cada uno de los microorganismos se aplicaron individualmente a las semillas antes de cubrir las semillas con más medio de cultivo. Con este propósito, los cultivos preparados recientemente se sedimentaron para retirar el medio de cultivo y se volvieron a suspender en 10 mM de amortiguador de sulfato de magnesio (MgSO₄). Luego, las suspensiones celulares se agregaron aplicando mediante pipeta y distribuyendo 20 mililitros uniformemente en las semillas en una cantidad total de células de ~10⁹ células por recipiente. Cuando los tratamientos microbianos se aplicaron como recubrimiento de semillas, las células/espores de microorganismos se prepararon básicamente como se describe anteriormente en el Ejemplo 8. Las semillas recubiertas se produjeron mediante la incorporación de suspensiones celulares con una solución de

goma arábica para formar una mezcla de recubrimiento pegajosa que se aplicó posteriormente a las semillas. Luego, el recubrimiento de semillas microbianas se dejó secar para formar un biopolímero duro pero soluble en agua que atrapa las células/esporas de microorganismos. El objetivo fue alcanzar una titulación de células en el intervalo de al menos 10^6 - 10^7 células/semillas viables. En este experimento de ensayo en invernadero, los recubrimientos de semillas se prepararon el día antes de la siembra de las semillas.

Cada tratamiento presentó cuatro reiteraciones que se ubicaron en un diseño de bloque completo aleatorio (RCBD) en tres soportes nivelados dispuestos en dos filas a lo largo de los lados de una sala de crecimiento. Los soportes se equiparon con luces fluorescentes (Agrosun, 5850K) que generaron, en promedio, 800 μmol de intensidad de luz, según las mediciones en la superficie del recipiente. Cada reiteración consistía en cuatro recipientes de 1 litro contenidos en medio plano. Los recipientes se llenaron con un medio de cultivo sintético que consistía en una relación 3:1 (v/v) de medio de cultivo Arabidopsis AIS (semillas de Lehle) a arena (lavado grueso). En cada recipiente, se dispersaron dos gramos de semillas de trigo (Hank, WestBred) sobre la superficie del medio de cultivo. Los recipientes se regaron en la parte inferior dejando ~2 cm de agua en su base y se observaron durante la germinación y el crecimiento.

En la etapa de floración (Feekes 10.5.1), las espigas de trigo se infectaron rociándolas con una suspensión de esporas del conidio de *Fusarium graminearum*. Para este experimento de ensayo en invernadero, se prepararon las esporas fúngicas colocando en placas los micelios homogeneizados de la cepa *F. graminearum* NRRL 5883 sobre grandes placas de PDA, seguido de incubación durante cinco días en luz constante a temperatura ambiente. Luego, las esporas fúngicas se cosecharon mediante inundación de las placas con amortiguador de sulfato de magnesio (10 mM de MgSO_4 ; 0,01 % Tween 20) y raspando levemente la superficie de agar con una espátula estéril. La concentración de esporas se ajustó y aproximadamente 50.000 esporas del conidio se aplicaron por espiga con un rociador manual presurizado. Aumentó la humedad relativa de la sala de cultivo un 90 % durante tres días, permitiendo la infección antes de normalizarse otra vez. Luego del asentamiento de las semillas de trigo, se detuvo el riego y se dejaron secar las espigas de trigo por completo. Se cosecharon y recogieron espigas de trigo individuales. Se determinó la gravedad de la enfermedad para cada espiga que presenta síntomas de fusariosis. La gravedad de la enfermedad se calculó como la cantidad de espiguillas

afectadas dividida por la cantidad total de espiguillas por espiga. Los resultados (TABLA 6) revelaron que el trigo tratado con cada uno de los tres antagonistas microbianos analizados, SGI-014-C06; SGI-015-F03 y SGI-015-H06, tenían una gravedad e incidencia de infección de *Fusarium graminearum* considerablemente más baja cuando se comparan con el control "no tratado" que crece en las mismas condiciones ($P<0,05$).

TABLA 6. Eficacia de los antagonistas microbianos en la reducción de la incidencia de fusariosis en el trigo.

10	Tratamiento	Gravedad de la enfermedad (%)	% protección de la infección
	No infectado	2,1 ± 2,9	no indicado
	Infectado	37,2 ± 9,8	0,00
	Prosario®	4,6 ± 2,8	93,00
	Banner-MAXX®	12,5 ± 5,8	70,00
15	Actinovate®	38,9 ± 12,1	-5,00
	RhizoVital®	28,0 ± 5,4	26,00
	SGI-014-C06	18,4 ± 9,1	30,00
	SGI-015-F03	25,4 ± 6,9	54,00
	SGI-015-H06	26,6 ± 7,4	34,00

20 Para determinar el rendimiento de la semilla, las espigas de trigo se desgranaron manualmente de forma individual, las semillas se recogieron y se retiraron las cáscaras y otros detritos, se contaron y pesaron. Se determinó el rendimiento total de las semillas como la masa de semillas total producida por 16 recipientes de cada uno de los tratamientos.

25 Como se registra en la TABLA 7, se demostró que cada uno de los tres antagonistas microbianos protegieron considerablemente el rendimiento de la semilla, es decir, se redujo considerablemente la pérdida de rendimiento causada por la infección de fusariosis.

30

TABLA 7. Eficacia de los antagonistas microbianos para conservar el rendimiento de la semilla en plantas de trigo con fusariosis.

	Tratamiento	Rendimiento total de la semilla (g)	Protección del rendimiento (%)
5	No infectado	14,36	no indicado
	No tratado	11,05	0,00
	Prosario®	13,44	72,00
	Banner-MAXX®	14,41	102,00
	Actinovate®	11,99	28,00
	RhizoVital®	12,65	48,00
10	SGI-014-C06	14,70	110,00
	SGI-015-F03	15,03	120,00
	SGI-015-H06	14,14	93,00

Por lo tanto, los tratamientos de plantas de trigo con cada uno de los microorganismos analizados conservaron considerablemente las plantas de trigo contra la pérdida de rendimiento causada por la infección de *Fusarium*. En particular, las plantas de trigo tratadas con SGI-014-C06 o SGI-015-F03 mostraron una mejora considerable en el rendimiento total de las semillas, es decir, 110 % y 120 % respectivamente, cuando se comparan con el control no infectado. Por el contrario, los fungicidas de referencia Actinovate®, RhizoVital® y Prosario® no parecieron proteger considerablemente las plantas de trigo tratadas de la pérdida de rendimiento causada por la infección de fusariosis por *Fusarium*.

EJEMPLO 10: Biocontrol de fusariosis de trigo en condiciones de campo.

Antagonistas del microorganismo que se descubrió que tenía actividad supresora contra el patógeno *F. graminearum* y la fusariosis en ensayos de antagonismo *in vitro* y estudios en invernaderos, como se describe en los Ejemplos 4-9, se evalúan adicionalmente en una serie de experimentos de campo en distintas ubicaciones geográficas en los Estados Unidos. Algunos experimentos se llevan a cabo en áreas agrícolas que se utilizan para el control microbiológico de la fusariosis de trigo, donde ocurre la infección de la enfermedad natural. La variedad de trigo utilizada en el análisis es una variedad susceptible de *F. graminearum*. En general, las plantas de trigo con cada tratamiento se sembraron en parcelas de 12 filas, de alrededor de 3 metros de longitud. El espacio entre las filas es de alrededor de 20 cm. Las parcelas tratadas en cada experimento se disponen en un diseño de bloque aleatorio. También se evalúan la eficacia de varias composiciones en polvo

humedecible que contienen los antagonistas microbianos de la presente invención para reducir la gravedad de la fusariosis y la incidencia. En estos experimentos, los antagonistas microbianos se evalúan de forma individual o combinada.

- 5 En estos análisis, se evalúan los antagonistas de microorganismos en varios tratamientos de recubrimiento de semillas y/o análisis de campo donde las suspensiones microbianas se aplican directamente sobre las espigas de trigo florecientes. En cada uno de los experimentos, los microorganismos son evaluados en parceladas replicadas. En estos experimentos se pueden usar los métodos de producción de plantas, patógenos y
10 antagonistas que se describen en los Ejemplos 4 - 9.

- Tratamiento de recubrimiento de semillas - Además del método de recubrimiento de semillas descrito en el Ejemplo 7 anteriormente, se pueden utilizar varias técnicas y formulaciones de recubrimiento de semillas conocidas en la técnica para el tratamiento de
15 las semillas de trigo con antagonistas microbianos, como las descritas anteriormente por Fernando *et ál.*, 2002; Bello *et ál.*, 2002; y Kim *et ál.*, 1997. En general, las semillas de trigo se pre-humedecen y almacenan a temperatura ambiente para promover la germinación. Luego, las semillas germinadas se pueden sumergir en las suspensiones microbianas antes de la siembra. Las esporas de patógeno se pueden inocular antes o
20 después de la inoculación bacteriana. Para estos tratamientos de semillas se pueden usar los métodos de producción de plantas, patógenos y antagonistas que se describen en los Ejemplos 4 y 5.

- Gravedad de la enfermedad y evaluación del rendimiento - Los antagonistas se someten a
25 evaluación adicional en invernadero y a evaluación de campo para determinar su actividad supresora contra la fusariosis en trigo y cebada en las etapas de floración, utilizando una variedad de métodos y procedimientos, generalmente los que se describen, por ejemplo, en Schisler, *Plant Disease*, tomo 86(12), 1350-1356, 2002; Schisler *et ál.* *Biological Control*, 39:497-506, 2006; y Khan y Doohan, *Biological Control*, 48:42-47, 2009. En uno de
30 dichos experimentos, los inóculos de *G. zeae* se preparan en maíz dentado amarillo estéril, como lo describe Khan *et ál.* (*Biological Control*, 29:245-255, 2004). Los cultivos de lípidos completamente colonizados (cultivo de 48 horas) de las cepas microbianas se diluyen hasta un cuarto de la potencia con amortiguador de fosfato. Los conteos de CFU por mL finales para los tratamientos con antagonistas son de entre 1×10^9 CFU/mL y $6 \times$
35 10^9 CFU/mL. Luego, las suspensiones de tratamiento se aplican a las espigas de trigo

- florecientes utilizando un rociador tipo mochila de CO₂. En general, los tratamientos se aplican luego del atardecer para minimizar la degradación de UV potencial de las células de antagonistas. Hay 5 replicados por tratamiento que se disponen en un diseño de bloque aleatorio. El tratamiento de control primario consiste en plantas tratadas con una solución amortiguadora. Un segundo control consiste en plantas no tratadas. Las evaluaciones de campo de la fusariosis y la incidencia se realizan evaluando 60 espigas por replicado (es decir, 300 espigas/tratamiento) cuando el desarrollo de las plantas alcanza un desarrollo entre etapa lechosa media y etapa pastosa. Las espigas de trigo se cosechan manualmente y se desgranar usando un desgranador de espiga y planta única de Almaco (Almaco, IA) cuando los granos alcanzan el desarrollo total. Las muestras de granos obtenidas de cada fila de replicado se evalúan para determinar el peso de 100 granos. Se analizan los datos de gravedad de la enfermedad, incidencia y peso de 100 granos usando un análisis de varianza de una vía (ANOVA).
- 15 Se descubrió que las composiciones que contienen los antagonistas microbianos de la invención, individualmente o de forma combinada disminuyen considerablemente la incidencia de la enfermedad. Estos resultados muestran que las medidas de control biológico usando estos agentes microbianos activos pueden cumplir una función importante en el manejo de la fusariosis en las plantas gramíneas, tales como plantas de trigo.

EJEMPLO 11: Desarrollo de variedades cultivadas de origen no natural y programa de cultivo

- 25 Los microorganismos endofíticos de la presente invención se introducen en plantas de cultivo, incluyendo cereales, de diversos genotipos y origen geográfico, que carecen de dichos microorganismos endofíticos, para crear combinaciones de plantas y endófitos con mejores características agronómicas, utilizando los procedimientos análogos a los conocidos en la técnica, incluyendo los descritos en la solicitud de patente estadounidense N° 20030195117A1; solicitud de patente estadounidense N° 20010032343A1; y patente estadounidense N° 7,084,331, entre otras. Por lo tanto, se pueden crear combinaciones sintéticas de plantas y endófitos determinadas y se pueden seleccionar en un programa de desarrollo de cultivo/variedad cultivada en función de su capacidad para formar y mantener una combinación mutualista que da como resultado un beneficio agronómico. La clasificación de las características agronómicas de la

combinación también se puede utilizar en dicho programa de cultivo. Estas características pueden incluir, de modo no taxativo, tolerancia a la sequía, acumulación a la biomasa, resistencia a la infección de los insectos, palatabilidad para el ganado (por ejemplo, herbívoros), facilidad de reproducción y rendimiento de las semillas, entre otros. Dichas combinaciones pueden diferir en los niveles de acumulación de los metabolitos microbianos que son tóxicos para las plagas y malezas, incluyendo niveles de alcaloide del ergot, niveles de lolina, niveles de peramina o niveles de lolitrem, a la vez que presentan características agronómicas deseadas de las plantas de cultivo, incluyendo la resistencia a la alimentación o infección con insectos, resistencia al estrés abiótico, palatabilidad del ganado, acumulación de biomasa, facilidad de reproducción y rendimiento de las semillas, entre otras características.

Se han descrito varias modalidades de la invención. Sin embargo, se comprenderá que los elementos de las modalidades descritas en la presente se pueden combinar para realizar modalidades adicionales y que se pueden realizar varias modificaciones sin apartarse del espíritu y alcance de la invención. Por consiguiente, otras modalidades, alternativas y equivalentes se encuentran dentro del alcance de la invención, tal como se describe y reivindica en la presente.

Los títulos dentro de la solicitud solamente se presentan a efectos de la comodidad del lector y no limitan de modo alguno el alcance de la invención o sus modalidades.

Todas las publicaciones y solicitudes de patente mencionadas en la presente memoria descriptiva se incorporan a la presente mediante esta referencia en la misma medida en que si cada publicación o solicitud de patente individual se indicara como específica e individualmente incorporada mediante esta referencia.

REIVINDICACIONES SOLICITUD DIVISIONAL DE LA SOLICITUD NO. 14 036105
PRESENTADO COMO COMPLEMENTO A LA RESPUESTA DEL OFICIO 10857 DEL 2
DE SEPTIEMBRE DE 2014

- 5 1. Una cepa aislada que se selecciona del grupo que consiste en una cepa *Microbacterium* sp., una cepa *Bacillus* sp., una cepa *Mycosphaerella* sp. y una cepa *Variovorax* sp., donde dicha cepa microbiana tiene actividad supresora contra la fusariosis.
- 10 2. Una cepa microbiana aislada de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicha cepa microbiana se selecciona del grupo que consiste en la cepa *Mycosphaerella* sp. SGI-010-H11 (depositada como NRRL 50471), la cepa *Microbacterium* sp. SGI-014-C06 (depositada como NRRL B-50470), la cepa *Variovorax* sp. SGI-014-G01 (depositada como NRRL B-50469), la cepa *Bacillus* sp. SGI-015-F03 (depositada como NRRL B-50760), la cepa *Bacillus* sp. SGI-015-H06 (depositada como NRRL B-50761), y variantes activas como pesticidas de cualquiera de estas.
- 15 3. Una cepa microbiana aislada de acuerdo con la reivindicación 2, donde dicha cepa microbiana comprende una secuencia de ADN que exhibe el menos 85 % de identidad de secuencia a cualquiera de las secuencias de nucleótidos en el Listado de secuencias.
- 20 4. Un cultivo biológicamente puro de una cepa microbiana de acuerdo con la reivindicación 1.
- 25 5. Un cultivo enriquecido de una cepa microbiana de acuerdo con la reivindicación 1.
6. Una composición que comprende una cepa microbiana o cultivo de esta de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, y un portador.
- 30 7. Una composición de acuerdo con la reivindicación 6, donde dicho portador es una semilla de planta.
8. Una semilla que tiene un recubrimiento que comprende una composición de acuerdo con la reivindicación 6.

9. Un método para evitar, inhibir o tratar el desarrollo de la fusariosis de una planta, donde dicho método comprende aplicarle a la planta, o a los alrededores de la planta, una cantidad eficaz de una cepa microbiana o cultivo de esta de cualquiera de las reivindicaciones 1-5.

5

10. Un método de acuerdo con la reivindicación 9, donde dicha cepa microbiana o cultivo de esta se aplica al suelo, una semilla, una raíz, una flor, una hoja, una parte de la planta o a toda la planta.

10

11. Un método de acuerdo con la reivindicación 9, donde dicha planta es una planta de trigo, una planta de maíz, una planta de cebada o una planta de avena.

12. Una planta de origen no natural que es una planta infectada artificialmente con una cepa microbiana o cultivo de esta de cualquiera de las reivindicaciones 1-5.

15

13. Semilla, tejido reproductor, tejido vegetativo, partes de la planta o progenie de una planta de origen no natural de la reivindicación 12.

RESUMEN

En la presente se proporcionan composiciones que comprenden cepas y cultivos microbiológicos y métodos de uso de estas. Determinadas cepas, cultivos y composiciones de estos son útiles para el control de fusariosis, por ejemplo, de varias plantas de cultivo. También se proporcionan composiciones de control biológico, y métodos de uso de estas para prevenir, inhibir o tratar el desarrollo de enfermedad o patógenos vegetales y para conservar el rendimiento de la planta.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> SYNTHETIC GENOMICS, INC.
 GRANDLIC, CHRISTOPHER J.
 GREEN, WAYNE A.
 KEROVUO, JANNE S.
 MCCANN, RYAN T.

<120> COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA CONTROLAR LA FUSARIOSIS

<130> SGI1520-1WO

<150> US 61/511,467

<151> 2011-07-25

<160> 18

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 1430

<212> ADN

<213> Microbacterium sp.

<220>

<221> misc_feature

<223> Aislado bacteriano SGI SGI-014-C06

<220>

<221> misc_feature

<223> codifica un ARN ribosómico de 16S

<400> 1

acgctggcgg cgtgcttaac acatgcaagt cgaacggtga acacggagct tgctctgtgg
 60

gatcagtggc gaacgggtga gtaacacgtg agcaacctgc ccctgactct gggataagcg
 120

ctggaaacgg cgtctaatac tggatatgtg acgtgaccgc atggtctgcg tctggaaaga
 180

atttcggttg gggatgggct cgcggcctat cagcttggtg gtgaggtaat ggctcaccaa
 240

ggcgtcgacg ggtagccggc ctgagagggt gaccggccac actgggactg agacacggcc
 300

cagactccta cgggaggcag cagtggggaa tattgcacaa tgggcgcaag cctgatgcag
 360

caacgccgcg tgaggggacga cggccttcgg gttgtaaacc tcttttagca gggagaagc
 420

gaaagtgcg gtacctgcag aaaaagcgcc ggctaactac gtgccagcag ccgcggtaat
480

acgtagggcg caagcggtat ccggaattat tgggcgtaaa gagctcgtag gcggtttgtc
540

gcgtctgctg tgaaatccgg aggcctcaacc tccggcctgc agtgggtacg ggcagactag
600

agtgcggtag gggagattgg aattcctggt gtagcggtag aatgcgcaga tatcaggagg
660

aacaccgatg gcgaaggcag atctctgggc cgtaactgac gctgaggagc gaaagggtag
720

ggagcaaaca ggcttagata ccttggtagt ccaccccgta aacgttgga actagtgtg
780

gggtccattc cacggattcc gtgacgcagc taacgcatta agtccccgc ctggggagta
840

cggccgcaag gctaaaactc aaaggaattg acggggaccc gcacaagcgg cggagcatgc
900

ggattaattc gatgcaacgc gaagaacctt accaaggctt gacatatagc agaacgggcc
960

agaaatggtc aactctttgg aactcgtaa acaggtggtg catggttgct gtcagctcgt
1020

gtcgtgagat gttgggttaa gtcccgcaac gagcgcaacc ctggttctat gttgccagca
1080

cgtaatggtg ggaactcatg ggatactgcc ggggtcaact cggaggaagg tggggatgac
1140

gtcaaatcat catgcccctt atgtcttggg cttcacgcat gctacaatgg ccggtacaaa
1200

gggctgcaat accgcgaggt ggagcgaatc caaaaagcc ggtcccagtt cggattgagg
1260

tctgcaactc gacctcatga agtcggagtc gctagtaatc gcagatcagc aacgctgcgg
1320

tgaatacggt cccgggtctt gtacacaccg cccgtcaagt catgaaagtc ggtaacacct
1380

gaagccggtg gcctaaccct tgtggaggga gccgtcgaag gtgggatcgg
1430

<210> 2

<211> 2172

<212> ADN
 <213> Microbacterium sp.

 <220>
 <221> misc_feature
 <223> Aislado bacteriano SGI SGI-014-C06

 <220>
 <221> misc_feature
 <223> Identificador génico SGI SG1MICG850682

 <220>
 <221> misc_feature
 <223> codifica la secuencia de péptidos en la SEQ ID NO 3

 <400> 2
 gtgtctgcgg ccggagagcg gctgtcgaga atagactcgg agattgtgaa tgccgagtat
 60

 tccgcccata atctccaggt gcttgagggg ctccaagctg tccgcaagcg cccgggcatg
 120

 tacatcggtt cgaacggctc gccgggcctc atgcactgcc tttgggagat catcgacaac
 180

 tctgtcgacg aggcgggtggc aggcaacggc acgaagatcg acatcatcct gcaactccgac
 240

 ggcagcgtcg aggtgcacga ccgcggtcgc ggcattcctg tcgacgtcga gccgcgcacc
 300

 ggtctcaccg gtgtcgaggt cgtctacacc aagctgcacg ccggaggaaa gttcggcggc
 360

 ggctcgtacg cggcatccgg tggactgcac ggtgtcggcg cctccgtcgt gaacgcgtc
 420

 tccgagcgcc tcgacgtcga ggtcgaccgc gggggcaaga cctacgcgat gtcgttccat
 480

 cgcggtgagc ccggcatctt cacggactcc ggcgagaagc ggccggacgc cccgttcacg
 540

 ccgttcgagg agaacagcga gctgcgcgtc atcggcaagg cgcgcgtgg cgtgaccggc
 600

 acccggtgac gctactgggc cgaccggcag atcttcacca aggatgcggc gttccagctc
 660

 tcggagctcg agaccgcgc acgcagacg gcgttcctcg ttcccgtct cgagatcgtc
 720

 gtcaaggacg cacgggcggc cggtcaggtc atccccgtcc cggactccga cggcgagacg
 780

accgtcgtcg ggaccgatga gacctcgta cttctacgagg gcggcatctc cgagttcgtc
840

gagtacctcg ccatcgaccc tcccgtgacc gacacctggc gtatccaggg cgagggcatg
900

ttcaaggaga ccgtgcccgt cctgcaggca gacggccaca tggtcgccac cgaggtggag
960

cgtgtgtgcg ccgtcgacat cgcgctgcg tgggggaccg gctacgacac ccgtgtgcg
1020

tccttcgtga acatcatcgc gacgccaag ggcggaaccc accagcaggg cttcgagcag
1080

gagtcctga aggtgctgcg ctcccaggtc gagcagaacg cccgccgtct gaaggtcggc
1140

aacgacaagc tggagaagga cgacgtctc gccggcctca ccgccgtgct cacggtcaac
1200

gtgccggagc cgcagttcga gggccagacc aaggaagtgc tcggcacccc cgcggtgcg
1260

cagatcgtgg cgcaggtgat ccgtaaggat ctggcgcagc gcttcagctc gaccaagcgc
1320

gacgacaaga accaggccac acagctgctc gacaagatcg tctccgagat gaaggcccgt
1380

gtctcggcgc gcgcccacaa ggagacgcag cgcgcgaaga acgcgctgga gtcgtcgacg
1440

ctgccgacca agctcgtcga ctgccgcagc aacgaggtcg agcgcagcga gctcttcac
1500

gtggagggcg actcggctct cggcaccgcc aagaacgcgc gcaacagcga gttccaggcg
1560

ctgctcccga tccgagggaa gatcctcaac gtgcagaagg cctctgtcgg cgacatgctg
1620

tcgaacaccg agtgcgcgtc gatcatccag gtgatcggcg ccgcatccgg acgcaccttc
1680

gacatcgatg cggcgcgcta cggcaaggat atcctgatga gcgacgccga tgtcgacggc
1740

gcgcacatcc gtaccctgct gctcacgctg ttcttcgct acatgcgacc gctgatcgag
1800

cacgggctg tggtcgccgc ggtgccgccg ttgcaccggg tgatcgtgat gaaccgggg
1860

tccaagccga acgagacgat ctacacctac agcgagcagg agatgcacgc gctgctggcg
1920

aagctccgca aggccggcaa gcgctggcac gagccgatcc agcgctacaa gggctcgggt
1980

gagatggacg cggaacagct cgcgaacacc accatggacc gctccggccg tctgctgcgc
2040

cgtgtgcgca tggaagacgc cgaggccgcc ggtcgcgtgt tcgagctgct gatgggcaac
2100

gaggtcgcgc cgcgcgcgca gttcatcacc gactcctccg accggttgtc gcgcgagtc
2160

atcgacgcct ga
2172

<210> 3
<211> 723
<212> PRT
<213> Microbacterium sp.

<220>
<221> misc_feature
<223> Aislado bacteriano SGI SGI-014-C06

<220>
<221> misc_feature
<223> Identificador peptídico SGI SG1MICT850682

<220>
<221> misc_feature
<223> subunidad B de girasa

<400> 3

Met Ser Ala Ala Gly Glu Arg Leu Ser Arg Ile Asp Ser Glu Ile Val
1 5 10 15

Asn Ala Glu Tyr Ser Ala His His Leu Gln Val Leu Glu Gly Leu Glu
20 25 30

Ala Val Arg Lys Arg Pro Gly Met Tyr Ile Gly Ser Asn Gly Ser Pro
35 40 45

Gly Leu Met His Cys Leu Trp Glu Ile Ile Asp Asn Ser Val Asp Glu
50 55 60

Ala Val Ala Gly Asn Gly Thr Lys Ile Asp Ile Ile Leu His Ser Asp
65 70 75 80

Gly Ser Val Glu Val His Asp Arg Gly Arg Gly Ile Pro Val Asp Val
85 90 95

Glu Pro Arg Thr Gly Leu Thr Gly Val Glu Val Val Tyr Thr Lys Leu
100 105 110

His Ala Gly Gly Lys Phe Gly Gly Gly Ser Tyr Ala Ala Ser Gly Gly
115 120 125

Leu His Gly Val Gly Ala Ser Val Val Asn Ala Leu Ser Glu Arg Leu
130 135 140

Asp Val Glu Val Asp Arg Gly Gly Lys Thr Tyr Ala Met Ser Phe His
145 150 155 160

Arg Gly Glu Pro Gly Ile Phe Thr Asp Ser Gly Glu Lys Arg Pro Asp
165 170 175

Ala Pro Phe Thr Pro Phe Glu Glu Asn Ser Glu Leu Arg Val Ile Gly
180 185 190

Lys Ala Pro Arg Gly Val Thr Gly Thr Arg Val Arg Tyr Trp Ala Asp
195 200 205

Arg Gln Ile Phe Thr Lys Asp Ala Ala Phe Gln Leu Ser Glu Leu Glu
210 215 220

Thr Arg Ala Arg Gln Thr Ala Phe Leu Val Pro Gly Leu Glu Ile Val
225 230 235 240

Val Lys Asp Ala Arg Ala Ala Gly Gln Val Ile Pro Val Pro Asp Ser
245 250 255

Asp Gly Glu Thr Thr Val Val Gly Thr Asp Glu Thr Ser Tyr Leu Tyr
260 265 270

Glu Gly Gly Ile Ser Glu Phe Val Glu Tyr Leu Ala Ile Asp Pro Pro
275 280 285

Val Thr Asp Thr Trp Arg Ile Gln Gly Glu Gly Met Phe Lys Glu Thr
290 295 300

Val Pro Val Leu Gln Ala Asp Gly His Met Val Ala Thr Glu Val Glu
305 310 315 320

Arg Val Cys Ala Val Asp Ile Ala Leu Arg Trp Gly Thr Gly Tyr Asp
325 330 335

Thr Arg Val Arg Ser Phe Val Asn Ile Ile Ala Thr Pro Lys Gly Gly
340 345 350

Thr His Gln Gln Gly Phe Glu Gln Glu Leu Leu Lys Val Leu Arg Ser
355 360 365

Gln Val Glu Gln Asn Ala Arg Arg Leu Lys Val Gly Asn Asp Lys Leu
370 375 380

Glu Lys Asp Asp Val Leu Ala Gly Leu Thr Ala Val Leu Thr Val Asn
385 390 395 400

Val Pro Glu Pro Gln Phe Glu Gly Gln Thr Lys Glu Val Leu Gly Thr
405 410 415

Pro Ala Val Arg Gln Ile Val Ala Gln Val Ile Arg Lys Asp Leu Ala
420 425 430

Gln Arg Phe Ser Ser Thr Lys Arg Asp Asp Lys Asn Gln Ala Thr Gln
435 440 445

Leu Leu Asp Lys Ile Val Ser Glu Met Lys Ala Arg Val Ser Ala Arg
450 455 460

Ala His Lys Glu Thr Gln Arg Arg Lys Asn Ala Leu Glu Ser Ser Thr
465 470 475 480

Leu Pro Thr Lys Leu Val Asp Cys Arg Thr Asn Glu Val Glu Arg Ser

485

490

495

Glu Leu Phe Ile Val Glu Gly Asp Ser Ala Leu Gly Thr Ala Lys Asn
500 505 510

Ala Arg Asn Ser Glu Phe Gln Ala Leu Leu Pro Ile Arg Gly Lys Ile
515 520 525

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

Cys Ala Ser Ile Ile Gln Val Ile Gly Ala Gly Ser Gly Arg Thr Phe
545 550 555 560

Asp Ile Asp Ala Ala Arg Tyr Gly Lys Val Ile Leu Met Ser Asp Ala
565 570 575

Asp Val Asp Gly Ala His Ile Arg Thr Leu Leu Leu Thr Leu Phe Phe
580 585 590

Arg Tyr Met Arg Pro Leu Ile Glu His Gly Arg Val Phe Ala Ala Val
595 600 605

Pro Pro Leu His Arg Val Ile Val Met Asn Pro Gly Ser Lys Pro Asn
610 615 620

Glu Thr Ile Tyr Thr Tyr Ser Glu Gln Glu Met His Ala Leu Leu Ala
625 630 635 640

Lys Leu Arg Lys Ala Gly Lys Arg Trp His Glu Pro Ile Gln Arg Tyr
645 650 655

Lys Gly Leu Gly Glu Met Asp Ala Glu Gln Leu Ala Asn Thr Thr Met
660 665 670

Asp Arg Ser Gly Arg Leu Leu Arg Arg Val Arg Met Glu Asp Ala Glu
675 680 685

Ala Ala Gly Arg Val Phe Glu Leu Leu Met Gly Asn Glu Val Ala Pro

690

695

700

Arg Arg Glu Phe Ile Ile Asp Ser Ser Asp Arg Leu Ser Arg Glu Ser
705 710 715 720

Ile Asp Ala

<210> 4

<211> 3504

<212> ADN

<213> Microbacterium sp.

<220>

<221> misc_feature

<223> Aislado bacteriano SGI SGI-014-C06

<220>

<221> misc_feature

<223> Identificador génico SGI SG1MICG850290

<220>

<221> misc_feature

<223> codifica la secuencia de péptidos en la SEQ ID NO 5

<400> 4

ttggctgctg ctgcaacgc atccacatcc accaccacca agaacggacg cggagcttcc
60

cgtctttcgt tcgccaagat ctccgacacg ctgacgggtcc ctgaccttct cgccctgcag
120

accgaatcct tcggttggct ggtcggcaac gacgcctgga aggcgcgcgt ggccgaggcc
180

aagaagcagg ggcgaccga cgtcaacgag aacagcggtc tgggcgagat cttcgaggag
240

atctctccga tcgaggacct cggcgagacg atgcagctgt cgttcacgaa cccctacctc
300

gagccggaga agtactccat cgaggagtgc aaggagcgtg gcaagacctc cgccgctccg
360

ctgtacgtcg aggccgagtt catgaaccac ctacgggtg agatcaagac ccagacggtc
420

ttcatgggcg acttcccgt gcagaccgac aagggaacgt tcatcatcaa cggctccgag
480

cgcgctcgctg tctcgagct ggtgcgttcg cccggtgtct acttcgacaa gacccccgac
540

aagacgtccg acaaggacat cgtctcggca cgcgtcatcc cgagccgtgg tgcctggctc
600

gagttcgaga tcgacaagcg cgaccaggtc ggcgtgcgcg tcgaccgcaa gcgcaagcag
660

tcggtcacgg tcttcctcaa ggcgtgggc atgaccagcg aggagatcct cgccgagttc
720

gccggctaca cctcgatcga ggagacgctc gcgaaggaca cgatcgtcac gaaggaagat
780

gcgctccgcg acatctaccg caagctccgt ccgggcgagc aggtcgccgc cgaggccgcc
840

cgcgcgtcc tggacaactt ctacttcaac ccgaagcgt acgacctggc caaggtcggg
900

cgctacaaga tcaaccacaa gctgggcctg gaccagccgc tgaactcgtc ggtcctgacc
960

gtcgaagaca tcgtggccac gatcaagtac ctggtgcgtc tgcacgccg caccgaggag
1020

accttcacgg gcatccgcg tggtagaag gccgagatcc gtctcgcgac cgacgacatc
1080

gacaacttcg gcaaccgtcg catccgcgcg gtcggcgagc tgatccagaa ccaggtccgc
1140

accggtctct cccgcatgga gcgcgtcgtc cgcgagcgca tgaccacgca ggacatcgag
1200

gcgatcacgc cgcagaccct gatcaacgtg cgcgccgtcg tcgccgcgat caaggagttc
1260

ttcggaacgt cgcagctgtc gcagttcatg gaccagaaca acccgctcgc ggggtctgacg
1320

aacaagcgtc gtctgtctgc gctcggcccc ggtggtctct cgcgagaccg cgccggcgtc
1380

gaggtcgtg acgtccaccc ctgcactac ggccgcatgt gcccgatcga gactccggaa
1440

ggcccgaaca tcggtctgat cgggtgtctc gcgaccttcg cgcgcatcaa ctcgttcgga
1500

ttcatcgaga ccccgtaaccg caaggtcgtc gacggtgtcg tgaccgacca gatcgactac
1560

ctgacggctt ccgaagaggt cgacttcaac atcgcgcagg ccaacgcccc gtcgatgcc
1620

aagggtcgct tccgcgagag ccacgtcctg gcccgcccca aggggtggcag cggcgaggtc
1680

gacctgttcg tccccgagga gatcggctac atcgacgtct ccccgcgcca gatgggtgtcg
1740

gtcgcgacct cgctcgtgcc ctctctcgag cacgacgacg cacagcgcgc cctcatgggt
1800

gccaacatgc agcgtcaggc tgtgccgctg ctgcgcagcg actcgccgct cgtcggaaacc
1860

ggtatggagg gctacacggc catcgacgcc ggtgacgtgc tcaccgccga gaaggccggt
1920

gtcgtctccg aggtctccgc agaccgcgtc gtcgtcatgc tcgacgaggc cggaacgcag
1980

gagtaccacc tgcgcaagtt cgaccgctcc aaccaggga cgtcgtacaa ccagaaggtc
2040

gtcgtcaccg ccggtgagcg cgtcgaggtc ggagaggta tcgccgatgg ccccgccacc
2100

gagaacggcg agctggccct cggaaagaac ctctcgtcg cgttcatgac gtgggagggc
2160

tacaacttcg aggacgcgat catcctgagc caggacctgg tgaaggacga caccctctcc
2220

tcgatccaca tcgaggagta cgaggtcgat gtcgcgcaca ccaagctcgg caaggaggag
2280

atcacgcgtg acctcccaa cgtcagcccc gagctgctga aggacctga cgagcgcggc
2340

atcatccgca tcggtgccga ggtccgccct ggcgacatcc tcgtcggcaa ggtcacgccg
2400

aagggtgaga ccgagctgtc ggccgaggag cgcctgctcc gcgcgatctt caacgagaag
2460

agccgcgaag tccgtgacac ctcgctgaag gtgccccacg gtgagcaggg cacgatcatc
2520

gccgtcaagg agttcaacgc tgaggacggc gacgacgagc tcggctccgg cgtcaaccgc
2580

cgcgctgtgg tctacatcgc ccagaagcgc aagatcaccg agggtgacaa gtcgcccggc
2640

cgtcacggca acaaggggtgt catcgcggaag atcctcccga tcgaggacat gccgttcctt
2700

tcggacggta ccccggtcga catcgtgctg aaccgctcg gtatccccg tcgaatgaac
2760

ttcggtcagg tcctggagac ccacctcggg tggatcgga agcagggctg gaaggtcgag
2820

ggcaaccgg agtgggctgt gaagctccc aaggacgcat tcgaggccg ccccggcacg
2880

aaggtcgcca ccccggtgtt cgacggtgag agcaggagg agatcgttg tctcctcgac
2940

gagaccacc cgacctgga cggcgtccg ctgatcgact cgagcggcaa gacgcagctg
3000

ttcgacggtc gttcgggtga gccgttccc gcgccgatct ccgtgggcta catgtacatc
3060

ctgaagctgc accacctggt cgacgacaag atccacgac gttccacggg tccgtactcg
3120

atgatcacc agcagccgct cggtggtgaa gcgcagttcg gtggacagcg cttcgggtgag
3180

atggaggtgt gggccctcga ggcctacgg gccgcatacg cgctccagga gctcctcag
3240

atcaagtccg acgacatcct cggccgcgtc aaggtgtacg aggcgatcgt caagggcgag
3300

aacatccagg agcccggcat ccccgagtcg ttcaaggtgc tcatgaagga gatgcagtcg
3360

ctctgcctga acgtcgaggt cctctcgcc gacggcacgc tggtaacct ccgcgacacc
3420

gacgacgagg cgttcgcgc cgcggaagag ctcggtatca acatctccag ccgcttcgag
3480

gccgcctcga tcgacgagat ctaa
3504

<210> 5
<211> 1167
<212> PRT
<213> Microbacterium sp.

<220>
<221> misc_feature

<223> Aislado bacteriano SGI SGI-014-C06

<220>

<221> misc_feature

<223> Identificador peptídico SGI SG1MICT850290

<220>

<221> misc_feature

<223> subunidad B de ARN polimerasa

<400> 5

Met Ala Ala Ala Arg Asn Ala Ser Thr Ser Thr Thr Thr Lys Asn Gly
1 5 10 15

Arg Gly Ala Ser Arg Leu Ser Phe Ala Lys Ile Ser Asp Thr Leu Thr
20 25 30

Val Pro Asp Leu Leu Ala Leu Gln Thr Glu Ser Phe Gly Trp Leu Val
35 40 45

Gly Asn Asp Ala Trp Lys Ala Arg Val Ala Glu Ala Lys Lys Gln Gly
50 55 60

Arg Thr Asp Val Asn Glu Asn Ser Gly Leu Gly Glu Ile Phe Glu Glu
65 70 75 80

Ile Ser Pro Ile Glu Asp Leu Gly Glu Thr Met Gln Leu Ser Phe Thr
85 90 95

Asn Pro Tyr Leu Glu Pro Glu Lys Tyr Ser Ile Glu Glu Cys Lys Glu
100 105 110

Arg Gly Lys Thr Tyr Ala Ala Pro Leu Tyr Val Glu Ala Glu Phe Met
115 120 125

Asn His Leu Thr Gly Glu Ile Lys Thr Gln Thr Val Phe Met Gly Asp
130 135 140

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

Arg Val Val Val Ser Gln Leu Val Arg Ser Pro Gly Val Tyr Phe Asp
165 170 175

Lys Thr Pro Asp Lys Thr Ser Asp Lys Asp Ile Val Ser Ala Arg Val
180 185 190

Ile Pro Ser Arg Gly Ala Trp Leu Glu Phe Glu Ile Asp Lys Arg Asp
195 200 205

Gln Val Gly Val Arg Val Asp Arg Lys Arg Lys Gln Ser Val Thr Val
210 215 220

Phe Leu Lys Ala Leu Gly Met Thr Ser Glu Glu Ile Leu Ala Glu Phe
225 230 235 240

Ala Gly Tyr Thr Ser Ile Glu Glu Thr Leu Ala Lys Asp Thr Ile Val
245 250 255

Thr Lys Glu Asp Ala Leu Arg Asp Ile Tyr Arg Lys Leu Arg Pro Gly
260 265 270

Glu Gln Val Ala Ala Glu Ala Ala Arg Ala Leu Leu Asp Asn Phe Tyr
275 280 285

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

Asn His Lys Leu Gly Leu Asp Gln Pro Leu Asn Ser Ser Val Leu Thr
305 310 315 320

Val Glu Asp Ile Val Ala Thr Ile Lys Tyr Leu Val Arg Leu His Ala
325 330 335

Gly Thr Glu Glu Thr Phe Thr Gly Ile Arg Gly Gly Lys Lys Ala Glu
340 345 350

Ile Arg Leu Ala Thr Asp Asp Ile Asp Asn Phe Gly Asn Arg Arg Ile
355 360 365

Arg Ala Val Gly Glu Leu Ile Gln Asn Gln Val Arg Thr Gly Leu Ser
370 375 380

Arg Met Glu Arg Val Val Arg Glu Arg Met Thr Thr Gln Asp Ile Glu
385 390 395 400

Ala Ile Thr Pro Gln Thr Leu Ile Asn Val Arg Pro Val Val Ala Ala
405 410 415

Ile Lys Glu Phe Phe Gly Thr Ser Gln Leu Ser Gln Phe Met Asp Gln
420 425 430

Asn Asn Pro Leu Ala Gly Leu Thr Asn Lys Arg Arg Leu Ser Ala Leu
435 440 445

Gly Pro Gly Gly Leu Ser Arg Asp Arg Ala Gly Val Glu Val Arg Asp
450 455 460

Val His Pro Ser His Tyr Gly Arg Met Cys Pro Ile Glu Thr Pro Glu
465 470 475 480

Gly Pro Asn Ile Gly Leu Ile Gly Ala Leu Ala Thr Phe Ala Arg Ile
485 490 495

Asn Ser Phe Gly Phe Ile Glu Thr Pro Tyr Arg Lys Val Val Asp Gly
500 505 510

Val Val Thr Asp Gln Ile Asp Tyr Leu Thr Ala Ser Glu Glu Val Asp
515 520 525

Phe Asn Ile Ala Gln Ala Asn Ala Pro Leu Asp Ala Lys Gly Arg Phe
530 535 540

Arg Glu Ser His Val Leu Ala Arg Pro Lys Gly Gly Ser Gly Glu Val
545 550 555 560

Asp Leu Phe Val Pro Glu Glu Ile Gly Tyr Ile Asp Val Ser Pro Arg
565 570 575

Gln Met Val Ser Val Ala Thr Ser Leu Val Pro Phe Leu Glu His Asp
580 585 590

Asp Ala Gln Arg Ala Leu Met Gly Ala Asn Met Gln Arg Gln Ala Val
595 600 605

Pro Leu Leu Arg Ser Asp Ser Pro Leu Val Gly Thr Gly Met Glu Gly
610 615 620

Tyr Thr Ala Ile Asp Ala Gly Asp Val Leu Thr Ala Glu Lys Ala Gly
625 630 635 640

Val Val Ser Glu Val Ser Ala Asp Arg Val Val Val Met Leu Asp Glu
645 650 655

Gly Gly Thr Gln Glu Tyr His Leu Arg Lys Phe Asp Arg Ser Asn Gln
660 665 670

Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Val Val Val Thr Ala Gly Glu Arg Val
675 680 685

Glu Val Gly Glu Val Ile Ala Asp Gly Pro Ala Thr Glu Asn Gly Glu
690 695 700

Leu Ala Leu Gly Lys Asn Leu Leu Val Ala Phe Met Thr Trp Glu Gly
705 710 715 720

Tyr Asn Phe Glu Asp Ala Ile Ile Leu Ser Gln Asp Leu Val Lys Asp
725 730 735

Asp Thr Leu Ser Ser Ile His Ile Glu Glu Tyr Glu Val Asp Ala Arg
740 745 750

Asp Thr Lys Leu Gly Lys Glu Glu Ile Thr Arg Asp Leu Pro Asn Val
755 760 765

Ser Pro Glu Leu Leu Lys Asp Leu Asp Glu Arg Gly Ile Ile Arg Ile
770 775 780

Gly Ala Glu Val Arg Pro Gly Asp Ile Leu Val Gly Lys Val Thr Pro
785 790 795 800

Lys Gly Glu Thr Glu Leu Ser Ala Glu Glu Arg Leu Leu Arg Ala Ile
805 810 815

Phe Asn Glu Lys Ser Arg Glu Val Arg Asp Thr Ser Leu Lys Val Pro
820 825 830

His Gly Glu Gln Gly Thr Ile Ile Ala Val Lys Glu Phe Asn Ala Glu
835 840 845

Asp Gly Asp Asp Glu Leu Gly Ser Gly Val Asn Arg Arg Val Val Val
850 855 860

Tyr Ile Ala Gln Lys Arg Lys Ile Thr Glu Gly Asp Lys Leu Ala Gly
865 870 875 880

Arg His Gly Asn Lys Gly Val Ile Ala Lys Ile Leu Pro Ile Glu Asp
885 890 895

Met Pro Phe Leu Ser Asp Gly Thr Pro Val Asp Ile Val Leu Asn Pro
900 905 910

Leu Gly Ile Pro Gly Arg Met Asn Phe Gly Gln Val Leu Glu Thr His
915 920 925

Leu Gly Trp Ile Ala Lys Gln Gly Trp Lys Val Glu Gly Asn Pro Glu
930 935 940

Trp Ala Val Lys Leu Pro Lys Asp Ala Phe Glu Ala Ala Pro Gly Thr
945 950 955 960

Lys Val Ala Thr Pro Val Phe Asp Gly Ala Ser Glu Glu Glu Ile Ala
965 970 975

Gly Leu Leu Asp Ala Thr Thr Pro Thr Arg Asp Gly Val Arg Leu Ile
980 985 990

Asp Ser Ser Gly Lys Thr Gln Leu Phe Asp Gly Arg Ser Gly Glu Pro
995 1000 1005

Phe Pro Ala Pro Ile Ser Val Gly Tyr Met Tyr Ile Leu Lys Leu
1010 1015 1020

His His Leu Val Asp Asp Lys Ile His Ala Arg Ser Thr Gly Pro
1025 1030 1035

Tyr Ser Met Ile Thr Gln Gln Pro Leu Gly Gly Lys Ala Gln Phe
1040 1045 1050

Gly Gly Gln Arg Phe Gly Glu Met Glu Val Trp Ala Leu Glu Ala
1055 1060 1065

Tyr Gly Ala Ala Tyr Ala Leu Gln Glu Leu Leu Thr Ile Lys Ser
1070 1075 1080

Asp Asp Ile Leu Gly Arg Val Lys Val Tyr Glu Ala Ile Val Lys
1085 1090 1095

Gly Glu Asn Ile Gln Glu Pro Gly Ile Pro Glu Ser Phe Lys Val
1100 1105 1110

Leu Met Lys Glu Met Gln Ser Leu Cys Leu Asn Val Glu Val Leu
1115 1120 1125

Ser Ala Asp Gly Thr Leu Val Asn Leu Arg Asp Thr Asp Asp Glu
1130 1135 1140

Ala Phe Arg Ala Ala Glu Glu Leu Gly Ile Asn Ile Ser Ser Arg
1145 1150 1155

Phe Glu Ala Ala Ser Ile Asp Glu Ile
1160 1165

<210> 6

<211> 1188

<212> ADN

<213> Microbacterium sp.

<220>

<221> misc_feature

<223> Aislado bacteriano SGI SGI-014-C06

<220>

<221> misc_feature
 <223> Identificador génico SGI SG1MICG851004

 <220>
 <221> misc_feature
 <223> codifica la secuencia de péptidos en la SEQ ID NO 7

 <400> 6
 ttgccgactc gatgtcggtg gcctctccta cggtggaata caagccgaag agccattacg
 60

 ccttgctcga gagttgctcc caaccgggag gccgcgcaca gcctacaggc ggcaccacgc
 120

 ggcgagaagg agcacatcat gccatcacc gccgaccgcg agaagtcctt cgagaccgcc
 180

 ctgcgccaga tcgaccgcca gttcggaag ggctcggta tcgggctggg cagcgatgag
 240

 cgcgcgcgcg tggcgcgtat cccaccggc tccatcgccc tcgacgtcgc cctcggcgctc
 300

 ggaggactcc cgcgtggctg catcgtcag atctacggac cggagtcctc cggtaagacg
 360

 acgtcacc cgcacgcgat cgcgaacga cagcgtgccg gtggcatcgc ggcgttcac
 420

 gacgcgcgac acgcgctcga ccccgactac gccccaagc tcggcgctcga catcgatgcg
 480

 ctctgggtct cgcagccga caccgggtgag caggcgctcg agatcgccga catgctcgtg
 540

 cgctccggtg cgatcgacct catcgtcatc gactccgtcg cggccctcgt gccgcgcgc
 600

 gagatcgagg gcgagatggg tgactcgac gtcggtctgc aggctcgctt catgtcgcag
 660

 gcgctgcgaa agctcaccg tggctcgaac cagacgaaca ccacgatgat cttcatcaac
 720

 cagctccgcg agaagatcg tgtcttcttc ggttcgccg agaccactgc cggcggttaag
 780

 gcgctcaagt tctacgcctc ggtccgcagt gacatccgtc gtatcgagac gctcaaggac
 840

 ggtactgacg ctgtcggtaa ccgcaccagg gtcaaggctc tcaagaacaa gatggctccg
 900

cctttcaagc aggccgagtt cgacatcctc tacggcgctcg gcatctcgcg cgaggggaagc
960

ctgatcgact tcggtgtcga gcatgcgata gtcaagaagt ccggttcctg gtatacgtac
1020

gacggtgacc agctgggtca gggcaaggag aacgcgcgga cgttcctgct caacaacccc
1080

gacatcgcg c tggcgatcga gacgcagatc aagcagaagc tcggcatcgg cggccccgc
1140

gcggcgccctg ctgcggcaga cgagctcgct gagcgctcgc cggcctga
1188

<210> 7
<211> 395
<212> PRT
<213> Microbacterium sp.

<220>
<221> misc_feature
<223> Aislado bacteriano SGI SGI-014-C06

<220>
<221> misc_feature
<223> Identificador peptídico SGI SG1MICT851004

<220>
<221> misc_feature
<223> recombinasa A

<400> 7

Met	Pro	Thr	Arg	Cys	Arg	Trp	Pro	Leu	Leu	Arg	Trp	Lys	Thr	Ser	Arg
1				5					10					15	

Arg	Ala	Ile	Thr	Pro	Cys	Arg	Arg	Val	Ala	Pro	Asn	Arg	Glu	Arg	Arg
		20						25					30		

Asp	Ser	Leu	Gln	Ala	Ala	Pro	Arg	Ala	Gln	Lys	Glu	His	Ile	Met	Pro
	35						40					45			

Ser	Pro	Ala	Asp	Arg	Glu	Lys	Ser	Leu	Glu	Thr	Ala	Leu	Ala	Gln	Ile
	50					55					60				

Asp	Arg	Gln	Phe	Gly	Lys	Gly	Ser	Val	Met	Arg	Leu	Gly	Ser	Asp	Glu
65					70					75					80

Arg Ala Pro Val Ala Val Ile Pro Thr Gly Ser Ile Ala Leu Asp Val
85 90 95

Ala Leu Gly Val Gly Gly Leu Pro Arg Gly Arg Ile Val Glu Ile Tyr
100 105 110

Gly Pro Glu Ser Ser Gly Lys Thr Thr Leu Thr Leu His Ala Ile Ala
115 120 125

Asn Ala Gln Arg Ala Gly Gly Ile Ala Ala Phe Ile Asp Ala Glu His
130 135 140

Ala Leu Asp Pro Asp Tyr Ala Ala Lys Leu Gly Val Asp Ile Asp Ala
145 150 155 160

Leu Leu Val Ser Gln Pro Asp Thr Gly Glu Gln Ala Leu Glu Ile Ala
165 170 175

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

Val Ala Ala Leu Val Pro Arg Ala Glu Ile Glu Gly Glu Met Gly Asp
195 200 205

Ser His Val Gly Leu Gln Ala Arg Leu Met Ser Gln Ala Leu Arg Lys
210 215 220

Leu Thr Gly Gly Leu Asn Gln Thr Asn Thr Thr Met Ile Phe Ile Asn
225 230 235 240

Gln Leu Arg Glu Lys Ile Gly Val Phe Phe Gly Ser Pro Glu Thr Thr
245 250 255

Ala Gly Gly Lys Ala Leu Lys Phe Tyr Ala Ser Val Arg Met Asp Ile
260 265 270

Arg Arg Ile Glu Thr Leu Lys Asp Gly Thr Asp Ala Val Gly Asn Arg
275 280 285

Thr Arg Val Lys Val Val Lys Asn Lys Met Ala Pro Pro Phe Lys Gln
290 295 300

Ala Glu Phe Asp Ile Leu Tyr Gly Val Gly Ile Ser Arg Glu Gly Ser
305 310 315 320

Leu Ile Asp Phe Gly Val Glu His Ala Ile Val Lys Lys Ser Gly Ser
325 330 335

Trp Tyr Thr Tyr Asp Gly Asp Gln Leu Gly Gln Gly Lys Glu Asn Ala
340 345 350

Arg Thr Phe Leu Leu Asn Asn Pro Asp Ile Ala Leu Ala Ile Glu Thr
355 360 365

Gln Ile Lys Gln Lys Leu Gly Ile Gly Gly Pro Ala Ala Ala Pro Ala
370 375 380

Ala Ala Asp Glu Leu Ala Glu Arg Arg Pro Ala
385 390 395

<210> 8
<211> 2175
<212> ADN
<213> Microbacterium sp.

<220>
<221> misc_feature
<223> Aislado bacteriano SGI SGI-014-C06

<220>
<221> misc_feature
<223> Identificador génico SGI SGI-MICG849768

<220>
<221> misc_feature
<223> codifica la secuencia de péptidos en la SEQ ID NO 9

<400> 8
atgtaccca tgatgatcc cgactcgcc gacgccggcc tcggtgacgc cgaagacgac
60

gattcgacg ccatcgagtc tcccgactcc cagctcccg accaccgcta cctggatcgc
120

gagctgagct ggctcgctt caaccagcgc gtaatggagc tcgccgagga tccgtcactg
180

cccgaactcg agcggggcgaa cttcctggcg atcttcgcca gcaacctcga cgagttcttc
240

atggtgcgcg tcgccggcct caagcgccgc atcatgaccg gcctggccgt gccgacgaac
300

atcgccgct ccccgctga cgcgctcgcc gacatctccc gcgaagcgca cgccctgcag
360

ctggtcacg ccgaggcctg gacctcgctc gtgcgccccg ccctggccga ctccggcatc
420

gagatcacgg actggtccga gctgaccgac gacgagcgt ccggattgtc cgagtacttc
480

cagctccagg tcttcccggg gctgatgccg ctgcggtcg acccggcgca tccgttcccc
540

tacatctccg gcctgtcgt gaacctcgcg atccgcatcc gcaatgcccg caccgggcgc
600

caggagttcg cgcgcctcaa ggtgccgccc atgctcccc gttcgtgga ggtgccgggc
660

ggcggcgaga tcaagcgctt cctgcgcctg gaggaactga tcgcgaacca cctcggcgac
720

ctgttccccg gcatggagggt gctcgaccac cgcggttc gcctacccg caacgaagac
780

gtggagatcg aggaagacga gagcgagaac ctcattcagg cgctcgaggc cgagctgctg
840

cgccgtcgat tcggcccgcg gatccgcctc gagatcacgg acgacatgga cgaggtcacg
900

atggacctgc tcgtccgcga gctcgacatc accgacctgg aggtctaccg cctccccggt
960

ccgctcgacc tgcgcggact gttcgatctg tcccgcatcg accgtcccga cctgcgctac
1020

ccgcccacc tgcccaccac ggccgtggcc ttccagcccg caggatcgag caaccgcgcc
1080

gacatcttca aagcgatccg caagtcggat gtgctcgtgc accaccgta cgagtcgttc
1140

acgaccagcg tgcaggcggt cctcgaacag gccgcccgcg acccgcacgt gctcgccatc
1200

aagcagaccc tgtaccgcac ctcgggcgac agcccggtcg tgcaggcgct gatcgacgcg
1260

gccgaagccg gcaagcaggt gctggccctc gtcgaggtga aggcccgttt cgacgaggcc
1320

aacaacatcg tctgggcacg caagctcgag aaggccggcg tgcacgtggt ctacggtctc
1380

gtcggactca agaccactg caagctcgcc ctcgatcatcc gcgaggaaga ggggatgctg
1440

cgccactact cgcacgtcgg caccggcaac tacaacccca agaccagccg catctacgag
1500

gacttcggtc tgttcaccgc agacgcgcag gtcggcaaag acctgacacg cctgttcaac
1560

gagctcagcg gctacgcgat cgagaagaag ttcaagcgcc tgctggtcgc cccgctgcac
1620

ctgcgcaagg gctcatccg ccagatcgac gccgagcgca ggaacgccga ggcggggatc
1680

cccgcgcaca tccgcatcaa ggtgaactcg atggtcgatg aggagatcat cgacgcgctc
1740

taccgcgcga gcgcggccgg ggtgaaggtc gacgtgtggg tgcgcggcat ctgcagcctg
1800

cgcaccgacc tcgacggcat cagtgacaac atcacggtgc gcagatcct cggccgctac
1860

ctcgagcact cccgcatctt cgcgttcgag aacgccggcg acccgcaggt gtacatcggc
1920

agcgcgcaca tgatgcaccg caacctcgac cgtcgtgtgg aggcgctggt gcgcgtcacc
1980

gacgccgacc acctcaagga actgcaggcg ttcttcgacc tcgcgatgga cgacggaacc
2040

tcgtcgtggc atctcggcgc cggcggcgtc tgggagcgcc acgccgtgaa cgccgacggc
2100

aagccgctga tcgacctga ggataagacc atggggttga tccagcggcg ccgccgcgcg
2160

cgggcggttc gatga
2175

<210> 9

<211> 724
<212> PRT
<213> Microbacterium sp.

<220>
<221> misc_feature
<223> Aislado bacteriano SGI SGI-014-C06

<220>
<221> misc_feature
<223> Identificador peptídico SGI SG1MICT849768

<220>
<221> misc_feature
<223> polifosfato cinasa

<400> 9

Met Tyr Pro Met Ile Asp Pro Ala Leu Ala Asp Ala Gly Leu Gly Asp
1 5 10 15

Ala Glu Asp Asp Asp Phe Asp Ala Ile Glu Ser Pro Asp Ser Gln Leu
20 25 30

Pro Asp His Arg Tyr Leu Asp Arg Glu Leu Ser Trp Leu Ala Phe Asn
35 40 45

Gln Arg Val Met Glu Leu Ala Glu Asp Pro Ser Leu Pro Glu Leu Glu
50 55 60

Arg Ala Asn Phe Leu Ala Ile Phe Ala Ser Asn Leu Asp Glu Phe Phe
65 70 75 80

Met Val Arg Val Ala Gly Leu Lys Arg Arg Ile Met Thr Gly Leu Ala
85 90 95

Val Pro Thr Asn Ile Gly Arg Ser Pro Val Asp Ala Leu Ala Asp Ile
100 105 110

Ser Arg Glu Ala His Ala Leu Gln Leu Arg His Ala Glu Ala Trp Thr
115 120 125

Ser Leu Val Arg Pro Ala Leu Ala Asp Ser Gly Ile Glu Ile Thr Asp
130 135 140

Trp Ser Glu Leu Thr Asp Asp Glu Arg Ser Gly Leu Ser Glu Tyr Phe
145 150 155 160

Gln Leu Gln Val Phe Pro Val Leu Met Pro Leu Ala Val Asp Pro Ala
165 170 175

His Pro Phe Pro Tyr Ile Ser Gly Leu Ser Leu Asn Leu Ala Ile Arg
180 185 190

Ile Arg Asn Ala Arg Thr Gly Arg Gln Glu Phe Ala Arg Leu Lys Val
195 200 205

Pro Pro Met Leu Pro Arg Phe Val Glu Val Pro Gly Gly Gly Glu Ile
210 215 220

Lys Arg Phe Leu Arg Leu Glu Glu Leu Ile Ala Asn His Leu Gly Asp
225 230 235 240

Leu Phe Pro Gly Met Glu Val Leu Asp His His Ala Phe Arg Leu Thr
245 250 255

Arg Asn Glu Asp Val Glu Ile Glu Glu Asp Glu Ser Glu Asn Leu Ile
260 265 270

Gln Ala Leu Glu Ala Glu Leu Leu Arg Arg Arg Phe Gly Pro Pro Ile
275 280 285

Arg Leu Glu Ile Thr Asp Asp Met Asp Glu Val Thr Met Asp Leu Leu
290 295 300

Val Arg Glu Leu Asp Ile Thr Asp Leu Glu Val Tyr Arg Leu Pro Gly
305 310 315 320

Pro Leu Asp Leu Arg Gly Leu Phe Asp Leu Ser Arg Ile Asp Arg Pro
325 330 335

Asp Leu Arg Tyr Pro Pro His Leu Pro Thr Thr Ala Val Ala Phe Gln
340 345 350

Pro Ala Gly Ser Ser Asn Arg Ala Asp Ile Phe Lys Ala Ile Arg Lys
 355 360 365

Ser Asp Val Leu Val His His Pro Tyr Glu Ser Phe Thr Thr Ser Val
 370 375 380

Gln Ala Phe Leu Glu Gln Ala Ala Arg Asp Pro His Val Leu Ala Ile
 385 390 395 400

Lys Gln Thr Leu Tyr Arg Thr Ser Gly Asp Ser Pro Val Val Gln Ala
 405 410 415

Leu Ile Asp Ala Ala Glu Ala Gly Lys Gln Val Leu Ala Leu Val Glu
 420 425 430

Val Lys Ala Arg Phe Asp Glu Ala Asn Asn Ile Val Trp Ala Arg Lys
 435 440 445

Leu Glu Lys Ala Gly Val His Val Val Tyr Gly Leu Val Gly Leu Lys
 450 455 460

Thr His Cys Lys Leu Ala Leu Val Ile Arg Glu Glu Glu Gly Met Leu
 465 470 475 480

Arg His Tyr Ser His Val Gly Thr Gly Asn Tyr Asn Pro Lys Thr Ser
 485 490 495

Arg Ile Tyr Glu Asp Phe Gly Leu Phe Thr Ala Asp Ala Gln Val Gly
 500 505 510

Lys Asp Leu Thr Arg Leu Phe Asn Glu Leu Ser Gly Tyr Ala Ile Glu
 515 520 525

Lys Lys Phe Lys Arg Leu Leu Val Ala Pro Leu His Leu Arg Lys Gly
 530 535 540

Leu Ile Arg Gln Ile Asp Ala Glu Arg Arg Asn Ala Glu Ala Gly Ile
 545 550 555 560

Pro Ala His Ile Arg Ile Lys Val Asn Ser Met Val Asp Glu Glu Ile
 565 570 575

Ile Asp Ala Leu Tyr Arg Ala Ser Ala Ala Gly Val Lys Val Asp Val
580 585 590

Trp Val Arg Gly Ile Cys Ser Leu Arg Thr Asp Leu Asp Gly Ile Ser
595 600 605

Asp Asn Ile Thr Val Arg Ser Ile Leu Gly Arg Tyr Leu Glu His Ser
610 615 620

Arg Ile Phe Ala Phe Glu Asn Ala Gly Asp Pro Gln Val Tyr Ile Gly
625 630 635 640

Ser Ala Asp Met Met His Arg Asn Leu Asp Arg Arg Val Glu Ala Leu
645 650 655

Val Arg Val Thr Asp Ala Asp His Leu Lys Glu Leu Gln Ala Phe Phe
660 665 670

Asp Leu Ala Met Asp Asp Gly Thr Ser Ser Trp His Leu Gly Ala Gly
675 680 685

Gly Val Trp Glu Arg His Ala Val Asn Ala Asp Gly Lys Pro Leu Ile
690 695 700

Asp Leu Gln Asp Lys Thr Met Gly Leu Ile Gln Arg Arg Arg Arg Ala
705 710 715 720

Arg Ala Val Arg

<210> 10
<211> 1390
<212> ADN
<213> Microbacterium sp.

<220>
<221> misc_feature
<223> Aislado bacteriano SGI SGI-005-G08

<220>
<221> misc_feature
<223> codifica un ARN ribosómico de 16S

<220>
<221> misc_feature
<222> (29)..(36)
<223> n e s a, c, g, t, u otro

<220>
<221> misc_feature
<222> (38)..(41)
<223> n e s a, c, g, t, u otro

<400> 10
aacggtgaac acggagcttg ctctgtggnn nnnnnngnnn ncgggtgagt aacacgtgag
60

caacctgccc ctgactctgg gataagcgct ggaaacggcg tctaatactg gatacgagta
120

gcgatcgcat ggtcagctac tggaagatt ttttggttg ggatgggctc gcggcctatc
180

agcttggttg tgaggtaatg gctcaccaag gcgtcgacgg gtagccggcc tgagaggggtg
240

accggccaca ctgggactga gacacggccc agactcctac gggaggcagc agtggggaat
300

attgcacaat gggcggaagc ctgatgcagc aacgccgcgt gagggatgac ggccttcggg
360

ttgtaaacct cttttagcag ggaagaagcg aaagtgcagc tacctgcaga aaaagcgccg
420

gctaactacg tgccagcagc cgcggtaata cgtagggcgc aagcgttatc cggaattatt
480

gggcgtaaag agctcgtagg cggtttgctg cgtctgctgt gaaatccga ggctcaacct
540

cgggcctgca gtgggtacgg gcagactaga gtgcggtagg ggagattgga attcctggtg
600

tagcggtgga atgcgcagat atcaggagga acaccgatgg cgaaggcaga tctctgggcc
660

gtaactgacg ctgaggagcg aaaggggtgg gagcaaacag gcttagatac cctggtagtc
720

caccccgtaa acgttgggaa ctagtgttg ggtccattcc acggattccg tgacgcagct
780

aacgcattaa gttccccgcc tggggagtac ggccgcaagg ctaaaactca aaggaattga
840

cggggacccg cacaagcggc ggagcatgcg gattaattcg atgcaacgcg aagaacctta
900

ccaaggcttg acatatacga gaacggggcca gaaatggtca actctttgga cactcgtaaa
960

caggtggtgc atggttgtcg tcagctcgtg tcgtgagatg ttgggttaag tcccgcaacg
1020

agcgcaaccc tcgttctatg ttgccagcac gtaatggtgg gaactcatgg gatactgccg
1080

gggtcaactc ggaggaaggt ggggatgacg tcaaatacgc atgcccctta tgtcttgggc
1140

ttcacgcatg ctacaatggc cggatataag ggctgcaata ccgtgaggtg gagcgaatcc
1200

caaaaagccg gtcccagttc ggattgaggt ctgcaactcg acctcatgaa gtcggagtcg
1260

ctagtaatcg cagatcagca acgctgcggt gaatacgttc ccgggtcttg tacacaccgc
1320

ccgtcaagtc atgaaagtcg gtaacacctg aagccggtgg cctaaccctt gtggagggag
1380

ccgtcgaagg
1390

<210> 11
<211> 532
<212> ADN
<213> Mycosphaerella sp.

<220>
<221> misc_feature
<223> Aislado bacteriano SGI SGI-010-H11

<220>
<221> misc_feature
<223> ADN ribosómico 1_5.8S espaciador transcripto interno

<220>
<221> misc_feature
<222> (43)..(43)
<223> n es a, c, g, o t

<220>
<221> misc_feature
<222> (526)..(526)
<223> n es a, c, g, o t

<400> 11

cggagggatc attaatgagt gagggggcca cccccaacct ccnacccttt gtgaacgcat
60

catgttgctt cgggggagac cctgccgttc gcggcattcc ccccgagggt catcaaaaca
120

ctgcattctt acgtcggagt aaaaagttaa ttttaataaaa ctttcaacaa cggatctctt
180

ggttctggca tcgatgaaga acgcagcgaa atgcgataag taatgtgaat tgcagaattc
240

agtgaatcat cgaatctttg aacgcacatt gcgccccctg gtattccggg gggcatgcct
300

gttcgagcgt catttcacca ctcaagcttc gcttggtatt gggcgtcgag agtctctcgc
360

gcgcctcaaa gtctccgggt gttcgggttcg tctcccagcg ttgtggcaac tatttcgcag
420

tggagtagca gtcgtggcgg ccgttaaatac tttcaaaggt tgacctcgga tcaggtaggg
480

ataccgcgtg aacttaagca tatcaataag cggaggaggt catagntgtt tc
532

<210> 12

<211> 1431

<212> ADN

<213> Variovorax sp.

<220>

<221> misc_feature

<223> Aislado bacteriano SGI SGI-014-G01

<220>

<221> misc_feature

<223> codifica un ARN ribosómico de 16S

<400> 12

tgcccttacac atgcaagtgc aacggcagcg cgggagcaat cctggcggcg agtggcgaa
60

gggtgagtaa tacatcgga cgtgcccaat cgtgggggat aacgcagcga aagctgtgct
120

aataccgcat acgatctacg gatgaaagca ggggatcgca agaccttgcg cgaatggagc
180

ggccgatggc agattaggta gttggtgagg taaaggctca ccaagccttc gatctgtagc
240

tggtctgaga ggacgaccag ccacactggg actgagacac ggcccagact cctacgggag
300

gcagcagtgg ggaattttgg acaatgggag aaagcctgat ccagccatgc cgcggtgcagg
360

atgaaggcct tcgggttgta aactgctttt gtacggaacg aaacggcctt ttctaataaa
420

gagggctaatt gacggtaccg taagaataag caccggctaa ctacgtgcca gcagccgcgg
480

taatacgtag ggtgcaagcg ttaatcgga ttactgggag taaagcgtgc gcagggcgtt
540

atgtaagaca gttgtgaaat ccccgggctc aacctgggaa ctgcatctgt gactgcatag
600

ctagagtacg gtagaggggg atggaattcc gcgtgtagca gtgaaatgcg tagatatgcg
660

gaggaacacc gatggcgaag gcaatcccct ggacctgtac tgacgctcat gcacgaaagc
720

gtggggagca aacaggatta gataccctgg tagtccacgc cctaaacgat gtcaactggt
780

tgttgggtct tcaactgactc agtaacgaag ctaacgcgtg aagttgaccg cctggggagt
840

acggccgcaa ggttgaaact caaaggaatt gacggggacc cgcacaagcg gtggatgatg
900

tggtttaatt cgatgcaacg cgaaaaacct taccacctt tgacatgtac ggaattcgcc
960

agagatggct tagtgctcga aagagaaccg taacacaggt gctgcatggc tgcgtcagc
1020

tcgtgtcgtg agatgttggg ttaagtcccg caacgagcgc aacccttgct attagttgct
1080

acattcagtt gggcactcta atgagactgc cggtgacaaa ccggaggaag gtggggatga
1140

cgtcaagtcc tcatggccct tataggtggg gctacacacg tcatacaatg gctggtacaa
1200

agggttgcca acccgcgagg gggagctaatt ccataaaac cagtcgtagt ccggatcgca
1260

gtctgcaact cgactgcgtg aagtcggaat cgctagtaat cgtggatcag aatgtcacgg
1320

tgaatacggtt cccgggtctt gtacacaccg cccgtcacac catgggagcg ggttctgcca
1380

gaagtagtta gcttaaccgc aaggagggcg attaccacgg caggggtcgt g
1431

<210> 13
<211> 1424
<212> ADN
<213> Bacillus amyloliquefaciens

<220>
<221> misc_feature
<223> Aislado bacteriano SGI SGI-015-F03

<220>
<221> misc_feature
<223> codifica un ARN ribosómico de 16S

<400> 13
ctggcggcgt gcctaataca tgcaagtcga gcggacagat gggagcttgc tccctgatgt
60

tagcggcgga cgggtgagta acacgtgggt aacctgcctg taagactggg ataactccgg
120

gaaaccgggg ctaataccgg atggttgtct gaaccgcatg gttcagacat aaaaggtggc
180

ttcggtacc acttacagat ggaccgcgg cgcattagct agttggtgag gtaacggctc
240

accaaggcga cgatgcgtag ccgacctgag agggatgatcg gccacactgg gactgagaca
300

cggcccagac tcttacggga ggcagcagta gggaatcttc cgcaatggac gaaagtctga
360

cggagcaacg ccgcgtgagt gatgaaggtt ttcggatcgt aaagctctgt tgttagggaa
420

gaacaagtgc cgttcaaata gggcggcacc ttgacgttac ctaaccagaa agccacggct
480

aactacgtgc cagcagccgc ggtaatacgt aggtggcaag cgttgtccgg aattattggg
540

cgtaaagggc tcgcaggcgg tttcttaagt ctgatgtgaa agccccggc tcaaccgggg
600

agggtcattg gaaactgggg aacttgagtg cagaagagga gagtgggaatt ccacgtgtag
660

cggtgaaatg cgtagagatg tggaggaaca ccagtggcga aggcgactct ctggtctgta
720

actgacgctg aggagcgaaa gcgtagggag cgaacaggat tagataccct ggtagtccac
780

gccgtaaaacg atgagtgcta agtgtaggg ggtttccgcc ccttagtgct gcagctaacg
840

cattaagcac tccgcctggg gagtacggc gcaagactga aactcaaagg aattgacggg
900

ggcccgacaca agcggtaggag catgtgggtt aattcgaagc aacgcgaaga accttaccag
960

gtcttgacat cctctgacaa tcctagagat aggacgtccc cttcgggggc agagtgacag
1020

gtggtgcatg gttgtcgtca gctcgtgctg tgagatgttg ggttaagtcc cgcaacgagc
1080

gcaacccttg atcttagttg ccagcattca gttgggcact ctaaggtgac tgccggtgac
1140

aaaccggagg aaggtgggga tgacgtcaaa tcatcatgcc ccttatgacc tgggctacac
1200

acgtgctaca atggacagaa caaagggcag cgaaaccgcg aggttaagcc aatcccacaa
1260

atctgttctc agttcggatc gcagtctgca actcgactgc gtgaagctgg aatcgctagt
1320

aatcgcggat cagcatgccg cggatgaatac gttcccgggc cttgtacaca ccgcccgtca
1380

caccacgaga gtttgtaaca cccgaagtcg gtgaggtaac cttt
1424

<210> 14
<211> 1425
<212> ADN
<213> Bacillus subtilis

<220>
<221> misc_feature
<223> Aislado bacteriano SGI SGI-015-H06

<220>
<221> misc_feature
<223> codifica un ARN ribosómico de 16S

<400> 14

gctggcggcg tgcctaatac atgcaagtcg agcggacaga tgggagcttg ctccctgatg
60

ttagcggcgg acgggtgagt aacacgtggg taacctgcct gtaagactgg gataactccg
120

ggaaaccggg gctaataccg gatgggtggt tgaaccgcat gggtcagaca taaaagggtg
180

cttcggctac cacttacaga tggaccgcg gcgcattagc tagttggtga ggtaacggct
240

caccaaggca acgatgcgta gccgacctga gagggatgac ggccacactg ggactgagac
300

acggcccaga ctctacggg aggcagcagt agggaatctt ccgcaatgga cgaaagtctg
360

acggagcaac gccgcgtgag tgatgaagg tttcgatcg taaagctctg ttgttaggga
420

agaacaagt cgttcaaat agggcggcac cttgacggta cctaaccaga aagccacggc
480

taactacgtg ccagcagccg cggtaatacg taggtggcaa gcgttgtccg gaattattgg
540

gcgtaaagg ctgcaggcg gtttcttaag tctgatgtga aagcccccg ctcaaccggg
600

gagggtcatt ggaaactggg gaacttgagt gcagaagagg agagtggaat tccacgtgta
660

gcggtgaaat gcgtagagat gtggaggaac accagtggcg aaggcgactc tctggtctgt
720

aactgacgct gaggagcgaa agcgtgggga gcgaacagga ttagataccc tggtagtcca
780

cgccgtaaac gatgagtgt aagtgttagg gggtttccgc cccttagtgc tgcagctaac
840

gcattaagca ctccgcctgg ggagtacggt cgcaagactg aaactcaaag gaattgacgg
900

gggccgcac aagcgggtga gcatgtggt taattcgaag caacgcgaag aaccttacca
960

ggtcttgaca tcctctgaca atcctagaga taggacgtcc ccttcggggg cagagtgaca
1020

ggtggtgcat ggttgctgct agtcgtgct gtgagatgtt gggtaagtc ccgcaacgag
1080

cgcaaccctt gatcttagtt gccagcattc agttgggcac tctaaggtga ctgccggtga
1140

caaaccggag gaaggtgggg atgacgtcaa atcatcatgc cccttatgac ctgggctaca
1200

cacgtgctac aatggacaga acaaagggca gcgaaaccgc gaggttaagc caatcccaca
1260

aatctgttct cagttcggat cgcagctctgc aactcgactg cgtgaagctg gaatcgctag
1320

taatcgcgga tcagcatgcc gcggtgaata cgttcccggg ccttgtagac accgcccgtc
1380

acaccacgag agtttgtaac acccgaagtc ggtgaggtaa ccttt
1425

<210> 15
<211> 37
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador de PCR M13-ITS1

<400> 15
tgtaaaacga cggccagttt cgtaggtgaa cctgcgg
37

<210> 16
<211> 38
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador de PCR ITS4-M13

<400> 16
caggaaacag ctatgacctc ctccgcttat tgatatgc
38

<210> 17
<211> 39
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador de PCR M13-27F Bac

<400> 17
tgtaaaacga cggccagtta gagtttgatc ctggctcag
39

<210> 18
<211> 37
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador de PCR 1492R-M13 Bac

<400> 18
caggaaacag ctatgaccgg ttaccttggtt acgactt
37



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 15-118252-00000-0000

Fecha: 2015-05-25 15:29:04 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 106

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO DE UTILIDAD ☐

Art 33 Decisión 486/00

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 14-036105-00006-0000

Fecha: 2015-05-25 15:29:04 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 851 DIVISIONAL Folios: 106

☐	Indicación que se solicita una patente.
☐	Datos de identificación del solicitante o de la
☐	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 INVENCION 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 ☐	