

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO	
RAD: 14-274212- -1	FECHA: 2015-05-18 17:01:15
DEP: 2020 DIRECCION DE NUEVAS CREACIONES	EVE: 378 FASE NACIONAL INCLUIDO CAPITULO I
TRA: 11 PCT-PATENTE DE INVENCION CAPITULOS I Y II	FOLIOS: 13
ACT: 519 TRASLADOINFORME	

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

2020
Bogotá, D.C.,

Abogado(a)/Señor(a)
JAIME EDUARDO DELGADO VILLEGAS

Asunto: Radicación: 14-274212- -1
 Trámite: 11
 Evento: 378
 Actuación: 519
 Oficio: 5428
 Folios: 13

Patente de Invención	X			Patente de Modelo de Utilidad	
Vía Nacional					
Vía PCT (Fase Nacional)	X	Capítulo I	X	Capítulo II	
No. Solicitud Internacional	PCT/EP2011/071418				
Fecha de Presentación Internacional	30/11/2011				

Como resultado del examen de fondo realizado, con fundamento en el Artículo 45 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, se comunica:

1. Documentos estudiados

Descripción:	Radicado 14-274212-00000-0000	12/Diciembre/2014
Reivindicaciones:	Radicado 14-274212-00000-0000	12/Diciembre/2014
Prioridad:	EP 10193335.6	01/Diciembre/2010
	US 61/419,438	03/Diciembre/2010

2. Análisis de la Prioridad

Se acepta la reivindicación de prioridad porque ésta solicitud fue presentada dentro del plazo establecido (Art. 9 D 486) y su contenido técnico corresponde con el de la prioridad reivindicada.

3. Presentación de solicitudes Fraccionarias (Art 36 D 486)

La presente solicitud corresponde a una divisional de la solicitud parental 13-133020-00000-0000.

4. Objeto de la invención

De acuerdo con lo establecido en el numeral 1.2.2.2 del Capítulo Primero del Título X de la Circular Única para efectos del examen de patentabilidad, se tendrá en cuenta la tasa pagada por el solicitante al momento de comenzar el examen para las reivindicaciones adicionales; esto es que cuando la solicitud contenga más de diez (10) reivindicaciones y no se haya pagado la tasa complementaria, sólo se estudiarán las cubiertas por la tasa pagada. Con relación a la presente solicitud se estudiarán las reivindicaciones 1 a 12 de acuerdo con el radicado 14-274212-00000-0000.

Título de la solicitud: "Combinaciones de principios activos que comprenden piridietilbenzamidas y otros principios activos".

El problema planteado en esta solicitud consiste en la necesidad de suministrar combinaciones que comprendan ingredientes activos útiles para combatir plagas en plantas.

Para resolver este problema técnico la solicitud en estudio proporciona una combinación de fluoripam y *Metschnikowia fructicola* y/o cepa NRRL Y-30752 de *Metschnikowia fructicola*.

El objeto de la presente solicitud se relaciona con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP): A01N31/08, 43/28, 57/32; A01P5/00, 7/04.

5. De la solicitud de patente

Título

El título no permite identificar el alcance de la invención ya que define de forma general las combinaciones en términos de su familia química o su actividad biológica, por lo anterior, se sugiere restringir el título incluyendo las características técnicas inventivas. Además, es necesario que el título permita distinguir la presente solicitud de la solicitud original y sus divisionales.

Reivindicaciones (Art 30 D 486, Art 22 PCT)

La reivindicación 1 se encabeza como una combinación entre los compuestos fluopiram y *Metschnikowia fructicola*, sin embargo, de acuerdo con los ejemplos sustentados lo definido corresponde a composiciones, por lo que, se sugiere cambiar el encabezado combinación por composición. Además, las reivindicaciones deben ser claras en cuanto al tipo producto que reclaman.

La reivindicación 2 no es clara porque reclama una procedimiento de preparación sin definirlo en términos de una serie lógica y ordenada de etapas, además, no

establece en estás las condiciones, ingredientes y parámetros que permiten alcanzar el objeto propuesto. Se sugiere hacer las aclaraciones necesarias.

Las Reivindicaciones 2-3 incluyen las expresiones “composiciones insecticidas y/o acaricidas y/o nematocidas” y “combatir plagas animales” que refieren el uso de la composición reivindicada, el cual no es una característica técnica que defina a la invención. Se sugiere eliminar dichas expresiones.

La reivindicación 3 no es clara porque define los excipientes en términos de su función dentro de la composición, se recuerda, que los excipientes se deben definir en términos de su nombre común y proporciones dentro de la composición, se sugiere hacer las aclaraciones necesarias.

La reivindicación 4 no es clara porque la expresión “por ejemplo” precediendo una característica no es limitativa, porque hace opcional a la característica y no precisa el alcance de la reivindicación. Se sugiere incluir una expresión concreta de acuerdo con los ejemplos sustentados.

La reivindicación 10 no es clara porque reclama la inclusión de arcillas modificadas sin caracterizarlas, se sugiere hacer las precesiones necesarias.

Las reivindicaciones 2-12 no son concisas porque las definiciones de los excipientes son generales, por lo que se sugiere restringir la solicitud a una razonable generalización de los excipientes probados, es decir, que se encuentran debidamente sustentados a través de ejemplos concretos de acuerdo con lo presentado en la tabla No 1.

Tabla No. 1 Excipientes de las composiciones soportadas.

Excipientes	Ejemplos probados
Tensioactivos	No sustenta
Diluyentes	No sustenta
Disolventes	Acetona, dimetilformamida
Colorantes	No sustenta
Humectantes	No sustenta
Dispersantes y/o emulsionantes	No define (alquilarilpoliglicoléter)
Antiespumante	No sustenta
Conservante	No sustenta
Espesante	No sustenta
Adhesivos	No sustenta
Gibelinas	No sustenta

Las reivindicaciones 2-12 reclaman que la composición incluye tensioactivos, diluyentes, colorantes, humectantes, antiespumantes, conservantes, espesantes, adhesivos y gibelinas, sin embargo, dentro del capítulo descriptivo no se definen ejemplos concretos de composiciones que comprendan los mencionados excipientes, se aclara, que la mera mención de la posibilidad de incluir unos excipientes seleccionados de una extensa lista no es suficiente soporte, las composiciones se deben definir en términos de sus ingredientes (DCI/IUPAc para los activos y nombre común para los excipientes) y proporciones, por lo anterior, se sugiere eliminar de las mencionadas cláusulas los excipientes no sustentados.

Descripción (Art 28 D 486)

Debido a que la solicitud se refiere a material biológico, es necesario presentar el Certificado de Depósito para la cepa NRRL Y-30752 de *Metschnikowia fructicola*.

Se requiere al solicitante hacer las aclaraciones necesarias.

6. Determinación del Estado de la Técnica

El estado de la técnica se determinó con base en la fecha de presentación de la solicitud de la cual se invoca prioridad, es decir, diciembre 01 de 2010. Consultadas las fuentes de información con que se cuenta, se encontraron los siguientes documentos que anticipan el objeto de esta solicitud:

Ítem	Documento	Título	Fecha de Publicación
D1	US20100249193	“Nematicidal, Insecticidal and Acaricidal Active Ingredient Combinations Comprising Pyridylethylbenzamides and Insecticides”	30/Septiembre/2010
D2	US6994849	“Yeast Metschnikowia fructicola NRRL Y-30752 for inhibiting deleterious microorganisms on plants”	07/Febrero/2006

El documento D1⁽¹⁾ divulga combinaciones que comprenden fluopiram útiles en el control de plagas producidas por insectos, ácaros y nematodos en suelo, hojas y semillas (Resumen y Pág. 11, Rv. 1).

El documento D2⁽²⁾ divulga composiciones que comprenden *Metschnikowia fructicola* y/o cepa NRRL Y-30752 y un compuesto fungicida útiles para inhibir el crecimiento de microorganismos fitopatógenos (Resumen y Cols. 21 y 22, Rvs. 4 y 7-9).

7. Examen de Patentabilidad (Art 14 D486)

Nivel inventivo (Art18 D486)

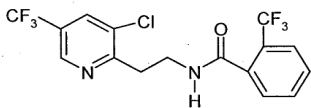
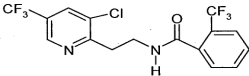
La reivindicación 1 consiste en “La reivindicación 1 consiste en la “Combinaciones de principios activos que comprenden fluopiram y *Metschnikowia fructicola* y/o cepa NRRL Y-30752 de *Metschnikowia fructicola* ”.

Comparación de las características técnicas esenciales, con las del estado de la técnica:

Características esenciales	D1	D2
Combinación que comprenden:	Combinación de ingredientes que comprende: (Pág. 11, Rv. 1)	Composición que comprende: (Cols. 21 y 22, Rvs. 4 y 7-9)

1 . [www.espacenet/ US20100249193](http://www.espacenet/US20100249193)

2 . [www.espacenet/ US6994849](http://www.espacenet/US6994849)

 (Fluopiram)	 (Fluopiram) (Pág. 11, Rv. 1)	Compuesto fungicida (Cols. 21 y 22, Rvs. 4 y 7-9)
<i>Metschnikowia fructicola</i>	No menciona	cepa NRRL Y-30752 de <i>Metschnikowia fructicola</i> (Cols. 21 y 22, Rvs. 4 y 7-9)

Los documentos D1 y D2 se consideran el estado de la técnica cercano a la invención definida en la reivindicación 1 porque en el caso del documento D1 divulga combinaciones que comprenden fluopiram útiles en el control de plagas producidas por insectos, ácaros y nematodos en suelo, hojas y semillas (Resumen y Pág. 11, Rv. 1). Por su parte, el documento D2 divulga composiciones que comprenden *Metschnikowia fructicola* y/o cepa NRRL Y-30752 y un compuesto fungicida útiles para inhibir el crecimiento de microorganismos fitopatógenos (Resumen y Cols. 21 y 22, Rvs. 4 y 7-9).

La diferencia entre la combinación, definida en la reivindicación 1 y la combinación revelada en el documento D1 consiste en que la combinación reclamada incluye al microorganismos *Metschnikowia fructicola* cepa NRRL Y-30752, mientras que la combinación divulgada en el documento D1 no incluye al mencionado microorganismo.

El efecto que logra el utilizar a la *Metschnikowia fructicola* cepa NRRL Y-30752 en la combinación consiste en que se aumenta la capacidad de combate de ésta contra las plagas.

Por lo tanto, el problema técnico objetivo que pretende resolver esta invención se puede formular así: “cómo proporcionar combinaciones que comprendan Fluopiram útiles para el control de las infestaciones de plagas en plantas”.

Sin embargo, la combinación de un agente químico fungicida con *Metschnikowia fructicola* cepa NRRL Y-30752 útil para tratar infestaciones de plagas en plantas, está divulgada en el documento D2 que enseña composiciones que comprenden *Metschnikowia fructicola* y/o cepa NRRL Y-30752 y un compuesto fungicida útiles para inhibir el crecimiento de microorganismos fitopatógenos (Resumen y Cols. 21 y 22, Rvs. 4 y 7-9).

Además, es parte del conocimiento de la persona normalmente versada en la materia que el microorganismo *Metschnikowia fructicola* es una levadura con actividad fungicida de acuerdo con lo divulgado en el documento “*Metschnikowia fructicola*, a New Ascosporic Yeast with Potential for Biocontrol of Postharvest Fruit Rots”⁽³⁾.

En consecuencia, la persona del oficio normalmente versada en la materia, incluiría dentro de la combinación divulgada en el documento D1 al microorganismos *Metschnikowia fructicola* cepa NRRL Y-30752 de acuerdo con lo revelado en el documento D2, para llegar así al objeto de la reivindicación 1 de la solicitud. Por lo cual se considera obvia.

3. System.Appl.Microbial.24,395-399(2001).

Puesto que las reivindicaciones dependientes 2-12 no mencionan características técnicas esenciales acerca de la combinación, tampoco se pueden considerar inventivas.

8. Conclusión

Los requisitos de Patentabilidad de la presente solicitud están afectados así:

Ítem	Documento	Reivindicaciones afectadas	Requisito que afecta
D1	US20100249193	1-12	Nivel inventivo
D2	US6994849	1-12	Nivel inventivo

En cumplimiento del artículo 45 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, se le indica que debe dar respuesta dentro del término de sesenta (60) días contados a partir del día siguiente de la fecha de notificación de la presente comunicación. En caso de no dar respuesta al presente requerimiento, o si a pesar de la respuesta subsistieran los impedimentos para la concesión, se denegará la patente.

Se invita al solicitante se sirva indicar, si así lo considera, su renuncia al término faltante de sesenta (60) días para dar respuesta a este requerimiento y presentarla por escrito.

Finalmente, se le recuerda al solicitante que si como respuesta a este requerimiento llegara a modificar el capítulo reivindicatorio y éste contenga más de diez (10) reivindicaciones, no pagará la tasa de modificación voluntaria pero sí la correspondiente al pago por reivindicación adicional.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única No. 10 de 2001.



JOSÉ LUIS SALAZAR LÓPEZ
Director de Nuevas Creaciones (c)

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista, de fecha 2015-05-26

Elaboró: German Antonio Clavijo Cohen
Revisó: Jeny Paola Villate Becerra

INFORME DE BÚSQUEDA DE PATENTES PARA EL No de Radicación: 14-274212						
CRITERIOS PARA LA BÚSQUEDA (anexar pantallazo o reporte en PDF, junto con los boleanos utilizados)						
Palabras clave utilizadas		- Microbial disruptors - <i>Metschnikowia fructicola</i> -Metschnikowia fructicola NRRL Y-30752 -Combinations of fungicidally active yeast and fungicides				
CLASIFICACIONES INTERNACIONALES UTILIZADAS PARA LA BÚSQUEDA		A01N31/08, 43/28, 57/32; A01P5/00, 7/04				
BASES DE DATOS CONSULTADAS.						
Google Patents						
WIPO						
Spacenet						
INFORMES DE EXÁMENES REALIZADOS EN OTRAS OFICINAS (documentos patentes, literatura no patente etc...)						
Oficina	Fecha del examen o de reporte de búsqueda de documentos	Anterioridades encontradas para el examen o reportados en el examen de búsqueda(relacionarlos todos)	Reiv. afectadas	RELEVANCIA (requisito que afecta)	FUERON TENIDOS EN CUENTA PARA EL EXAMEN EN LA OFICINA COLOMBIANA	
					SI	NO
EUROPEA	01/06/2013	WO2010108616	1-10	Novedad y Nivel Inventivo	X	
DOCUMENTOS ADICIONALES ENCONTRADOS POR EL EXAMINADOR DE ACUERDO A LOS CRITERIOS DE BÚSQUEDA.						
Metschnikowia fructicola, a New Ascosporic Yeast with Potential forBiocontrol of Postharvest FruitRots						
BÚSQUEDA DE SECUENCIAS						
Número de depósito / patente y N° de secuencia % de identidad						
SEQ ID NO (de la solicitud)	NCBI	The Lens	EMBL-EBI	DDJB	Genome Quest	
	No aplica					

CRITERIOS DE BÚSQUEDA / UNIDAD DE INVENCION (Pantallazos)

No aplica

Metschnikowia fructicola, a New Ascosporic Yeast with Potential for Biocontrol of Postharvest Fruit Rots

CLETUS P. KURTZMAN¹ and SAMIR DROBY²

¹Microbial Genomics and Bioprocessing Research Unit, National Center for Agricultural Utilization Research, Agricultural Research Service, U.S. Department of Agriculture, Peoria, Illinois, USA

²Agricultural Research Organization, The Volcani Center, Ministry of Agriculture, Bet Dagan, Israel

Received June 6, 2001

Summary

A new ascosporic yeast, *Metschnikowia fructicola* (type strain NRRL Y-27328, CBS 8853), is described and was isolated from grapes grown in central Israel. Preliminary tests indicate the new species has biocontrol activity against *Botrytis* rot of stored grapes. Phylogenetic analysis of domain D1/D2 26S rDNA sequences showed *M. fructicola* to be a sister species of *M. pulcherrima*.

Key words: *Metschnikowia fructicola* – new yeast – potential biocontrol yeast – 26S rDNA phylogeny

Introduction

Biological control of postharvest diseases of commodities through use of antagonistic bacteria and yeasts promises an effective alternative to the application of chemical fungicides (CHAND-GOYAL and SPOTS, 1996; DROBY et al., 1991; GULLINO et al., 1991; JANISIEWICZ et al., 1994; LEIBINGER et al., 1997; McLAUGHLIN et al., 1990, 1992; ROBERTS, 1990; STRETCH, 1989; TEIXIDÓ et al., 1998; USALL et al., 2000). The products Biosave-100 and Biosave-110, which are based on the bacterium *Pseudomonas syringae*, are available for postharvest disease control and are now used commercially on pome fruits in the United States (JANISIEWICZ and JEFFERS, 1997). Yeasts have been targeted by many workers as potential antagonists of postharvest diseases because they are naturally occurring on fruits and vegetables, and they exhibit a number of traits that confer greater potential for colonizing wound sites. For example, *Metschnikowia pulcherrima* is widely isolated from apple flowers, buds and fruits and from mature grapes (DAVENPORT, 1976), and has been reported to control *Botrytis cinerea* on apples as well as fungal decays of stored peaches and grapes (DE CURTIS et al., 1996; PIANO et al., 1997). At least two yeast-based products are now commercially available (Aspire™ based on *Candida oleophila*, and Yield Plus based on *Cryptococcus albidus*), and several more are in the advanced stages of commercialization (DROBY et al., 1998; EL GHOUTH et al., 2000).

In the present study, we describe a new species of *Metschnikowia* that was isolated from grapes grown in Israel. This species is of interest because preliminary tests indicate that it, like *M. pulcherrima*, may be effective for biocontrol of storage rot of grapes induced by *Botrytis cinerea* (S. DROBY, unpublished data). The unidentified species was recognized as new by comparing its nucleotide sequence in the species-specific ca. 500–600-nucleotide D1/D2 domain of 26S ribosomal DNA (rDNA) with a database of D1/D2 sequences from all currently recognized ascomycetous yeasts (KURTZMAN and ROBBETT, 1998, and subsequent entries in GenBank). The analysis showed the new taxon to be a sister species of *M. pulcherrima*. From this information, conditions for ascospore germination were predicted and the species was observed to produce needle-shaped ascospores typical of *Metschnikowia*.

Materials and Methods

Organisms, fermentation and assimilation tests, single ascospore isolations

NRRL Y-27328 is the only known strain of the proposed new species and was isolated from table grapes (cultivar “Superior”) grown in the central region of Israel. Specifically, microorganisms were isolated by shaking five grape berries in 10 ml of sterile distilled water for 1 h at 200 rpm on a rotary shaker. The

wash liquid was serially diluted and 3 µl of each dilution were spread on basal yeast agar (BYA) containing: 20 g glucose, 1 g yeast extract, 10 g protease peptone and 15 g agar amended with 250 mg Penicillin G (to suppress growth of bacteria) in 1 L of distilled water. Petri dishes were incubated at room temperature for 4 days and yeast colonies were selected randomly according to color and morphological characteristics. NRRL Y-27328, as well as reference species, are maintained in the ARS Culture Collection (NRRL), National Center for Agricultural Utilization Research, Peoria, Illinois, USA. Fermentation and assimilation tests and procedures for the morphological examination of cultures are as described by YARROW (1998), except that assimilation tubes were agitated on a reciprocal shaker at 25 °C for the 4 week incubation period. The composition of all culture media cited is given by YARROW (1998).

In an effort to determine whether NRRL Y-27328 is homothallic or heterothallic, single ascospores were obtained with a de Fonbrune micromanipulator using standard procedures as described by FOWELL (1969). Asci of the new species are persistent and ascospores were released by digestion of ca. 0.5 mm³

ascosporulating cells for 3 hr at 25 °C in 20 µl of the enzyme preparation Glusulase (Endo Laboratories, Inc., Garden City, NY).

rDNA sequencing and sequence analysis

Methods for nuclear DNA isolation, amplification of the ca. 500 nucleotide 26S rDNA domain D1/D2 by PCR and sequencing with the ABI TaqDyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing kit and the ABI model 377 automated DNA sequencer (PE Biosystems, Foster City, CA) were previously described (KURTZMAN and ROBNETT, 1998).

Sequence data were visually aligned with QEDIT 2.15 (SemWare, Marietta, GA). Phylogenetic relationships were calculated with the maximum-parsimony program of PAUP*4.0b3a (SWOFFORD, 1998), as well as with the neighbor-joining program using the Kimura 2-parameter distance measure. *Schizosaccharomyces pombe* was the designated outgroup species in all analyses. Confidence limits for phylogenetic trees were estimated from bootstrap analysis (1000 replications). The nucleotide sequences for the new species reported here as well as for reference species have been deposited with GenBank under the accession numbers given in Fig. 1.

Results and Discussion

Phylogeny

Phylogenetic analysis of the D1/D2 domain 26S rDNA sequence from NRRL Y-27328 in a dataset of D1/D2 domain sequences from all currently recognized ascomycetous yeasts (KURTZMAN and ROBNETT, 1998, and subsequent entries in GenBank) placed this strain in the *Metschnikowia* clade as a sister species to *M. pulcherrima* (Fig. 1). The two species differ by 2.2% substitutions (11 of 499 shared nucleotide positions), and KURTZMAN and ROBNETT (1998) demonstrated for ascomycetous yeasts that strains differing by more than 1% substitutions in the D1/D2 domain represent separate species. In view of this predicted genetic isolation from known species, NRRL Y-27328 is described as a new species of *Metschnikowia*.

Latin diagnosis of *Metschnikowia fructicola* Kurtzman & Droby, sp. nov.

Asci sphaeropedunculatae sunt et stabiles. Ascosporae aculeatae. In agaro "YM" post dies 3 ad 25 °C, cellulae vegetativae globosae (4.0–10.0 µm) aut ovatae (3.0–7.0 µm × 4.0–8.0 µm), singulae, binae et fasciculatae. In agaro morphologico post dies 7 ad 25 °C, incrementum fuscum pallidum, nitens, butyrosus; centrum colonia sublatum; margo glabro vel undulato. Pseudohyphae et hyphae verae non fiunt. Glucosum et galactosum (infirme) fermentantur. Sucrosum, maltosum, lactosum, raffinose et trehalosum non fermentantur. Assimilantur glucosum, galactosum, L-sorbose, sucrosum, maltosum, cellobiosum, trehalosum, melezitose, D-xylose, N-acetyl-D-glucosaminum, ethanolum, glycerolum, ribitolum, D-mannitolum, D-glucitolum, α-methyl-D-glucosidum, salicinum, D-glucosum, 2-keto-D-glucosum, acidum succinicum, hexadecanum et cadaverinum. Non

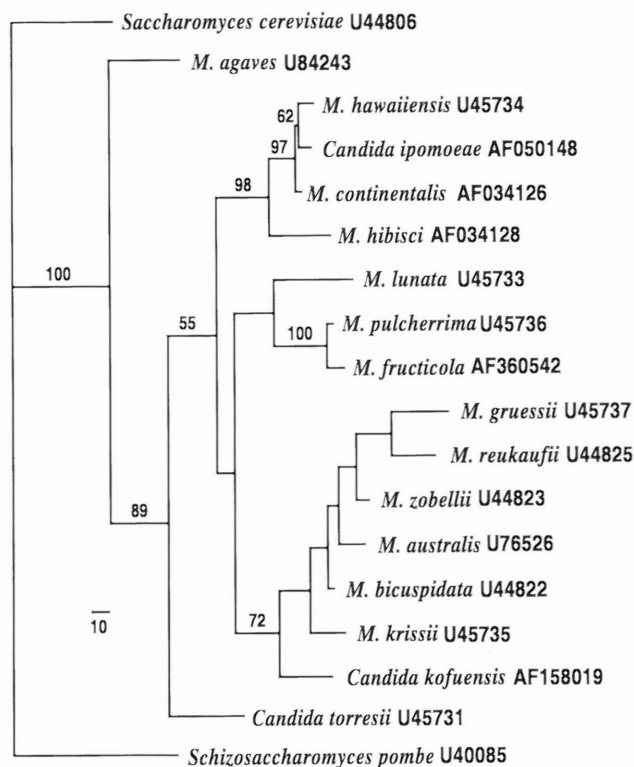


Fig. 1. Phylogenetic tree showing placement of *Metschnikowia fructicola* among species of the genus *Metschnikowia*, related *Candida* species, and reference species *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe* (the outgroup species in the analysis) as represented by one of five most parsimonious trees derived from maximum parsimony analysis of 26S rDNA domain D1/D2. Branch lengths are proportional to nucleotide differences as indicated on the bar. Numbers given at nodes are the percentage of frequencies with which a given branch appeared in 1000 bootstrap replicates. Frequencies under 50% are not given. Tree length, 753; consistency index 0.645; retention index, 0.555; parsimony-informative characters, 183. GenBank accession numbers follow species names. All are type strains (KURTZMAN and ROBNETT, 1998).

assimilantur lactosum, melibiosum, raffinose, inulinum, amyllum solubile, L-arabiosum, D-arabiosum, D-ribosum, L-rhamnosum, D-glucosaminum, methanolum, erythritolum, galactitolum, 5-keto-D-gluconas, saccharatas, DL-acidum lacticum, acidum citricum, inositolum et potassi nitras. Amyllum non formatur. Vitaminae externae ad crescentiam necessaria sunt. Non crescit in medio 10 µg/ml cycloheximido. Gelatinum non liquescit; pellicula non fiunt. Augmentum fiunt in temperatura 37 °C. Typus NRRL Y-27328 (= CBS 8853), designat stirpem typicum. Isolata uva ex Israel, depositata in Collectione Culturarum ARS (NRRL), Peoria, Illinois, U.S.A.

Description of *Metschnikowia fructicola* Kurtzman & Droby, sp. nov.

Growth on YM agar: After 3 d at 25 °C, the cells are spherical (4.0–10.0 µm diam.) to ovoidal (3.0–7.0 µm × 4.0–8.0 µm), and occur singly, in pairs, and in small clusters (Fig. 2A). Budding is multilateral with 1–3 buds per cell. Spherical, heavy-walled chlamydospore-like “pulcherrima” cells are common on YM agar (Fig. 2A) and predominate on 5% malt extract agar. The maroon colored pulcherrima pigment (pulcherrimin) produced by some strains of *M. pulcherrima* was not detected in cultures of *M. fructicola*.

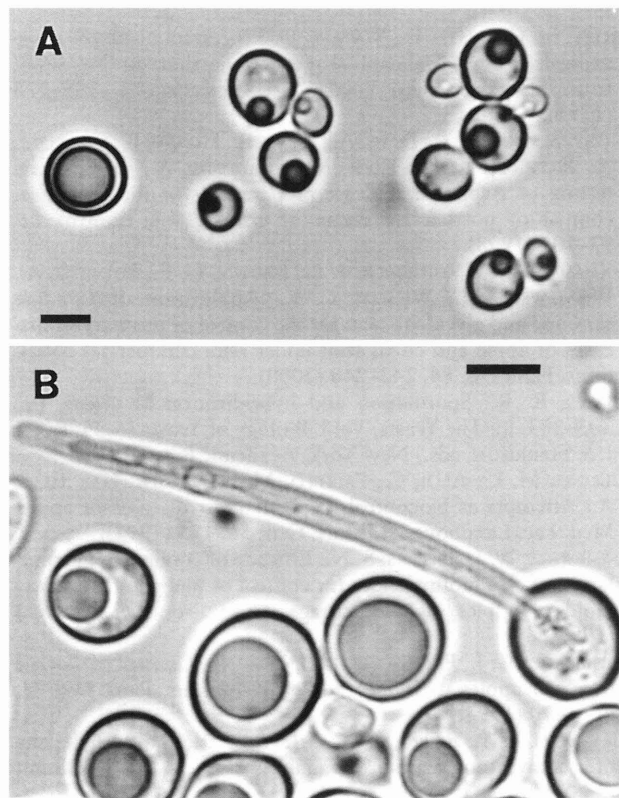


Fig. 2. *Metschnikowia fructicola* NRRL Y-27328. A. Budding cells, 3 d, YM agar, 25 °C. B. Ascus with two acicular ascospores, and chlamydospores (“pulcherrima” cells), 4 wk, RG agar, 15 °C. Bars $\triangleq$ 5 µm.

Growth on the surface of assimilation media: Pellicles are not formed.

Dalmau plate culture on yeast morphology agar: After 7 d at 25 °C, neither pseudohyphae nor true hyphae are formed under the coverglass. Aerobic growth is semi-glistening, white to tannish-white, butyrous, and low convex with a slight central depression. Colony margins may be entire or with occasional small lobes.

Ascosporeulation: Ascospores were produced on RG agar after 3–4 wk at 15 °C. Asci are unconjugated and develop from the “pulcherrima” cells that are abundantly produced, resulting in a sphaeropedunculate shape (Fig. 2B). Asci measure 22–33 µm in length with the spherical portion having a diameter of 5–6 µm, and the peduncles a diameter of 1.5–2.0 µm. Asci produce two acicular ascospores that measure 0.5–0.8 µm × 20–27 µm. Asci are persistent although infrequent ascospores protruded slightly through the tip of the peduncle suggesting some lytic action of the ascus wall. In an effort to determine whether the species is homothallic or heterothallic, single ascospores were isolated by micromanipulation following treatment of asci with the enzyme preparation Glusulase. Unfortunately, none of the 28 single ascospores isolated proved viable.

Physiological tests: Reactions on the fermentation, assimilation and other growth tests commonly used in yeast taxonomy are given in Table 1.

Source of the isolate: NRRL Y-27328 is the only known strain of this species and was isolated from table grapes (cultivar “Superior”) grown in central Israel.

Type: NRRL Y-27328 (= CBS 8853) is preserved as a lyophilized preparation in the Agricultural Research Service Culture Collection (NRRL), Peoria, Illinois.

Etymology: The species name *fructicola* refers to isolation of the type strain from the fruit of the grape plant. It is anticipated that the natural habitat of *M. fructicola* may include the fruit of other plants as is the case for its sister species *M. pulcherrima*.

Diagnostic separation of *M. fructicola* from other species of *Metschnikowia*

The genus *Metschnikowia* is comprised of 12 known species (MILLER and PHAFF, 1998; LACHANCE et al., 1998), and represents one of the most phylogenetically divergent ascomycetous yeast genera known (KURTZMAN and ROBNETT, 1998). Diagnostic separation of species from growth responses on various carbon sources and other tests is difficult because of the considerable similarity of assimilation reactions among species. *Metschnikowia fructicola* and *M. pulcherrima* give the same responses on the standard growth tests used in yeast taxonomy. Morphology provides some resolution of species. Ascus formation by differentiation of large, thick-walled refractile chlamydospores separates *M. fructicola*, *M. lunata* and *M. pulcherrima* from other members of the genus, and the formation of lunate vegetative cells distinguishes *M. lunata* from *M. fructicola* and *M. pulcherrima*. *Metschnikowia fructicola* forms no pseudohyphae in contrast to the often profuse formation of rudi-

Table 1. Responses of *Metschnikowia fructicola* on fermentation, assimilation and other growth tests^{1,2}.

Fermentation:					
Glucose	+	Maltose	–	Trehalose	–
Galactose	w	Lactose	–		
Sucrose	–	Raffinose	–		
Assimilation:					
Glucose	+	L-Arabinose	–	α-Methyl-D-glucoside	+
Galactose	+	D-Arabinose	–	Salicin	+
L-Sorbose	+	D-Ribose	–	D-Gluconate	+
Sucrose	+	L-Rhamnose	–	2-Keto-D-gluconate	+
Maltose	+	D-Glucosamine	–	5-Keto-D-gluconate	–
Cellobiose	+	N-Acetyl-D-glucosamine	+	Saccharate	–
Trehalose	+	Methanol	–	DL-Lactate	–
Lactose	–	Ethanol	+	Succinate	+
Melibiose	–	Glycerol	+	Citrate	–
Raffinose	–	Erythritol	–	Inositol	–
Melezitose	+	Ribitol	+	Hexadecane	+
Inulin	–	Galactitol	–	Nitrate	–
Soluble Starch	–	D-Mannitol	+	Vitamin-free	–
D-Xylose	+	D-Glucitol	+		
Additional growth tests:					
10% NaCl/5% glucose	+	Cycloheximide, 10 µg/ml	–	Gelatin Liquefaction	–
Starch formation	–	Cadaverine	+	Growth at 37 °C	+

¹ Reactions from NRRL Y-27328.² – negative; + positive; w – weak.

mentary pseudohyphae under anaerobic conditions by *M. pulcherrima*. However, this is a weak diagnostic character and definitive separation of the two species appears to require gene sequence comparisons, a phenomenon increasingly seen for the yeasts as well as for other microorganisms.

Acknowledgments

Thanks are given to Christie J. Robnett for determining the rDNA sequence of the new species, to Eleanor Basehoar-Powers for conducting fermentation and assimilation tests, and to Larry W. Tjarks for operation of the nucleic acid sequencer.

Names of equipment and chemical suppliers are necessary to report factually on experimental methods; however, the USDA neither guarantees nor warrants the standard of the products, and the use of the name by USDA implies no approval of the product to the exclusion of others that may also be suitable.

References

- CHAND-GOYAL, T., SPOTS, R. A.: Control of postharvest pear diseases using natural saprophytic yeast colonists and their combination with low doses of thiabendazole. *Postharvest Biol. Technol.* 7, 51–64 (1996).
- DAVENPORT, R. R.: Distribution of yeast and yeast like organisms from aerial surfaces of developing apples and grapes, pp. 325–374. In: *Microbiology of Aerial Plant Surfaces* (C. H. DICKINSON, T. F. PREECE, eds.) London, Academic Press 1976.
- DE CURTIS, F., TORRIANI, S., ROSSI, F., DE CICCIO, V.: Selection and use of *Metschnikowia pulcherrima* as a biological control agent for postharvest rots of peaches and table grapes. *Ann. Microbiol. Enzymol.* 46, 45–55 (1996).
- DROBY, S., CHALUTZ, E., WILSON, C. L.: Antagonistic microorganisms as biological control agents of postharvest diseases of fruits and vegetables. *Postharvest News Inf.* 2, 169–173 (1991).
- DROBY, S., COHEN, L., DAUS, A., WEISS, B., HOREV, B., CHALUTZ, E., KATZ, H., KEREN-TZUR, M., SHACHNAI, A.: Commercial testing of Aspire™: A yeast preparation for the biological control of postharvest decay of citrus. *Biol. Control* 12, 97–101 (1998).
- EL GHAOUTH, A., SMILANICK, J. L., BROWN, G. E., IPPOLITO, A., WISNIEWSKI, M., WILSON, C. L.: Application of *Candida saitoana* and glycolchitosan for the control of postharvest diseases of apple and citrus fruit under semi-commercial conditions. *Plant Dis.* 84, 243–248 (2000).
- FOWELL, R. R.: Sporulation and hybridization of yeasts, pp. 303–383. In: *The Yeasts, Vol I. Biology of Yeasts* (A. H. ROSE, J. S. HARRISON, eds.) New York, Academic Press 1969.
- GULLINO, M. L., ALOI, C., PALITTO, M., BENZI, D., GARIBALDI, A.: Attempts at biocontrol of postharvest diseases of apple. *Med. Fac. Landbouw. Rijksuiv. Gent* 56, 195 (1991).
- JANISIEWICZ, W. J., JEFFERS, S. N.: Efficacy of commercial formulation of two biofungicides for control of blue mold and gray mold of apples in cold storage. *Crop Prot.* 16, 629–633 (1997).
- JANISIEWICZ, W. J., PETERSON, D. L., BORS, B.: Control of storage decay of apples with *Sporobolomyces roseus*. *Plant Dis.* 78, 466–470 (1994).
- KURTZMAN, C. P., ROBNETT, C. J.: Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie Leeuwenhoek* 73, 331–371 (1998).
- LACHANCE, M. A., ROSA, C. A., STARMER, W. T., SCHLAG-EDLER, B., BARKER, J. S. F., BOWLES, J. M.: *Metschnikowia continentalis* var. *borealis*, *Metschnikowia continentalis* var. *continentalis*, and *Metschnikowia hibisci*, new heterothallic haploid

- yeasts from ephemeral flowers and associated insects. Can. J. Microbiol. 44, 279–288 (1998).
- LEIBINGER, W., BREUKER, B., HAHN, M., MENDEGEN, K.: Control of postharvest pathogens and colonization of apple surface by antagonistic microorganisms in the field. Phytopathology 87, 1103–1110 (1997).
- MCLAUGHLIN, R. J., WILSON, C. L., DROBY, S., BEN-ARIE, R., CHALUTZ, E.: Biological control of postharvest diseases of grape, peach and apple with the yeast *Kloeckera apiculata* and *Candida guilliermondii*. Plant Dis. 76, 470–473 (1992).
- MCLAUGHLIN, R. J., WISNIEWSKI, M. E., WILSON, C. L., CHALUTZ, E.: Effect of inoculum concentration and salt solutions on biological control of postharvest diseases of apple with *Candida* sp. Phytopathology 80, 456–461 (1990).
- MILLER, M. W., PHAFF, H. J.: *Metschnikowia* Kamienski, pp. 256–267. In: The Yeasts, A Taxonomic Study, 4th edn. (C. P. KURTZMAN, J. W. FELL, eds.) Amsterdam, The Netherlands, Elsevier Science B. V. 1998.
- PIANO, S., NEYROTTI, V., MIGHELI, M., GULLINO, M. L.: Biocontrol capability of *Metschnikowia pulcherrima* against *Botrytis* postharvest rot of apple. Postharvest. Biol. Technol. 11, 131–140 (1997).
- ROBERTS, R. G.: Postharvest biological control of gray mold of apple by *Cryptococcus laurentii*. Phytopathol. 80, 526–530 (1990).
- STRETCH, A. W.: Biological control of blueberry and cranberry fruit rots (*Vaccinium corymbosu* L. and *Vaccinium macrocarpon* Ait.). Acta Hort. 241, 301–306 (1989).
- SWOFFORD, D. L.: PAUP*4.0: Phylogenetic analysis using parsimony. Sunderland, Massachusetts, Sinauer Associates, 1998.
- TEIXIDÓ, N., VIÑAS, I., USALL, J., MAGAN, N.: Control of blue mold of apples by preharvest application of *Candida sake* grown in media with different water activity. Phytopathology 88, 960–964 (1998).
- USALL, J., TEIXIDÓ, N., FONS, E., VIÑAS, I.: Biological control of blue mold on apple by a strain of *Candida sake* under several controlled atmosphere conditions. Int. J. Food Microbiol. 58, 83–92 (2000).
- YARROW, D.: Methods for the isolation, maintenance and identification of yeasts, pp. 77–100. In: The Yeasts, A Taxonomic Study, 4th edn. (C. P. KURTZMAN, J. W. FELL, eds.) Amsterdam, The Netherlands, Elsevier Science B. V. 1998.

Corresponding author:

C. P. KURTZMAN, Microbial Genomics and Bioprocessing Research Unit, National Center for Agricultural Utilization Research, ARS, USDA, 1815 N. University Street, Peoria, IL 61604-3999 USA
Tel.: ++1-309-681-6561; Fax: ++1-309-681-6672;
e-mail: kurtzman@mail.ncaur.usda.gov

**Supplied by U.S. Dept. of Agriculture
National Center for Agricultural
Utilization Research, Peoria, Illinois**