

Industria y
SUPERINTE



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-105818-00020-0000

Fecha: 2016-06-09 16:43:27 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 851 DIVISIONAL Folios: 27

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO7



No. 16-151611-00000-0000

Fecha: 2016-06-09 16:43:28 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 87

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL
DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

SOLICITUD DIVISIONAL
DE PATENTE DE
INVENCION

TITULO: COMPOSICIONES BIOACTIVAS DE CHROMOBACTERIUM Y
METABOLITOS.

SOLICITANTE: MARRONE BIO INNOVATIONS, INC.

EXPEDIENTE No. 13-105.818

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

APODERADO: CARLOS R. OLARTE

BOGOTÁ: 09 de junio de 2016

13-105818

P2013/000075A

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

CONVERSIÓN, DIVISIÓN Y FUSIÓN DE SOLICITUDES

P2013/000075A

1. Identificación del Trámite

☐ Conversión

☒ División

☐ Fusión

☒ Patente de Invención

☐ Patente de Modelo de Utilidad

2. Datos del solicitante

☐ Persona Natural

☒ Persona Jurídica

MARRONE BIO INNOVATIONS, INC.

Nombre o denominación / Nombre o razón social

Nombre del representante legal

Tipo de empresa

☐ Micro☐ Pequeña☐ Mediana☐ Otra

Documento de Identificación

☐ C.C.☐ C.E.☐ NIT☐ Otro

Número

Nacionalidad/País de constitución	Dirección del titular	Ciudad
Estado Unidos	2121 Second Street Suite 107B, Davis, CA 95618	California
Dirección electrónica	No. Fax	Número telefónico
office@olartemoure.com	6017799	6017700

☐ 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 apoderado:

CARLOS R. OLARTE

79.782.747 Bta

74.295

Apellidos y Nombre

Documento de identificación

Tarjeta profesional

Dirección y domicilio	Dirección del titular	Ciudad
Carrera 5 No 34-03 Bogotá D.C.	Cra 5 No. 34-03	Bogotá
Dirección electrónica	No. Fax	Número telefónico
office@olartemoure.com	601-7799	601-7700

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 de poder general

4. Datos del trámite:

CONVERSION

Expediente No.

De:

A:

DIVISION

Expediente No.

13-105.818

No. de divisionales

1

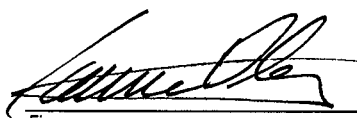
FUSION

Expediente No.

Expediente No.

5. Comprobante de Pago No	Fecha	D	M	A
---------------------------	-------	---	---	---

6. Anexos	
☒	Comprobante de pago de la tasa para la presentación de la corrección y/o modificación
☒	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
☒	Copia de la solicitud y sus anexos en formato magnético

7. Firma	
CARLOS R. OLARTE	
Nombre y apellidos	Firma
79.782.747	74.295
C.C.	Tarjeta Profesional

OLARTEMOURE

OLARTE MOURE & ASOCIADOS LTDA.



Espacio reservado para el adhesivo de radicación.

PETITORIO - FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DIVISIONAL DE PATENTE PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL

P2013/000075A

SOLICITUD DE:

1

☒

Patente de Invención.

☐

Patente de Modelo de Utilidad.

☒

Capítulo I.

☐

Capítulo II.

2

**SOLICITANTE
(71)**

Nombre: MARRONE BIO INNOVATIONS, INC.

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

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

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

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐ **NIT** ☐

C.E. ☐ **Otro** ☐

Cual _____

Número _____

**REPRESENTANTE
O APODERADO**

Nombre: CARLOS R. OLARTE

Dirección: Carrera 5 No. 34-03 Bogotá

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

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒ **NIT** ☐

C.E. ☐ **Otro** ☐

Cual _____

Número 79.782.747Bta
TP 74.295

**INVENTOR (ES)
(72)**

Nombre: VER PAGINA ADJUNTA.

Dirección: VER PAGINA ADJUNTA

Nacionalidad o Domicilio: VER PAGINA ADJUNTA.

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/US2011/057541 Fecha Octubre 24, 2011

Publicación Internacional No. WO 2012/061082 A3 Fecha Mayo 10, 2012

6

Título (54) COMPOSICIONES BIOACTIVAS DE CHROMOBACTERIUM Y METABOLITOS.

Clasificación Internacional (51) A01N 63/02; C07K 5/08; C07K 7/06; C07K 7/64; A01P 7/00.

Prioridad

SI ☒ **NO** ☐

(33) País de Origen

US

(32) Fecha

Octubre 25, 2010

(31) Número de Solicitud

61/406,569

9

Comprobante de pago No. _____ **Fecha** _____

10

ANEXOS

☒

Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.

☒

Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.

☒

Poderes, si fuere el caso.

☐

Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.

☐

Declaraciones. Bajo la regla 4.17. (ii) del PCT.

☒

Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).

☒

Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).

☐

Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).

☐

Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.

☐

De ser el caso, copia del contrato de acceso.

☐

De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.

☐

De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.

☐

Arte final 12 x 12.

☐

De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.

☐

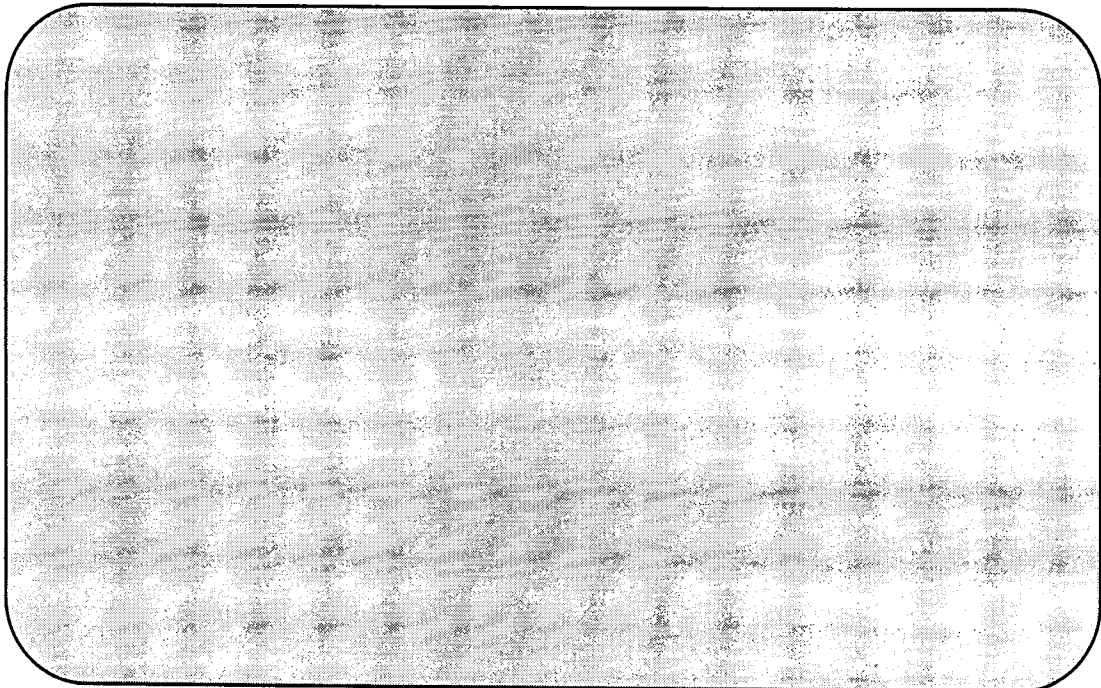
De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.

☒

Otros. Búsqueda Internacional.

11

FIGURA CARACTERÍSTICA:



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: CARLOS R. OLARTE

FIRMA:

C.C. 79. 782.747Bta T.P. 74.295



LISTA DE INVENTORES

PCT/US2011/057541

Ratnakar ASOLKAR

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

Huazhang HUANG

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

Marja KOIVUNEN

P.O.Box 2277
Davis CA 95617
Estados Unidos de América
Nacionalidad: Finlandesa

Pamela MARRONE

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

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -



RECIBO DE CAJA

No. 16 - 0051901

Bogotá D.C., Mayo 25 de 2016 - 16:22:51

RECIBIDO DE : OLARTE MOURE & ASOCIADOS

NI 830.122.870

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	601322665	24/05/2016	11.431.00
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	601322676	24/05/2016	11.419.569.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
2 50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION PATENTE UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INICIALES	40.000.00	80.000.00
			\$80.000.00

SON: **OCHENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-105818-00020-0000

Fecha: 2016-06-09 16:43:27 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 851 DIVISIONAL Folios: 27

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO7



No. 16-151611-00000-0000

Fecha: 2016-06-09 16:43:28 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 27

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

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

Mayo 25 de 2016 - 16:22:54

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	TESTIGO DOCUMENTAL	Folio: <u>7</u>
--	-----------------------------	-----------------

Dependencia Jerárquica: DEL PROPIEDAD INDUSTRIAL		Código	2000
Dependencia Productora: GRUPO DE NUEVAS CREACIONES		Código	2020
Tipo de Radicación: Entrada: ☒ Salida: ☐ Traslado: ☐ Convenio: ☐			
Radicador:			
DESCRIPCIÓN DE LA PRUEBA			
Nombre de la Serie / Subserie:		Código:	
Expediente: <u>16-151611-0</u> <u>13-105818-20</u>		Solicitante / <i>Quejoso / Demandante / otros.</i>	
Prueba excluida:			
Nº. de Pruebas excluidas:			
Fecha de emisión de la Prueba:			
UBICACIÓN DE LA PRUEBA EN LA SECCIÓN DE MATERIAL GRÁFICO			
Nº. de bloque:		Otras especificaciones:	
Nº. de rodante:			
Nº. de estante:			
Nº. de archivador:			
Nº. de entrepaño:			
Nº. de gaveta:			
Nº. de caja:			
IMPORTANTE: - El material gráfico o especial que se encuentra dentro o anexo a las unidades documentales o expedientes, debe extraerse y llevarse a aquella sección del archivo que se haya dispuesto para conservar documentos en distintos formatos. - Entiéndase por material gráfico todos aquellos dibujos, croquis, mapas, planos, fotografías, ilustraciones, pictografías, códigos, prensa, objetos tridimensionales, entre otros.			
Observaciones:		Unidad de Conservación ☐ Bolsa ☐ Caja ☐ Libro ☐ Sobre ☐ Tomo ☐ Otro	
<u>El cd contiene 12 pdfs</u> <u>Procedidos y cargados al</u> <u>sistema.</u>		Soporte Documental ☐ CD ☐ Disquete ☐ DVD ☐ Folleto ☐ Periódico ☐ Plano ☐ Publicación Periódica ☐ USB ☐ Otro	

	Espacio reservado para el adhesivo de radicación
---	--

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
CONVERSIÓN, DIVISIÓN Y FUSIÓN DE SOLICITUDES P2013/000075A

1. Identificación del Trámite

☐ Conversión	☒ División	☐ Fusión
☒ Patente de Invención		
☐ Patente de Modelo de Utilidad		

2. Datos del solicitante

☐ Persona Natural	☒ Persona Jurídica
--	--

MARRONE BIO INNOVATIONS, INC.

Nombre o denominación / Nombre o razón social

Nombre del representante legal

Tipo de empresa ☐ Micro ☐ Pequeña ☐ Mediana ☐ Otra

Documento de Identificación ☐ C.C. ☐ C.E. ☐ NIT ☐ Otro Número

Nacionalidad/País de constitución	Dirección del titular	Ciudad
Estado Unidos	2121 Second Street Suite 107B, Davis, CA 95618	California
Dirección electrónica	No. Fax	Número telefónico
office@olartemoure.com	6017799	6017700

☐	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 apoderado:

CARLOS R. OLARTE	79.782.747 Bta	74.295
Apellidos y Nombre	Documento de identificación	Tarjeta profesional

Dirección y domicilio	Dirección del titular	Ciudad
Carrera 5 No 34-03 Bogotá D.C.	Cra 5 No. 34-03	Bogotá
Dirección electrónica	No. Fax	Número telefónico
office@olartemoure.com	601-7799	601-7700

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 de poder general

4. Datos del trámite:

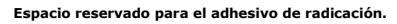
CONVERSION Expediente No. De: A:	DIVISION Expediente No. 13-105.818 No. de divisionales 1	FUSION Expediente No. Expediente No.
--	--	--

5. Comprobante de Pago No	_____	Fecha	<table><tr><td>D</td><td>M</td><td>A</td></tr></table>	D	M	A
D	M	A				

6. Anexos						
<table><tr><td>X</td></tr><tr><td>X</td></tr><tr><td></td></tr><tr><td>X</td></tr><tr><td>X</td></tr></table>	X	X		X	X	Comprobante de pago de la tasa para la presentación de la corrección y/o modificación 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 Copia de la solicitud y sus anexos en formato magnético
X						
X						
X						
X						

7. Firma					
<table><tr><td>CARLOS R. OLARTE</td></tr><tr><td>Nombre y apellidos</td></tr></table>	CARLOS R. OLARTE	Nombre y apellidos	<table><tr><td>_____</td></tr><tr><td>Firma</td></tr></table>	_____	Firma
CARLOS R. OLARTE					
Nombre y apellidos					

Firma					
<table><tr><td>79.782.747</td></tr><tr><td>C.C.</td></tr></table>	79.782.747	C.C.	<table><tr><td>74.295</td></tr><tr><td>Tarjeta Profesional</td></tr></table>	74.295	Tarjeta Profesional
79.782.747					
C.C.					
74.295					
Tarjeta Profesional					



P2013/000075A

1

X

11

2

C.C. NIT

C.E. **Otro**

C.C. ☒ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

5

6

SI	X	NO	
-----------	----------	-----------	--

US

Octubre 25, 2010

61/406,569

9

Fecha _____

10

ANEXOS

☒

Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.

☒

Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.

☒

Poderes, si fuere el caso.

☐

Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.

☐

Declaraciones. Bajo la regla 4.17. (ii) del PCT.

☒

Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).

☒

Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).

☐

Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).

☐

Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.

☐

De ser el caso, copia del contrato de acceso.

☐

De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.

☐

De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.

☐

Arte final 12 x 12.

☐

De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.

☐

De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.

☒

Otros. Búsqueda Internacional.

11

FIGURA CARACTERÍSTICA:



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: CARLOS R. OLARTE

FIRMA: _____
C.C. 79. 782.747Bta T.P. 74.295

LISTA DE INVENTORES

PCT/US2011/057541

Ratnakar ASOLKAR

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

Huazhang HUANG

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

Marja KOIVUNEN

P.O.Box 2277
Davis CA 95617
Estados Unidos de América
Nacionalidad: Finlandesa

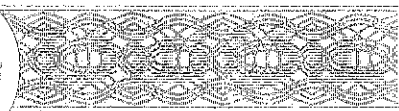
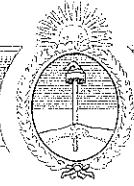
Pamela MARRONE

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

96.758



ACTUACION NOTARIAL
LEY 461



ISABEL MARTINEZ DIEGO
MATRICULA 4452
ESCRIBANA

N 014634245

CECBA - LEY 404 GCBA
LEGALIZACION
120202 056087



12:22:32

02/02/2012

CECBA - LEY 404 GCBA
APOSTITILA
120202 124128



12:22:32

02/02/2012

FOLIO 41. PRIMERA COPIA. SUSTITUCION DE MANDATO.- DAGMAR MES-

SERER POR "MARRONE BIO INNOVATIONS, INC." A CARLOS REINALDO

OLARTE Y OTRO.- ESCRITURA NUMERO DIECISIETE. En la Ciudad de

Buenos Aires, Capital de la República Argentina, a dos de

febrero del año dos mil doce, ante mi, escribana autorizante,

comparece doña Dagmar MESSERER, soltera, mayor de edad, con

documento nacional de identidad n° 20.383.892, vecina de esta

Ciudad y de mi conocimiento, doy fe, así como que dice: Que

SUSTITUYE a favor de los señores CARLOS REINALDO OLARTE y/o

JUAN GUILLERMO MOURE PEREZ, para que lo ejerzan conjunta, se-

parada e indistintamente, el mandato otorgado por "MARRONE BIO

INNOVATIONS, INC." domiciliada en 2121 Second St. Suite 107B,

Davis, CA 95618, Estados Unidos de América, transcripto por

escritura n° 15 de fecha 1 de febrero de 2012, ante mi, al fo-

lio 35 de este mismo Registro, que en primera copia tengo a la

vista, doy fe, y copiada dice: "FOLIO 35. PRIMERA COPIA.

TRANSCRIPCION DE MANDATO.- "MARRONE BIO INNOVATIONS, INC." A

GERARDO MESSERER Y OTROS. ESCRITURA QUINCE. En la Ciudad de

Buenos Aires, Capital de la República Argentina, a primero de

febrero del año dos mil doce, ante mi, escribana autorizante,

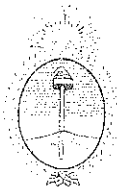
comparece doña Dagmar MESSERER, soltera, mayor de edad, con

documento nacional de identidad n° 20.383.892, vecina de esta

Ciudad y de mi conocimiento, doy fe, así como que dice: Que

para su TRANSCRIPCION en el protocolo de este Registro, me en-

trega un poder otorgado por MARRONE BIO INNOVATIONS, INC. do-



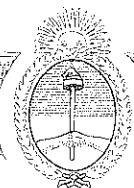
N 014634245

miciliada en 2121 Second St. Suite 107B, Davis, CA 95618, Es- 26
tados Unidos de América, el que en su original con su corres- 27
pondiente traducción y legalización, tengo a la vista, doy fe, 28
y copiado dice: "PODER. Los abajo firmante/s Marrone Bio Inno- 29
vations, Inc. domiciliados en 2121 Second St. Suite 107B, Da- 30
vis, CA 95618, Estados Unidos de América, declaran por el pre- 31
sente otorgar a Gerardo MESSERER y/o Dagmar MESSERER y/o Karen 32
MESSERER y/o MOELLER & CO. S.A. indistintamente poder general 33
amplio y suficiente para recabar de las autoridades argenti- 34
nas, sud y centroamericanas así como mexicanas que correspon- 35
dan, la obtención de patentes de invención, el registro y la 36
renovación de marcas y modelos y/o derechos de propiedad inte- 37
lectual y/o nombres de dominio, a cuyo efecto los faculta/n 38
para llevar a cabo ante dichas autoridades todas las gestiones 39
necesarias al objeto indicado, presentar solicitudes, formular 40
descripciones, oposiciones, protestos, declaraciones, apela- 41
ciones y reclamos, oblar impuestos, justificar explotaciones, 42
solicitar testimonios, aceptar transferencias, recibir docu- 43
mentos y valores, percibir y hacer cuanto fuere necesario ante 44
las autoridades administrativas de cualquier orden. Por otra 45
parte, les confieren mandato para que en su nombre y represen- 46
tación puedan iniciar y proseguir cualquier juicio que actual- 47
mente los que suscriben tengan o en el futuro tuvieran en la 48
República Argentina, en Sudamerica, Centroamérica y México, 49
con motivo de su nombre, marcas de fábrica o de comercio, pa- 50



ACTUACION NOTARIAL

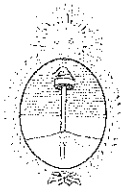
LEY 404



ISABEL MARTINEZ DIEGO
MATRICULA 4052
ESCRIBANA

N 014634246

1 tentes de invención y modelos y/o de sus derechos de propiedad
2 intelectual que actualmente posean o adquieran en lo sucesivo,
3 promover juicios de cualquier jurisdicción, criminales, co-
4 rreccionales, civiles o comerciales contra los falsificadores,
5 usurpadores o imitadores y contra los tenedores de artículos
6 que infrinjan su nombre, marcas o patentes de invención, se-
7 guir los juicios por oposición u otros en que fueran parte co-
8 mo actores o demandados, defender el nombre, las marcas, pa-
9 tentes y modelos y/o derechos de propiedad intelectual y/o
10 nombres de dominio, haciendo las protestas del caso o diciendo
11 de nulidad. Al efecto, podrán presentarse con escritos, quere-
12 llas, pedidos, y lo que fuere necesario ante cualquier autori-
13 dad judicial, presentar testigos, documentos y demás justifi-
14 cativos, rendir pruebas de cualquier especie, pedir nombra-
15 mientos de peritos, pedir y absolver posiciones, asistir a
16 juicios verbales, declinar y prorrogar de jurisdicción, ta-
17 char, recusar, apelar, transar, someter a arbitraje o media-
18 ción, hacer renunciaciones, exigir y dar cauciones, pedir embargos
19 preventivos, definitivos o inhibiciones y su levantamiento,
20 pedir la venta de los bienes de los deudores, solicitar y ob-
21 tener el cumplimiento de sentencias, prestar juramentos, decir
22 de nulidad, desistir, percibir, otorgar recibos y en general
23 practicar todos los actos y diligencias que sean precisos al
24 desempeño de este mandato. Podrán asimismo sustituir el pre-
25 sente poder en todo o en parte. En relación a Brasil, este po-

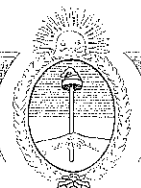


N 014634246

der incluye recibir citaciones, intimaciones, notificaciones 26
en dicho país conforme el artículo 217 de la Ley Brasileira 27
9279/96 y/o hacer substituciones a otros abogados / agentes 28
brasileros con facultad para recibir dichas citaciones, inti- 29
maciones, notificaciones. Dado y firmado en Davis, CA on 16th 30
day of November, 2011. Sigue una firma ilegible, Pamela Marro- 31
ne, CEO and Founder, Marrone Bio Innovations, Inc." "TRADUC- 32
CIÓN PUBLICA. Consta PODER de Marrone Bio Innovations, Inc con 33
dirección en 2121 Second St. Suite 107B, Davis, CA 95618, Es- 34
tados Unidos de América. Pamela Marrone, Gerente General y 35
fundadora, Marrone Bio Innovations, Inc. Firma ilegible. DO- 36
CUMENTO ADJUNTO. ESTADO DE CALIFORNIA. SECRETARIA DE ESTADO. 37
APOSTILLA. (Convención de la Haya del 5 de Octubre 1961). 1. 38
País. ESTADOS UNIDOS DE AMERICA. Este documento público: 2.- 39
ha sido firmado por Laura Christensen. 3. en su carácter de 40
Notario Público, Estado de California. 4. lleva el sello de 41
Laura Christensen, Notario Publico, Estado de California. Cer- 42
tificado en: 5. Sacramento, California. 6. el 15 de Diciembre 43
2011. 7. por Secretario de Estado. Estado de California. 8. 44
Nro. 33296. 9.- Sello. Hay un sello que lee El gran sello del 45
Estado de California. 10.- Firma: Hay una firma ilegible. Esta 46
Apostilla solo certifica la autenticidad de la firma y el car- 47
go del funcionario público que ha firmado el documento público 48
y, en caso de que corresponda, la identidad del sello o estam- 49
pa que lleva el documento público. Esta Apostilla no certifica 50

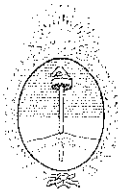


ACTUACION NOTARIAL
LEY 404

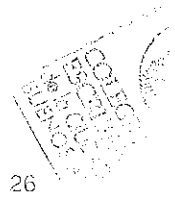


N 014634247

1 la autenticidad del documento subyacente para el cual fue emi-
2 tido. Esta Apostilla no es válida para uso en cualquier lugar
3 de Estados Unidos de América, sus territorios o posesiones.
4 Para verificar la emisión de esta Apostilla, remitirse a
5 www.sos.ca.gov/business/notary/apostille-search/ DOCUMENTO AD-
6 JUNTO. ADMISIÓN. Estado De California. Condado de (en manus-
7 crito) Yolo. El (en manuscrito) 16 de Noviembre 2011, ante mí,
8 (en manuscrito) Laura Christensen, Notario Público. Compareció
9 personalmente PAMELA MARRONE (en manuscrito), quien ha probado
10 satisfactoriamente ante mí ser la persona cuyo nombre se sus-
11 cribe con la pertinente evidencia y confirmó haber firmado en
12 su capacidad autorizada y que a través de su firma en el ins-
13 trumento la persona o la entidad en representación de quién ha
14 actuado, ejecuto el documento. Certifico bajo pena de falso
15 testimonio bajo las leyes del Estado de California que lo que
16 antecede es verdadero y correcto. FIRMO Y ESTAMPO SELLO OFI-
17 CIAL. Sello que lee Laura Christensen. Matricula 1880375, No-
18 tario Público, Condado de Yolo, Matricula vence 15 Marzo 2014.
19 Firma ilegible. OCIONAL. Descripción del documento adjunto:
20 PODER. Fecha del documento. 16 de Noviembre 2011. Número de
21 páginas 1. Otros firmantes del mencionado arriba: Capacidad
22 del firmante. Nombre del firmante Pamela Marrone. Gerente Ge-
23 neral. ES TRADUCCION FIEL DEL DOCUMENTO ADJUNTO QUE HE TENIDO
24 ANTE MI, DEL IDIOMA INGLES AL CASTELLANO, Y AL CUAL ME REMITO
25 A LOS 15 DIAS DEL MES DE DICIEMBRE DE DOS MIL ONCE. Sigue una



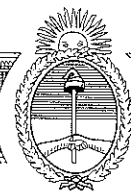
N 014634247



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

ISABEL MARTINEZ DIEGO
MATRICULA 4452
ESCRIBANA

Isabel Martinez Diego



L 010629434

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

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

Buenos Aires, Jueves 2 de Febrero de 2012




ESC. LUZBELIA BILLORDO
COLEGIO DE ESCRIBANOS
CONSEJERA



REPÚBLICA ARGENTINA
MINISTERIO *de*
RELACIONES EXTERIORES
COMERCIO INTERNACIONAL Y CULTO

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

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



10. Firma

Esc. NATALIA R. IAPALUCCI
COLEGIO DE ESCRIBANOS
CONSEJERA

[illegible]



(51) International Patent Classification:

A01N 63/02 (2006.01) C07K 7/64 (2006.01)
C07K 5/08 (2006.01) A01P 7/00 (2006.01)
C07K 7/06 (2006.01)

(21) International Application Number:

PCT/US2011/057541

(22) International Filing Date:

24 October 2011 (24.10.2011)

(25) Filing Language:

English

(26) Publication Language:

English

(30) Priority Data:

61/406,569 25 October 2010 (25.10.2010) US

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

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): **ASOLKAR, Ratnakar** [IN/US]; 4005 Cowell Blvd., Davis, CA 95618 (US). **HUANG, Huazhang** [CN/US]; 2674 Briscoe Place, Woodland, CA 95776 (US). **KOIVUNEN, Marja** [FI/US]; PO Box 2277, Davis, CA 95617 (US). **MAR-RONE, Pamela** [US/US]; 3333 Victoria Place, Davis, CA 95616 (US).

(74) Agent: **AGRIS, Cheryl H.**; The Law Offices of Cheryl H. Agris, PC, PO Box 8495, Pelham, NY 10803 (US).

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

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

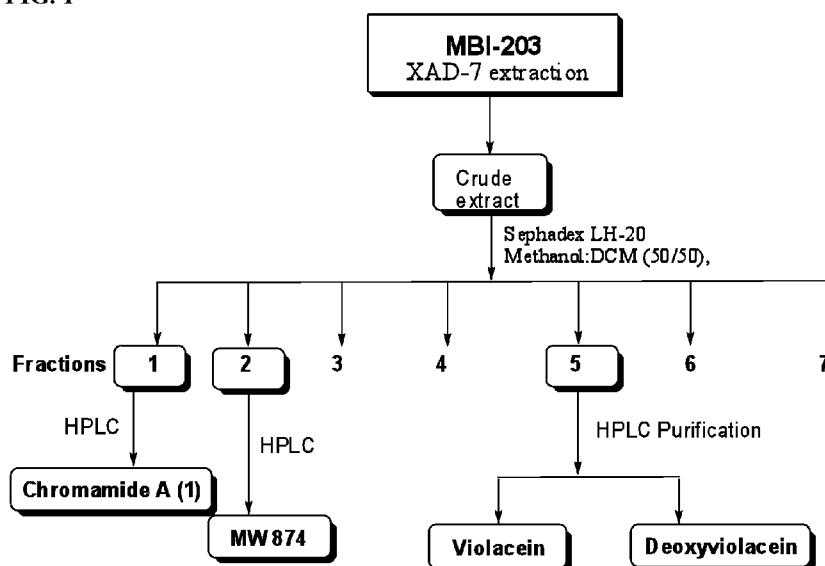
Declarations under Rule 4.17:

- as to applicant's entitlement to apply for and be granted a patent (Rule 4.17(ii))
- as to the applicant's entitlement to claim the priority of the earlier application (Rule 4.17(iii))

[Continued on next page]

(54) Title: **CHROMOBACTERIUM** BIOACTIVE COMPOSITIONS AND METABOLITES

FIG. 1



(57) Abstract: Provided are bioactive compounds and metabolites derived from *Chromobacterium* species culture responsible for controlling pests, compositions containing these compounds, methods for obtaining these compounds and methods of using these compounds and compositions for controlling pests.



Published:

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

CHROMOBACTERIUM BIOACTIVE COMPOSITIONS AND METABOLITES

5 **TECHNICAL FIELD**

Disclosed herein are bioactive compositions and metabolites derived from *Chromobacterium* and particularly *Chromobacterium substugae* culture responsible for controlling pests as well as their methods of use for controlling pests.

10 **BACKGROUND ART**

Natural products are substances produced by microbes, plants, and other organisms. Microbial natural products offer an abundant source of chemical diversity, and there is a long history of utilizing natural products for pharmaceutical purposes. Despite the emphasis on natural products for human therapeutics, where more than 50% are derived from natural products, only 11% of pesticides are derived from natural sources. Nevertheless, natural product pesticides have a potential to play an important role in controlling pests in both conventional and organic farms. Secondary metabolites produced by microbes (bacteria, actinomycetes and fungi) provide novel chemical compounds which can be used either alone or in combination with known compounds to effectively control insect pests and to reduce the risk for resistance development. There are several well-known examples of microbial natural products that are successful as agricultural insecticides (Thompson et al., 2000; Arena et al., 1995; Krieg et al. 1983).

The development of a microbial pesticide starts with the isolation of a microbe in a pure culture. It then proceeds with efficacy and spectrum screening using *in vitro*, *in vivo* or pilot scale trials in a greenhouse and in the field. At the same time, active compounds produced by the microbe are isolated and identified. For the commercialization of a microbial pesticide, the microbe has to be economically produced by fermentation at an industrial scale and formulated with biocompatible and approved additives to increase efficacy and to maximize the ease of application as well as storage stability under field conditions.

As farmers look to expand their insecticide arsenal and as new microbial products are placed on the market, there is a potential for a variety of interactions to occur between new and old insecticides. Combinations of 2 or more insecticides applied to a single crop

simultaneously or sequentially have often been used. To address these concerns, scientists have examined the interaction of oils, fungi, and chemical pesticides against pest and beneficial insects using topical and feeding methods (see, for example, Chalvet-Monfray, Sabatier et al. 1996; Meunier, Carubel et al. 1999; Hummelbrunner and Isman 2001; Wirth, 5 Jiannino et al. 2004; Farenhorst, Knols et al. 2010; Shapiro-Ilan, Cottrell et al. 2011); however, not all interactions have yet been studied.

Chromobacterium

The Beta-Proteobacterium strain, *Chromobacterium subtsugae*, exhibits insecticidal 10 activity against a wide variety of insects (Martin, Blackburn et al. 2004; Martin 2004; Martin, Gundersen-Rindal et al. 2007; Martin, Hirose et al. 2007; Martin, Shropshire et al. 2007). The mode of action appears to be a combination of antifeedant and toxin activity, with feeding inhibition observed at sublethal doses (Martin, Gundersen-Rindal et al. 2007). In particular, it has been found that *Chromobacterium substugae* are effective against adult 15 Colorado Potato Beetle (*Leptinotarse decemlineata*), adult Western Corn Rootworm (*Diabrotica virgifera*), adult and larval Southern Corn Rootworm (*Diabrotica undecimpunctata*), larval Small hive beetle (*Aethina tumida*), larval Diamondback Moths (*Plutella xylostella*), adult and larval Sweet Potato Whitefly (*Bernisia tabaci*) and adult Southern Green Stinkbug (*Nezara viridula*).

20 Since the finding of *C. substugae* by Martin and her coworkers, at least three new species of Chromobacteria have been isolated, and characterized; Young et al. (2008) isolated a novel Chromobacterium species, *C. aquaticum*, from spring water samples in Taiwan, and Kampf et al. (2009) isolated two species, *C. piscinae* and *C. pseudoviolaceum*, from environmental samples collected in Malaysia.

Secondary metabolites of the genus Chromobacterium

Of all known species of Chromobacteria, *Chromobacterium violaceum* is studied the most, and published information on secondary metabolites produced by Chromobacteria is based on studies on *Chromobacterium violaceum* only. Durán and Menck (2001) have 30 published a comprehensive review of the pharmacological and industrial perspectives of *Chromobacterium violaceum*, a Gram-negative saprophyte from soil and water. It is normally considered nonpathogenic to humans, but as an opportunistic pathogen, it has occasionally been the causative agent for septicemia and fatal infections in humans and animals. *Chromobacterium violaceum* is known to produce a purple pigment, violacein,

which is a bisindole molecule generated by a fusion of two L-tryptophan molecules in the presence of oxygen (Hoshino et al., 1987; Ryan and Drennan; 2009). Violacein biosynthesis is regulated by quorum-sensing, a common mechanism regulating various other secondary metabolism pathways in Gram-negative bacteria (McClellan et al., 1997).

5 Other known metabolites of *Chromobacterium violaceum* summarized by Durán and Menck (2001) include hydrogen cyanide, ferrioxamine E, B-lactamic glycopeptides SQ28,504 and SQ28,546, antibiotics such as aerocyanidin, aerocavin, 3,6-dihydroxy-indoxazine, and monobactam SB-26.180, and an antitumoral depsipeptide FR901228. According to the review article by Durán and Menck (2001), *Chromobacterium violaceum*
10 also produces unusual sugar compounds such as extracellular polysaccharides and lipopolysaccharides.

Nematodes and Nematocides

 Nematodes are non-segmented, bilaterally symmetric, worm-like invertebrates that
15 possess a body cavity and complete digestive system but lack respiratory and circulatory systems. Their body wall is composed of a multilayer cuticle, a hypodermis with four longitudinal cords, and internal musculature (Chitwood, 2003). Their body contents are mostly occupied by digestive and reproductive systems. Most nematodes are free-living but a smaller number of species are ubiquitous parasites of animals or plants.

20 Root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) parasitize a wide range of annual and perennial crops, impacting both quality and quantity of marketable yields. Nematodes in this genus are considered the most economically important plant parasitic nematodes (Whitehead, 1998). Annual crop losses caused by plant-parasitic nematodes have been estimated to exceed US \$100 billion (Koenning et al. 1999), with more than half caused by
25 the genus *Meloidogyne*. The inoculum in this strain comes from eggs that under favorable conditions hatch to release infective second stage larvae (J2s), which migrate in the soil towards a host plant root. Infection occurs through root tip penetration, after which the larvae move to vascular tissue where the nematode becomes sedentary, feeding directly from plant cells. The plant responds by producing giant cells that form galls (root knots).
30 Throughout the reproductive life, females remain imbedded in the plant tissue, and only the egg masses protrude from the root.

 The most efficient means for controlling root-knot nematodes is via nematicides that inhibit either egg hatching, juvenile mobility and/or plant infectivity. The development of

chemical control for plant-parasitic nematodes is challenging because of both environmental and physiological reasons: 1. Most phytoparasitic nematodes live in a confined area in soil near the roots and hence, delivery of a chemical nematicide is difficult. 2. The outer surface of nematodes is a poor biochemical target, and is impermeable to many organic molecules (Chitwood, 2003). Moreover, delivery of toxic compounds by an oral route is nearly impossible because most plant parasitic nematode species ingest material only after they have penetrated and infected plant roots. Therefore, nematicides have tended to be broad-spectrum toxins with high volatility or with other chemical and physical properties promoting their mobility in soil.

During the past decade, halogenated hydrocarbons (e.g. ethylene dibromide, methyl bromide) have been the most heavily used nematicides around the world. Due to their high human toxicity and detrimental effects on stratospheric ozone layer these compounds were banned in the Montreal Protocol but the use of methyl bromide for nematode and plant pathogen control was extended in the US due to lack of substitution products. Along with organophosphates, carbamates are the most effective non-fumigant nematicides. Unfortunately, most carbamates such as aldicarb and oxamyl are also highly toxic. As of August 2010, the manufacturer of aldicarb, Bayer, has agreed to cancel all product registrations on potatoes and citrus in the US, and aldicarb will be completely phased out by the end of August, 2018. Recently, abamectin – a mixture of two avermectins produced by a soil actinomycete, *Streptomyces avermitilis* – has been registered for nematicidal use (Faske and Starr, 2006). Syngenta markets this active ingredient as a seed treatment for cotton and vegetables under the trade name Avicta®.

Several microbial plant/nematode pathogens have been reported to be active against plant parasitic nematodes (Guerena, 2006). These biological control agents include the bacteria *Bacillus thuringiensis*, *Burkholderia cepacia*, *Pasteuria penetrans* and *P. usgae*. *Pasteuria* Biosciences has launched *P. usgae* against sting nematodes on turf in the southeastern US. Nematicidal fungi include *Trichoderma harzianum*, *Hirsutella rhossiliensis*, *H. minnesotensis*, *Verticillium chlamydosporum*, *Arthrobotrys dactyloides*, and *Paecilomyces lilanicus* (marketed as BioAct® and Melcon® by Propytha). Another fungus, *Myrothecium verrucaria* is available in a commercial formulation, DiTera®, by Valent Biosciences. This is a killed fungus; hence the activity is due to nematicidal compounds. Other commercial bionematicides include Deny® and Blue Circle® (*B. cepacia*), Activate® (*Bacillus chitinosporus*) (Quarles, 2005) and an Israeli product

BioNem[®] (*Bacillus firmus*) (now marketed by Bayer as a seed treatment Votivo[®]) (Terefe et al. 2009). It has been hypothesized that the detrimental effect of microbial isolates on nematode egg hatching, juvenile mobility and infectivity can be attributed to toxins produced by these organisms (Hallman and Sikora, 1996; Marrone et al, 1998; Siddiqui and
5 Mahmood, 1999; Saxena et al., 2000; Meyer and Roberts, 2002), ability to parasitize or even trap nematodes (Siddiqui and Mahmood, 1996; Kerry, 2001; Jaffee and Muldoon, 1995), induction of systemic resistance (Hasky-Gunther et al. 1998), changing nematode behavior (Sikora and Hoffman-Hergarter, 1993) or interfering with plant recognition (Oostendorp and Sikora, 1990)

10 Botanical nematicides, such as plant extracts and essential oils, can be used to control nematodes (Kokalis-Burrelle and Rodriguez-Kabana, 2006). Chitwood has summarized the options of using plant-derived compounds for nematode control in his recent review article (Chitwood, 2002). Siddiqui and Alam (2001) demonstrated that potting soil amended with plant parts from the neem tree (*Azadirachta indica*) and Chinaberry tree
15 (*Melia azadirah*) inhibited root-knot nematode development of tomatoes. However, no neem products are currently registered in the US for use against nematodes. A new botanical product from Chile (Nema-Q[®]) based on a *Quillaja saponaria* tree extract containing saponins (bidesmosidic derivatives of quillajic acid substituted with a trisaccharide at C-3 and an oligosaccharide in C-28) has been recently registered as a an
20 organic nematicide through US EPA and listed for organic farming by the Organic Materials Review Institute (OMRI). It is marketed by Monterey AgResources.

Crop rotation to a non-host crop is often adequate by itself to prevent nematode populations from reaching economically damaging levels (Guerena 2006). Allelochemicals are plant-produced compounds that affect the behavior of organisms in the plant's
25 environment. Examples of nematocidal allelochemicals include polythienyls, glucisonolates, alkaloids, lipids, terpenoids, steroids, triterpenoids and phenolics (Kokalis-Burrelle and Rodriguez-Kabana, 2006; Chitwood, 2002). When grown as cover crops, bioactive compounds from allelopathic plants are exuded during the growing period and/or released to the soil during biomass decomposition. Brassica crops can be used for
30 biofumigation – a pest management strategy based on the release of biocidal volatiles during decomposition of soil-incorporated tissue (Kirkegaard and Sarwar, 1998). However, studies of Roubtsova et al (2007) on the effect of decaying broccoli tissue on *M. incognita*

numbers indicated that for proper control, thorough mixing of plant tissue with the complete nematode-infected soil volume was necessary.

The future of nematode control in agricultural soils relies on two factors: development of nematode resistant crops and the discovery and development of new, broad-spectrum, less toxic nematicides. The cost of research, development and registration of a new chemical nematicides is extremely high (>\$200 million), which limits their development. Of the 497 new active ingredients registered for use as a pesticide from 1967 to 1997, only seven were registered as nematicides (Aspelin and Grube, 1999). Besides conventional chemical methods, RNA interference (RNAi) has been proposed as a method for controlling nematodes. Use of gene silencing via RNAi was first demonstrated on *Caenorhabditis elegans* and quite recently also for plant parasitic nematodes such as *Meloidogyne* spp. (Bakhetia et al. 2005). The search for new microbial strains to use as sources for biological nematicides is an important goal in order to reduce the significant economic damage caused by plant-parasitic nematodes as well as to reduce the use of toxic compounds currently registered for nematode control.

According to Sasser and Freckman (1987), crop losses by nematodes range from 8 to 20% on major crops around the world. Plant parasitic nematodes can cause considerable crop damage with annual losses estimated at \$87 billion worldwide (Dong and Zhang, 2006). Nematode resistant crop varieties and chemical nematicides are currently the main options for nematode control. Fumigants such as methyl bromide are very effective in controlling both soil-borne plant diseases and nematodes but due to the high mammalian toxicity, ozone depleting effects and other residual effects, the use of methyl bromide has already been banned in various countries and its complete withdrawal from the market is planned by international agreement (Oka et al., 2000). Chemical alternatives such as methyl iodide, 1,3-Dichloropropene, and chloropicrin also have issues with mammalian and environmental safety. Chemical non-fumigant nematicides are being phased out and banned. Most recently, the US-EPA announced that aldicarb was being phased out.

BRIEF SUMMARY

Provided herein are novel uses and combinations and, in particular, compositions comprising a strain of *Chromobacterium* sp., particularly a strain of *Chromobacterium substagae* and more particularly, a strain of *Chromobacterium substagae* sp. nov. and even

more particularly a strain of *Chromobacterium substagae* sp. nov. having the identifying characteristics of NRRL B-30655 described in US Patent No. 7,244,607.

Thus provided herein is a method for modulating nematode infestation in a plant comprising applying to a plant, and/or seeds thereof and/or substrate used for growing said
5 plant an amount of a supernatant, filtrate and/ or extract and/or one or more metabolites from said supernatant, filtrate and/ or extract of a strain of *Chromobacterium* sp. , particularly a strain of *Chromobacterium substagae* and more particularly, a strain of *Chromobacterium substagae* sp. nov. and even more particularly a strain of *Chromobacterium substagae* sp. nov. having the identifying characteristics of NRRL B-
10 30655 described in US Patent No. 7,244,607 and optionally another nematocidal substance in an amount effective to modulate said nematode infestation.

Also provided herein is a pesticidal combination synergistic to at least one pest comprising as active components: (a) a supernatant, filtrate and/or extract of a strain of *Chromobacterium* sp., particularly a strain of *Chromobacterium substagae* and more
15 particularly, a strain of *Chromobacterium substagae* sp. nov. and even more particularly a strain of *Chromobacterium substagae* sp. nov. having the identifying characteristics of NRRL B-30655 described in US Patent No. 7,244,607 and/or one or more metabolite(s) from said supernatant, filtrate and/ or extract of *Chromobacterium* sp., particularly a strain of *Chromobacterium substagae* and more particularly, a strain of *Chromobacterium*
20 *substagae* sp. nov. and even more particularly a strain of *Chromobacterium substagae* sp. nov. having the identifying characteristics of NRRL B-30655 described in US Patent No. 7,244,607 and (b) another pesticidal substance, wherein (a) and (b) are present in synergistic amounts. The pest, in a particular embodiment, may be an insect pest, but may also include, but is not limited to, a nematode, plant fungus, plant virus and plant bacteria
25 and weeds. Further, the combination may be a composition. The pesticidal substance may be (a) derived from a microorganism; (b) a natural product and/or (c) a chemical pesticide and in particular a chemical nematocide.

In particular, the combination may comprise a supernatant, filtrate and/or extract of a strain of *Chromobacterium* sp., particularly a strain of *Chromobacterium substagae* and
30 more particularly, a strain of *Chromobacterium substagae* sp. nov. and even more particularly a strain of *Chromobacterium substagae* sp. nov. having the identifying characteristics of NRRL B-30655 described in US Patent No. 7,244,607 and a pesticidal substance derived from a microorganism including but not limited to *Bacillus* sp. (e.g.,

Bacillus thuringiensis or *Bacillus thuringiensis kurstaki*) and spinosad. Alternatively, the combination may comprise a supernatant, filtrate and/ or extract of a strain of *Chromobacterium* sp., particularly a strain of *Chromobacterium substugae* and more particularly, a strain of *Chromobacterium substugae* sp. nov. and even more particularly a strain of *Chromobacterium substugae* sp. nov. having the identifying characteristics of NRRL B-30655 described in US Patent No. 7,244,607 and a pesticidal substance derived from a natural product such as pyrethrum. Alternatively, the combination may comprise a supernatant, filtrate and/ or extract of a strain of *Chromobacterium* sp., particularly a strain of *Chromobacterium substugae* and more particularly, a strain of *Chromobacterium substugae* sp. nov. and even more particularly a strain of *Chromobacterium substugae* sp. nov. having the identifying characteristics of NRRL B-30655 described in US Patent No. 7,244,607 and a pesticidal substance which is a chemical pesticide, particularly, an insecticide, where the insecticide includes but is not limited to pyrethrins, spirotetramet and anthranilicdiamide.

In a related aspect, provided herein is a method for synergistically modulating infestation of at least one pest or pest species in a plant comprising applying to a plant and/or seeds thereof and/or substrate for growing said plant the combinations set forth above with an amount of the combination effective to modulate infestation of said pest or pest species. Also provided herein are isolated compounds obtainable or derived from a strain of *Chromobacterium* species, more particularly, *Chromobacterium substugae* and more particularly, a strain of *Chromobacterium substugae* sp. nov. and even more particularly a strain of *Chromobacterium substugae* sp. nov. having the identifying characteristics of NRRL B-30655 described in US Patent No. 7,244,607 or alternatively, organisms capable of producing these compounds that can be used to control various pests, and particularly, nematocidal pests.

In one embodiment, the compound may be a compound that (a) has pesticidal activity; (b) has a molecular weight of about 840-900 as determined by Liquid Chromatography/Mass Spectroscopy (LC/MS) and (c) has an High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) retention time of about 7-12 minutes on a reversed phase C-18 HPLC column using a water:acetonitrile (CH₃CN) gradient solvent system (0-20 min; 90 - 0 % aqueous CH₃CN, 20-24 min; 100% CH₃CN, 24-27 min; 0-90 % aqueous CH₃CN, 27-30 min; 90% aqueous CH₃CN) at 0.5 mL/min flow rate and UV detection of 210 nm and (d) is optionally obtainable from a strain of *Chromobacterium* sp., particularly a strain of

Chromobacterium substugae and more particularly, a strain of *Chromobacterium substugae* sp. nov. and even more particularly a strain of *Chromobacterium substugae* sp. nov. having the identifying characteristics of NRRL B-30655 described in US Patent No. 7,244,607.

The compound in one embodiment may be a peptide.

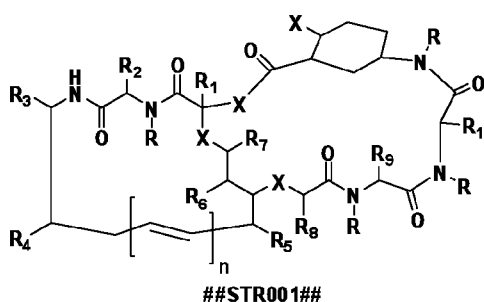
5 In a particular embodiment, the compound has 43 carbons, seven methyl, ten methylene carbons, twelve methines, 6 olefinic methines, and eight quaternary carbons as determined by ^{13}C NMR.

In one specific embodiment, the compound "A": (a) is obtainable from a strain of *Chromobacterium* sp., particularly a strain of *Chromobacterium substugae* and more particularly, a strain of *Chromobacterium substugae* sp. nov. and even more particularly a strain of *Chromobacterium substugae* sp. nov. having the identifying characteristics of NRRL B-30655 described in US Patent No. 7,244,607; (b) is toxic to a pest; (c) has a molecular weight of about 840-890 and more particularly, 860 as determined by Liquid Chromatography/Mass Spectroscopy (LC/MS); (d) has ^1H NMR values of δ 8.89, 8.44, 8.24, 8.23, 7.96, 7.63, 6.66, 5.42, 5.36, 5.31, 5.10, 4.13, 4.07, 4.05, 3.96, 3.95, 3.88, 3.77, 3.73, 3.51, 3.44, 3.17, 2.40, 2.27, 2.11, 2.08, 2.03, 2.01, 1.97, 1.95, 1.90, 1.81, 1.68, 1.63, 1.57, 1.53, 1.48, 1.43, 1.35, 1.24, 1.07, 1.02, 0.96, 0.89, 0.88, 0.87, 0.80 and has ^{13}C NMR values of δ 173.62, 172.92, 172.25, 172.17, 171.66, 171.28, 170.45, 132.13, 130.04, 129.98, 129.69, 129.69, 125.48, 98.05, 70.11, 69.75, 68.30, 68.25, 64.34, 60.94, 54.54, 52.82, 49.72, 48.57, 45.68, 40.38, 39.90, 38.18, 36.60, 31.98, 31.62, 31.58, 29.53, 28.83, 27.78, 24.41, 23.06, 22.09, 20.56, 19.31, 18.78, 17.66, 15.80 (e) has an High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) retention time of about 7-12 minutes, more specifically about 9 minutes and even more specifically about 9.08 min on a reversed phase C-18 HPLC (Phenomenex, Luna 5μ C18(2) 100 A, 100 x 4.60 mm) column using a water:acetonitrile (CH_3CN) with a gradient solvent system (0-20 min; 90-0% aqueous CH_3CN , 20-24 min; 100% CH_3CN , 24-27 min; 0-90 % aqueous CH_3CN , 27-30 min; 90% aqueous CH_3CN) at 0.5 mL/min flow rate and UV detection of 210 nm. In particular, the ^{13}C NMR spectrum reveals signals for 43 carbons, for seven methyl, ten methylene carbons, twelve methines, 6 olefinic methines, eight quaternary carbons and/or the ^1H NMR spectrum displays characteristics of a typical peptide, illustrating five amide NH signals [δ_{H} : 8.89, 8.44, 8.23, 8.22, 7.96], one amine NH_2 signal [δ_{H} : 7.64, 6.65], six α -amino protons [δ_{H} : 4.07, 4.06, 3.96, 3.95, 3.88, 3.72] and in the ^{13}C NMR spectrum, six/seven amide or ester resonances [δ_{C} : 173.62, 172.92, 172.25, 172.17, 171.66, 171.28, 170.45].

In another specific embodiment, the compound "B" has the following characteristics: (a) is obtainable from a strain of *Chromobacterium sp.*, particularly a strain of *Chromobacterium substagae* and more particularly, a strain of *Chromobacterium substagae* sp. nov. and even more particularly a strain of *Chromobacterium substagae* sp. nov. having the identifying characteristics of NRRL B-30655 described in US Patent No. 7,244,607; (b) is toxic to a pest; (c) has a molecular weight of about 850-900 and more particularly, 874 as determined by Liquid Chromatography/Mass Spectroscopy (LC/MS); (d) has an High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) retention time of about 7-12 minutes, more specifically about 9 minutes and even more specifically about 9.54 min on a reversed phase C-18 HPLC (Phenomenex, Luna 5 μ C18(2) 100 A, 100 x 4.60 mm) column using a water:acetonitrile (CH₃CN) with a gradient solvent system (0-20 min; 90-0% aqueous CH₃CN, 20-24 min; 100% CH₃CN, 24-27 min; 0-90% aqueous CH₃CN, 27-30 min; 90% aqueous CH₃CN) at 0.5 mL/min flow rate and UV detection of 210 nm.

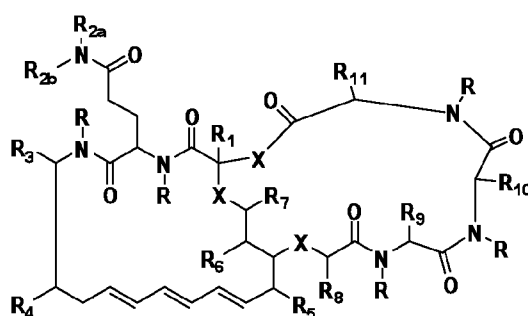
In a more particular embodiment, provided are compounds including but not limited to:

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



or a pesticidally acceptable salt or stereoisomers thereof, wherein R is -H, lower chain alkyl containing 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 or 9 alkyl moieties, aryl or arylalkyl moiety, substituted lower alkyl; X is O, NH, NR or S; n is 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 or 9; R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, R₇, R₈, R₉, R₁₀, R₁₁ are each independently H, are the same or different and independently an amino acid side-chain moiety or an amino acid side-chain derivative, alkyl, substituted alkyl, alkenyl, substituted alkenyl, alkynyl, substituted alkynyl, aryl, substituted aryl, heteroaryl, substituted heteroaryl, heterocyclic, substituted heterocyclic, cycloalkyl, substituted cycloalkyl, alkoxy, substituted alkoxy, thioalkyl, substituted thioalkyl, hydroxy, halogen, amino, amido, carboxyl, -C(O)H, acyl, oxyacyl, carbamate, sulfonyl, sulfonamide, or sulfuryl;

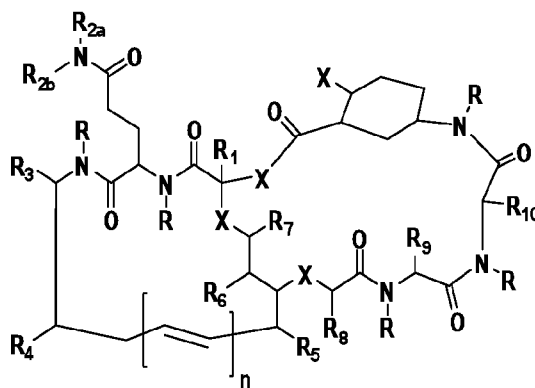
(B) a compound having the structure ##STR001a##



##STR001a##

- wherein R is -H, lower chain alkyl containing 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 or 9 alkyl moieties, aryl or arylalkyl moiety, substituted lower alkyl; X is O, NH, NR or S; R_{2a}, R_{2b} are independently selected from the group consisting of -H, alkyl, lower-alkyl, substituted alkyl and substituted lower-alkyl; R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, R₇, R₈, R₉, R₁₀, R₁₁ are each independently H, are the same or different and independently an amino acid side-chain moiety or an amino acid side-chain derivative, alkyl, substituted alkyl, alkenyl, substituted alkenyl, alkynyl, substituted alkynyl, aryl, substituted aryl, heteroaryl, substituted heteroaryl, heterocyclic, substituted heterocyclic, cycloalkyl, substituted cycloalkyl, alkoxy, substituted alkoxy, thioalkyl, substituted thioalkyl, hydroxy, halogen, amino, amido, carboxyl, -C(O)H, acyl, oxyacyl, carbamate, sulfonyl, sulfonamide, or sulfonyl.

(C) a compound having the structure ##STR001b##

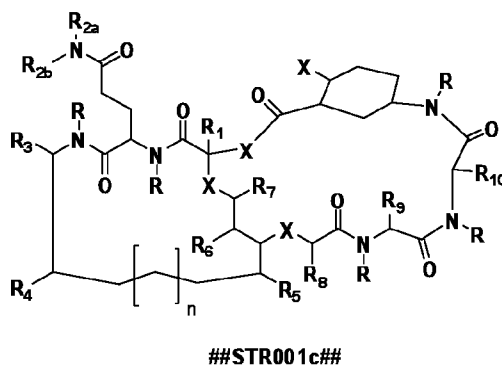


##STR001b##

- wherein R is -H, lower chain alkyl containing 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 or 9 alkyl moieties, aryl or aryl alkyl moiety, substituted lower alkyl; X is O, NH, NR or S; n is 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 or 9; R_{2a}, R_{2b} are independently selected from the group consisting of -H, alkyl, lower-alkyl, substituted alkyl and substituted lower-alkyl; R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, R₇, R₈, R₉, R₁₀, R₁₁ are each independently H, are the same or different and independently an

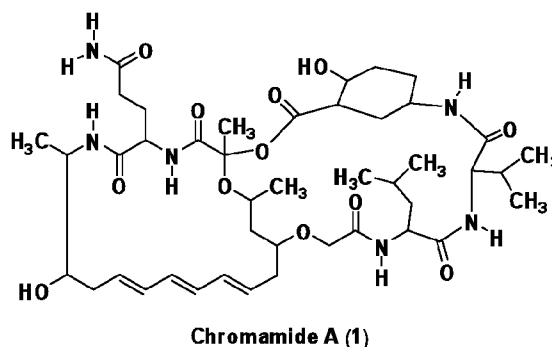
amino acid side-chain moiety or an amino acid side-chain derivative, alkyl, substituted alkyl, alkenyl, substituted alkenyl, alkynyl, substituted alkynyl, aryl, substituted aryl, heteroaryl, substituted heteroaryl, heterocyclic, substituted heterocyclic, cycloalkyl, substituted cycloalkyl, alkoxy, substituted alkoxy, thioalkyl, substituted thioalkyl, hydroxy, halogen, amino, amido, carboxyl, -C(O)H, acyl, oxyacyl, carbamate, sulfonyl, sulfonamide, or sulfuryl.

(D) a compound having the structure ##STR001c##



wherein R is -H, lower chain alkyl, aryl or aryl alkyl moiety, substituted lower alkyl containing 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 or 9 alkyl moieties; X is O, NH, NR or S; n is 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 or 9; R2a, R2b are independently selected from the group consisting of -H, alkyl, lower-alkyl, substituted alkyl and substituted lower-alkyl; R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7, R8, R9, R10, R11 are each independently H, are the same or different and independently an amino acid side-chain moiety or an amino acid side-chain derivative, alkyl, substituted alkyl, alkenyl, substituted alkenyl, alkynyl, substituted alkynyl, aryl, substituted aryl, heteroaryl, substituted heteroaryl, heterocyclic, substituted heterocyclic, cycloalkyl, substituted cycloalkyl, alkoxy, substituted alkoxy, thioalkyl, substituted thioalkyl, hydroxy, halogen, amino, amido, carboxyl, -C(O)H, acyl, oxyacyl, carbamate, sulfonyl, sulfonamide, or sulfuryl.

In a more particular embodiment, the compound is chromamide A (1).



These compounds may be obtained by (a) culturing a strain of *Chromobacterium* *sp.*, particularly a strain of *Chromobacterium substugae* and more particularly, a strain of *Chromobacterium substugae* *sp. nov.* and even more particularly a strain of *Chromobacterium substugae* *sp. nov.* having the identifying characteristics of NRRL B-30655 described in US Patent No. 7,244,607 in a culture medium or whole cell broth under conditions sufficient to produce said compound to obtain a *Chromobacterium* culture and (b) isolating said compound produced from the whole cell broth of (a). In particular, the compound in step (b) may be isolated by (i) applying the whole cell broth to at least one of an ion exchange column, a size exclusion column or a reversed phase HPLC column to obtain column fractions; (ii) assaying the column fractions for pesticidal activity and (iii) concentrating column fractions of (ii) to obtain isolated compound.

Further provided are compositions, particularly pesticidal compositions comprising said compounds as well as other compounds obtainable from a strain of *Chromobacterium* *sp.*, particularly a strain of *Chromobacterium substugae* and more particularly, a strain of *Chromobacterium substugae* *sp. nov.* and even more particularly a strain of *Chromobacterium substugae* *sp. nov.* having the identifying characteristics of NRRL B-30655 described in US Patent No. 7,244,607 with pesticidal activity. These other compounds may have the following characteristics: (a) a molecular weight of about 315-360 as determined by Liquid Chromatography/Mass Spectroscopy (LC/MS); (b) an High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) retention time of about 8-15 minutes on a reversed phase C-18 HPLC column using a water:acetonitrile (CH₃CN) with a gradient solvent system (0-20 min; 90-0 % aqueous CH₃CN, 20-24 min; 100% CH₃CN, 24-27 min; 0 - 90 % aqueous CH₃CN, 27-30 min; 90% aqueous CH₃CN) at 0.5 mL/min flow rate and UV detection of 210 nm and may be obtained by (A) culturing a a strain of *Chromobacterium* *sp.*, particularly a strain of *Chromobacterium substugae* and more particularly, a strain of *Chromobacterium substugae* *sp. nov.* and even more particularly a strain of *Chromobacterium substugae* *sp. nov.* having the identifying characteristics of NRRL B-30655 described in US Patent No. 7,244,607 in a culture medium under conditions sufficient to produce said compound to obtain a a strain of *Chromobacterium* *sp.*, particularly a strain of *Chromobacterium substugae* and more particularly, a strain of *Chromobacterium substugae* *sp. nov.* and even more particularly a strain of *Chromobacterium substugae* *sp. nov.* having the identifying characteristics of NRRL B-

30655 described in US Patent No. 7,244,607 culture and (B) isolating said compound produced from the whole cell broth of (A).

In a particular embodiment, one compound used in said composition set forth above, compound "C", has the following characteristics: (a) is obtainable from a strain of

- 5 *Chromobacterium* sp., particularly a strain of *Chromobacterium substugae* and more particularly, a strain of *Chromobacterium substugae* sp. nov. and even more particularly a strain of *Chromobacterium substugae* sp. nov. having the identifying characteristics of NRRL B-30655 described in US Patent No. 7,244,607; (b) is toxic to pests; (c) has a molecular weight of about 325-360 and more particularly, about 343 as determined by
- 10 Liquid Chromatography/Mass Spectroscopy (LC/MS); (d) has an High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) retention time of about 8-14 minutes, more specifically about 10 minutes and even more specifically about 10.88 min on a reversed phase C-18 HPLC (Phenomenex, Luna 5 μ C18(2) 100 A, 100 x 4.60 mm) column using a water:acetonitrile (CH₃CN) with a gradient solvent system (0-20 min; 90-0 % aqueous CH₃CN, 20-24 min;
- 15 100% CH₃CN, 24-27 min; 0 - 90 % aqueous CH₃CN, 27-30 min; 90% aqueous CH₃CN) at 0.5 mL/min flow rate and UV detection of 210 nm. In a particular embodiment, compound "C" may be violacein (**2**), a known compound isolated earlier from *Chromobacterium violaceum*.

In another embodiment, another compound used in the composition set forth above,

- 20 the compound "D", has the following characteristics: (a) is obtainable from a *Chromobacterium* species; (b) is toxic to a pest; (c) has a molecular weight of about 315-350 and more particularly, about 327 as determined by Liquid Chromatography/Mass Spectroscopy (LC/MS); (d) has an High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) retention time of about 10-15 minutes, more specifically about 12 minutes and even more
- 25 specifically about 12.69 min on a reversed phase C-18 HPLC (Phenomenex, Luna 5 μ C18(2) 100 A, 100 x 4.60 mm) column using a water:acetonitrile (CH₃CN) with a gradient solvent system (0-20 min; 90-0% aqueous CH₃CN, 20-24 min; 100% CH₃CN, 24-27 min; 0 - 90 % aqueous CH₃CN, 27-30 min; 90% aqueous CH₃CN) at 0.5 mL/min flow rate and UV detection of 210 nm. In a particular embodiment, compound "D" may be characterized as
- 30 deoxyviolacein (**3**), a known compound isolated earlier from *Chromobacterium violaceum*.

Said compositions may further optionally comprise a second substance, wherein said second substance is a chemical or biological pesticide and/or at least one of a carrier, diluent, surfactant or adjuvant.

Also provided is a method of using the compounds (e.g., compounds “A”, “B”, “C” and “D”) and compositions set forth above to modulate pest infestation, particularly nematocidal pests in a plant comprising applying to the plant an amount of the compound or compositions and optionally a second chemical or biological pesticide effective to modulate said pest infestation. Further provided is the use of the compounds set forth above for formulating a composition for modulating pest infestation in a plant.

BRIEF DESCRIPTION OF THE FIGURES

FIG. 1 is a schematic representation of purification scheme for obtaining the compounds of the invention from culture broth.

FIG. 2 depicts the ESI-LCMS chromatogram for chromamide A (1).

FIG. 3 depicts the HRMS data for chromamide A (1).

FIG. 4 depicts ^1H NMR for chromamide A (1) in $\text{DMSO}-d_6$ at 600 MHz.

FIG. 5 depicts ^{13}C NMR for chromamide A (1) in $\text{DMSO}-d_6$ at 600 MHz.

FIG. 6 depicts the HPLC chromatogram for compound B (MW 874).

FIG. 7 depicts chemical structures for chromamide A (1) violacein (2) and deoxyviolacein (3).

FIG. 8 Percentage of mobile nematodes after treatment with filter sterilized *C. substugae* broth (1x – undiluted; 0.1x – diluted 10-fold) after 24 hours.

FIG. 9 Percentage of mobile nematodes after treatment with filter sterilized *C. substugae* broth (1x – undiluted; 0.1x – diluted 10-fold) after 48 hours.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

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

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

limits of these smaller ranges are also included therein, subject to any specifically excluded limit in the stated range.

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

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

As defined herein, "derived from" means directly isolated or obtained from a particular source or alternatively having identifying characteristics of a substance or organism isolated or obtained from a particular source. In the event that the "source" is an organism, "derived from" means that it may be isolated or obtained from the organism itself or medium used to culture or grow said organism.

As defined herein, "whole broth culture" refers to a liquid culture containing both cells and media. If bacteria are grown on a plate the cells can be harvested in water or other liquid, whole culture.

The term "supernatant" refers to the liquid remaining when cells grown in broth or are harvested in another liquid from an agar plate and are removed by centrifugation, filtration, sedimentation, or other means well known in the art.

As defined herein, "filtrate" refers to liquid from a whole broth culture that has passed through a membrane.

As defined herein, "extract" refers to liquid substance removed from cells by a solvent (water, detergent, buffer) and separated from the cells by centrifugation, filtration or other method.

As defined herein, "metabolite" refers to a compound, substance or byproduct of a fermentation of a microorganism, or supernatant, filtrate, or extract obtained from a microorganism that has pesticidal and particularly, insecticidal activity. As defined herein, an "isolated compound" is essentially free of other compounds or substances, *e.g.*, at least about 20% pure, preferably at least about 40% pure, more preferably about 60% pure, even more preferably about 80% pure, most preferably about 90% pure, and even most preferably about 95% pure, as determined by analytical methods, including but not limited to chromatographic methods, electrophoretic methods.

As defined herein, a "carrier" is an inert, organic or inorganic material, with which the active ingredient is mixed or formulated to facilitate its application to plant or other object to be treated, or its storage, transport and/or handling.

5 The term "modulate" is used to mean to alter the amount of pest infestation or rate of spread of pest infestation.

As defined herein, the term "pest infestation" is the presence of a pest in an amount that causes a harmful effect including a disease or infection in a host population or emergence of an undesired weed in a growth system.

10 As defined herein, a "pesticide" is a substance derived from a biological product or chemical substance that increase mortality or inhibit the growth rate of plant pests and includes but is not limited to nematocides, insecticides, plant fungicides, plant bactericides, and plant viricides.

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

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

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

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

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

As defined herein, "heteroaryl" refers to aromatic rings containing one or more heteroatoms (e.g., N, O, S, or the like) as part of the ring structure, and having in the range

of 3 up to 14 carbon atoms and "substituted heteroaryl" refers to heteroaryl groups further bearing one or more substituents as set forth above.

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

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

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

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

METHODS OF PRODUCTION

As noted above, compounds or metabolites may be obtained, are obtainable or derived from an organism having the identifying characteristics of a *Chromobacterium*
20 species, more particularly, from an organism having the identifying characteristics of a strain of *Chromobacterium substugae*, more particularly from a strain of *Chromobacterium substugae* sp. nov. which may have the identifying characteristics of NRRL B-30655, or alternatively from any other microorganism. The methods comprise cultivating these organisms and obtaining the compounds and/or compositions of the present invention by
25 isolating these compounds from the culture of these organisms.

In particular, the organisms are cultivated in nutrient medium using methods known in the art. The organisms may be cultivated by shake flask cultivation, small scale or large scale fermentation (including but not limited to continuous, batch, fed-batch, or solid state fermentations) in laboratory or industrial fermentors performed in suitable medium and
30 under conditions allowing cell growth. The cultivation may take place in suitable nutrient medium comprising carbon and nitrogen sources and inorganic salts, using procedures known in the art. Suitable media are available may be available from commercial sources or prepared according to published compositions.

After cultivation, a supernatant, filtrate and/or extract of or derived from *Chromobacterium* sp. may be used in formulating a pesticidal composition.

Alternatively, after cultivation, the compounds and/or metabolites may be extracted from the culture broth.

5 The extract may be fractionated by chromatography. Chromatographic fractions may be assayed for toxic activity against, for example, Cabbage looper (*Trichoplusia ni*) or Beet armyworm (*Spodoptera exigua*) using methods known in the art. This process may be repeated one or more times using the same or different chromatographic methods.

10 **Compositions**

Compositions may comprise whole broth cultures, liquid cultures, or suspensions of a strain from a *Chromobacterium* sp., e.g. a strain having the identifying characteristics of *Chromobacterium substugae* sp. Nov and more particularly, having the identifying characteristics of NRRL B-30655 (see US Patent No. 7,244,607), as well as supernatants,
15 filtrates or extracts obtained from a strain of a *Chromobacterium* sp., e.g. a strain having the identifying characteristics of *Chromobacterium substugae* sp. Nov and more particularly, having the identifying characteristics of NRRL B-30655 (see US Patent No. 7,244,607), or the supernatant, filtrate and/or extract or one or more metabolites or isolated compounds derived from a strain of a *Chromobacterium* sp. or combinations of the foregoing which in
20 particular have nematocidal activity.

The compositions set forth above can be formulated in any manner. Non-limiting formulation examples include, but are not limited to, Emulsifiable concentrates (EC), Wettable powders (WP), soluble liquids (SL), Aerosols, Ultra-low volume concentrate solutions (ULV), Soluble powders (SP), Microencapsulation, Water dispersed Granules,
25 Flowables (FL), Microemulsions (ME), Nano-emulsions (NE), etc. In any formulation described herein, percent of the active ingredient is within a range of 0.01% to 99.99%.

The compositions may be in the form of a liquid, gel or solid.

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

A composition may comprise gel-encapsulated active ingredient(s). Such gel-encapsulated materials can be prepared by mixing a gel-forming agent (e.g., gelatin, cellulose, or lignin) with a culture or suspension of live or inactivated *Chromobacterium*, or

a cell-free filtrate or cell fraction of a *Chromobacterium* culture or suspension, or a spray- or freeze-dried culture, cell, or cell fraction or in a solution of pesticidal compounds used in the method of the invention; and inducing gel formation of the agent.

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

The composition set forth above may be combined with another microorganism and/or pesticide (e.g., nematocide, fungicide, insecticide). The microorganism may include but is not limited to an agent derived from *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Brevabacillus* sp., *Lecanicillium* sp., non-*Ampelomyces* sp., *Pseudozyma* sp., *Streptomyces* sp, *Burkholderia* sp, *Trichoderma* sp, *Gliocladium* sp. Alternatively, the agent may be a natural oil or oil-product having fungicidal and/or insecticidal activity (e.g., paraffinic oil, tea tree oil, lemongrass oil, clove oil, cinnamon oil, citrus oil, rosemary oil, pyrethram). Furthermore, the pesticide may be a single site anti-fungal agent which may include but is not limited to benzimidazole, a demethylation inhibitor (DMI) (e.g., imidazole, piperazine, pyrimidine, triazole), morpholine, hydroxypyrimidine, anilinopyrimidine, phosphorothiolate, quinone outside inhibitor, quinoline, dicarboximide, carboximide, phenylamide, anilinopyrimidine, phenylpyrrole, aromatic hydrocarbon, cinnamic acid, hydroxyanilide, antibiotic, polyoxin, acylamine, phthalimide, benzenoid (xylylalanine), a demethylation inhibitor selected from the group consisting of imidazole, piperazine, pyrimidine and triazole (e.g., bitertanol, myclobutanil, penconazole, propiconazole, triadimefon, bromuconazole, cyproconazole, diniconazole, fenbuconazole, hexaconazole, tebuconazole, tetraconazole), myclobutanil, an anthranilic diamide (e.g., chlorantranilipole) and a quinone outside inhibitor (e.g., strobilurin). The strobilurin may include but is not limited to azoxystrobin, kresoxim-methoyle or trifloxystrobin. In yet another particular embodiment, the anti-fungal agent is a

quinone, e.g., quinoxifen (5,7-dichloro-4-quinolyl 4-fluorophenyl ether). The anti-fungal agent may also be derived from a *Reynoutria* extract.

The fungicide can also be a multi-site non-inorganic, chemical fungicide selected from the group consisting of chloronitrile, quinoxaline, sulphamide, phosphonate, phosphite, dithiocarbamate, chloralkythios, phenylpyridin-amine, cyano-acetamide oxime.

The composition may as noted above, further comprise an insecticide. The insecticide may include but is not limited to avermectin, Bt (e.g., *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*), neem oil, spinosads, *Burkholderia* sp. as set forth in WO2011/106491, entomopathogenic fungi such a *Beauveria bassiana* and chemical insecticides including but not limited to organochlorine compounds, organophosphorous compounds, carbamates, pyrethroids, pyrethrins and neonicotinoids.

As noted above, the composition may further comprise a nematocide. This nematocide may include, but is not limited to, avermectin, microbial products such as Biome (*Bacillus firmus*), *Pasteuria* spp and organic products such as saponins.

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

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

Uses

The compositions, cultures, supernatants, metabolites and pesticidal compounds set forth above may be used as pesticides. In particular, the compositions, cultures, supernatants, metabolites and pesticidal compounds as set forth above may be used as insecticides and nematocides, alone or in combination with one or more pesticidal substances set forth above.

Specifically, nematodes that may be controlled using the method set forth above include but are not limited to parasitic nematodes such as root-knot, cyst, and lesion nematodes, including but not limited to *Meloidogyne* sp., *Tylenchorhynchus* sp., *Hoplolaimus* sp., *Helicotylenchus* sp., *Pratylenchus* sp., *Heterodera* sp., *Globodera*, sp., *Trichodorus* sp., *Paratrichodorus* sp., *Xiphinema* sp., and *Criconema* sp.; particularly *Meloidogyne incognita* (root knot nematodes), as well as *Globodera rostochiensis* and *globodera pailida* (potato cyst nematodes); *Heterodera glycines* (soybean cyst nematode); *Heterodera schachtii* (beet cyst nematode); and *Heterodera avenae* (cereal cyst nematode).

Phytopathogenic insects controlled by the method set forth above include but are not limited to non-*Culicidae* larvae insects from the order (a) Lepidoptera, for example, *Acleris* spp., *Adoxophyes* spp., *Aegeria* spp., *Agrotis* spp., *Alabama argillaceae*, *Amylois* spp., *Anticarsia gemmatilis*, *Archips* spp., *Argyrotaenia* spp., *Autographa* spp., *Busseola fusca*, *Cadra cautella*, *Carposina nipponensis*, *Chilo* spp., *Choristoneura* spp., *Clysia ambiguella*, *Cnaphalocrocis* spp., *Cnephasia* spp., *Cochylis* spp., *Coleophora* spp., *Crocidolomia binotalis*, *Cryptophlebia leucotreta*, *Cydia* spp., *Diatraea* spp., *Diparopsis castanea*, *Earias* spp., *Ephestia* spp., *Eucosma* spp., *Eupoecilia ambiguella*, *Euproctis* spp., *Euxoa* spp., *Grapholita* spp., *Hedya nubiferana*, *Heliothis* spp., *Hellula undalis*, *Hyphantria cunea*, *Keiferia lycopersicella*, *Leucoptera scitella*, *Lithocollethis* spp., *Lobesia botrana*, *Lymantria* spp., *Lyonetia* spp., *Malacosoma* spp., *Mamestra brassicae*, *Manduca sexta*, *Operophtera* spp., *Ostrinia nubilalis*, *Pammene* spp., *Pandemis* spp., *Panolis flammea*, *Pectinophora gossypiella*, *Phthorimaea operculella*, *Pieris rapae*, *Pieris* spp., *Plutella xylostella*, *Prays* spp., *Scirpophaga* spp., *Sesamia* spp., *Sparganothis* spp., *Spodoptera* spp., *Synanthedon* spp., *Thaumetopoea* spp., *Tortrix* spp., *Trichoplusia ni* and *Yponomeuta* spp.; (b) Coleoptera, for example, *Agriotes* spp., *Anthonomus* spp., *Atomaria linearis*, *Chaetocnema tibialis*, *Cosmopolites* spp., *Curculio* spp., *Dermestes* spp., *Diabrotica* spp., *Epilachna* spp., *Eremnus* spp., *Leptinotarsa decemlineata*, *Lissorhoptrus* spp., *Melolontha* spp., *Orycaephilus* spp., *Otiorhynchus* spp., *Phlyctinus* spp., *Popillia* spp., *Psylliodes* spp.,

- Rhizopertha* spp., *Scarabeidae*, *Sitophilus* spp., *Sitotroga* spp., *Tenebrio* spp., *Tribolium* spp. and *Trogoderma* spp.; (c) *Orthoptera*, for example, *Blatta* spp., *Blattella* spp., *Gryllotalpa* spp., *Leucophaea maderae*, *Locusta* spp., *Periplaneta* spp. and *Schistocerca* spp.; (d) *Isoptera*, for example, *Reticulitermes* spp.; (e) *Psocoptera*, for example, *Liposcelis* spp.; (f) *Anoplura*, for example, *Haematopinus* spp., *Linognathus* spp., *Pediculus* spp., *Pemphigus* spp. and *Phylloxera* spp.; (g) *Mallophaga*, for example, *Damalinea* spp. and *Trichodectes* spp.; (h) *Thysanoptera*, for example, *Frankliniella* spp., *Hercinotnrips* spp., *Taeniothrips* spp., *Thrips palmi*, *Thrips tabaci* and *Scirtothrips aurantii*; (i) *Heteroptera*, for example, *Cimex* spp., *Distantiella theobroma*, *Dysdercus* spp., *Euchistus* spp., *Eurygaster* spp., *Leptocorisa* spp., *Nezara* spp., *Piesma* spp., *Rhodnius* spp., *Sahlbergella singularis*, *Scotinophara* spp. and *Tniatoma* spp.; (j) *Homoptera*, for example, *Aleurothrixus floccosus*, *Aleyrodes brassicae*, *Aonidiella* spp., *Aphididae*, *Aphis* spp., *Aspidiotus* spp., *Bemisia tabaci*, *Ceroplaster* spp., *Chrysomphalus aonidium*, *Chrysomphalus dictyospermi*, *Coccus hesperidum*, *Empoasca* spp., *Eriosoma larigerum*, *Erythroneura* spp., *Gascardia* spp., *Laodelphax* spp., *Lecanium corni*, *Lepidosaphes* spp., *Macrosiphus* spp., *Myzus* spp., *Nephotettix* spp., *Nilaparvata* spp., *Paratoria* spp., *Pemphigus* spp., *Planococcus* spp., *Pseudaulacaspis* spp., *Pseudococcus* spp., *Psylla* spp., *Pulvinaria aethiopica*, *Quadraspidionus* spp., *Rhopalosiphum* spp., *Saissetia* spp., *Scaphoideus* spp., *Schizaphis* spp., *Sitobion* spp., *Trialeurodes vaporariorum*, *Trioza erytreae* and *Unaspis citri*; (k) *Hymenoptera*, for example, *Acromyrmex*, *Atta* spp., *Cephus* spp., *Diprion* spp., *Diprionidae*, *Gilpinia polytoma*, *Hoplocampa* spp., *Lasius* spp., *Monomorium pharaonis*, *Neodiprion* spp., *Solenopsis* spp. and *Vespa* spp.; (l) *Diptera*, for example, *Aedes* spp., *Antherigona soccata*, *Bibio hortulanus*, *Calliphora erythrocephala*, *Ceratitis* spp., *Chrysomyia* spp., *Culex* spp., *Cuterebra* spp., *Dacus* spp., *Drosophila melanogaster*, *Fannia* spp., *Gastrophilus* spp., *Glossina* spp., *Hypoderma* spp., *Hyppobosca* spp., *Liriomyza* spp., *Lucilia* spp., *Melanagromyza* spp., *Musca* spp., *Oestrus* spp., *Orseolia* spp., *Oscinella frit*, *Pegomyia hyoscyami*, *Phorbia* spp., *Rhagoletis pomonella*, *Sciara* spp., *Stomoxys* spp., *Tabanus* spp., *Tannia* spp. and *Tipula* spp.; (m) *Siphonaptera*, for example, *Ceratophyllus* spp. and *Xenopsylla cheopis* and (n) from the order *Thysanura*, for example, *Lepisma saccharina*. The active ingredients according to the invention may further be used for controlling crucifer flea beetles (*Phyllotreta* spp.), root maggots (*Delia* spp.), cabbage seedpod weevil (*Ceutorhynchus* spp.) and aphids in oil seed crops such as canola (rape), mustard seed, and hybrids thereof, and also rice and maize. In a particular embodiment, the

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

Application of an effective pesticidal control amount of a supernatant, filtrate or extract containing a pesticidally active metabolite, or isolated compound produced by the
5 *Chromobacterium* sp. or application of combinations of the foregoing is provided. The strain or supernatant or filtrate or extract, metabolite and/or compound are applied, alone or in combination with another pesticidal substance, in an effective pest control or pesticidal amount. An effective amount is defined as that quantities of microorganism cells, supernatant, filtrate or extract, metabolite and/or compound alone or in combination with
10 another pesticidal substance that is sufficient to modulate pest infestation. The effective rate can be affected by pest species present, stage of pest growth, pest population density, and environmental factors such as temperature, wind velocity, rain, time of day and seasonality. The amount that will be within an effective range in a particular instance can be determined by laboratory or field tests.

15

EXAMPLES

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

Example 1: EXTRACTION OF COMPOUNDS FROM *CHROMOBACTERIUM SUBSTUGAE*

The following procedure is used for the purification of compounds extracted from
25 the culture of *Chromobacterium substugae*:

The culture broth derived from the 10-L fermentation *C. substugae* in L-broth is extracted with Amberlite XAD-7 resin (Asolkar et al., 2006) by shaking the cell suspension with resin at 225 rpm for two hours at room temperature. The resin and cell mass are collected by filtration through cheesecloth and washed with DI water to remove salts. The
30 resin, cell mass, and cheesecloth are then soaked for 2 h in acetone/methanol (50/50) after which the acetone/methanol is filtered and dried under vacuum using rotary evaporator to give the crude extract. The crude extract is then fractionated by using Sephadex LH 20 size exclusion chromatography (CH₂Cl₂/CH₃OH; 50/50) to give 7 fractions (FIG. 1). These

fractions are then concentrated to dryness using rotary evaporator and the resulting dry residues are screened for biological activity using a feeding assay with Cabbage looper (*Trichoplusia ni*) or Beet armyworm (*Spodoptera exigua*). The active fractions are then subjected to reversed phase HPLC (Spectra System P4000 (Thermo Scientific) to give pure compounds, which are then screened in above mentioned bioassays to locate/identify the active compounds. To confirm the identity of the compound, additional spectroscopic data such as LC/MS and NMR is recorded.

Chromamide A (**1**) and compound B were isolated from fractions 1 and 2 respectively, whereas violacein (**2**) & deoxyviolacein (**3**) were isolated from fraction 5, all of which were obtained from Sephadex LH 20 chromatography. The structures of these compounds are set forth in FIG. 7.

Purification of Compounds

Purification of chromamide A (**1**) was performed by using HPLC C-18 column (Phenomenex, Luna 10u C18(2) 100 A, 250 x 10), water:acetonitrile gradient solvent system (0-10 min, 80-75 % aqueous CH₃CN; 10-45 min, 75-60 % aqueous CH₃CN; 45-55 min, 60-50 % aqueous CH₃CN; 55-65 min, 50-100 % aqueous CH₃CN; 65-70 min, 100 % CH₃CN; 55-70 min, 0-80 % aqueous CH₃CN) at 2.5 mL/min flow rate and UV detection of 210 nm. The active compound chromamide A (**1**), has retention time 23.19 min.

Purification of invention compound B was performed by using HPLC C-18 column (Phenomenex, Luna 10u C18 (2) 100 A, 250 x 10), water:acetonitrile gradient solvent system (0-10 min, 80-75 % aqueous CH₃CN; 10-45 min, 75-60 % aqueous CH₃CN; 45-55 min, 60 - 50 % aqueous CH₃CN; 55-65 min, 50 - 100 % aqueous CH₃CN; 65-70 min, 100 % CH₃CN; 55-70 min, 0-80 % aqueous CH₃CN) at 2.5 mL/min flow rate and UV detection of 210 nm, the active compound B, retention time 26.39 min (see FIG. 6).

Purification of violacein (**2**) and deoxyviolacein (**3**) were performed by using HPLC C-18 column (Phenomenex, Luna 10u C18(2) 100 A, 250 x 10), water:acetonitrile gradient solvent system (0-10 min, 70-60 % aqueous CH₃CN; 10-40 min, 60 - 20 % aqueous CH₃CN; 40-60 min, 20 - 0 % aqueous CH₃CN; 60-65 min, 100 % CH₃CN; 65-75 min, 0-70 % aqueous CH₃CN) at 2.5 mL/min flow rate and UV detection of 210 nm, the active compounds violacein (**2**), had a retention time 7.86 min and deoxyviolacein (**3**) retention time 12.45 min.

Mass Spectroscopy Analysis of Compounds

Mass spectroscopy analysis of active peaks is performed on a Thermo Finnigan LCQ Deca XP Plus electrospray (ESI) instrument using both positive and negative ionization modes in a full scan mode (m/z 100-1500 Da) on a LCQ DECA XP^{plus} Mass Spectrometer (Thermo Electron Corp., San Jose, CA). Thermo high performance liquid chromatography (HPLC) instrument equipped with Finnigan Surveyor PDA plus detector, autosampler plus, MS pump and a 4.6 mm x 100 mm Luna C18 5 μ 100A column (Phenomenex). The solvent system consisted of water (solvent A) and acetonitrile (solvent B). The mobile phase begins at 10% solvent B and is linearly increased to 100% solvent B over 20 min and then kept for 4 min, and finally returned to 10% solvent B over 3 min and kept for 3 min. The flow rate is 0.5 mL/min. The injection volume was 10 μ L and the samples are kept at room temperature in an auto sampler. The compounds are analyzed by LC-MS utilizing the LC and reversed phase chromatography. Mass spectroscopy analysis of the present compounds is performed under the following conditions: The flow rate of the nitrogen gas was fixed at 30 and 15 arb for the sheath and aux/sweep gas flow rate, respectively. Electrospray ionization was performed with a spray voltage set at 5000 V and a capillary voltage at 35.0 V. The capillary temperature was set at 400°C. The data was analyzed on Xcalibur software. The chromamide A (**1**) has a molecular mass of 860 in positive ionization mode (see FIG. 2). The LC-MS chromatogram for another active compound B suggests a molecular mass of 874 in positive ionization mode. Violacein (**2**) and deoxyviolacein (**3**) had the molecular masses of 313 and 327 respectively in positive ionization mode.

NMR Spectroscopy Analysis of Compounds

NMR-NMR spectra were measured on a Bruker 600 MHz gradient field spectrometer. The reference is set on the internal standard tetramethylsilane (TMS, 0.00 ppm). The amino acid analyses were carried out on Hitachi 8800 amino acid analyzer.

For structure elucidation, the purified chromamide A with molecular weight 860 is further analyzed using a 600 MHz NMR instrument, and has ¹H NMR δ values at 8.89, 8.44, 8.24, 8.23, 7.96, 7.63, 6.66, 5.42, 5.36, 5.31, 5.10, 4.13, 4.07, 4.05, 3.96, 3.95, 3.88, 3.77, 3.73, 3.51, 3.44, 3.17, 2.40, 2.27, 2.11, 2.08, 2.03, 2.01, 1.97, 1.95, 1.90, 1.81, 1.68, 1.63, 1.57, 1.53, 1.48, 1.43, 1.35, 1.24, 1.07, 1.02, 0.96, 0.89, 0.88, 0.87, 0.80 (see FIG. 4) and has ¹³C NMR values of 173.62, 172.92, 172.25, 172.17, 171.66, 171.28, 170.45, 132.13,

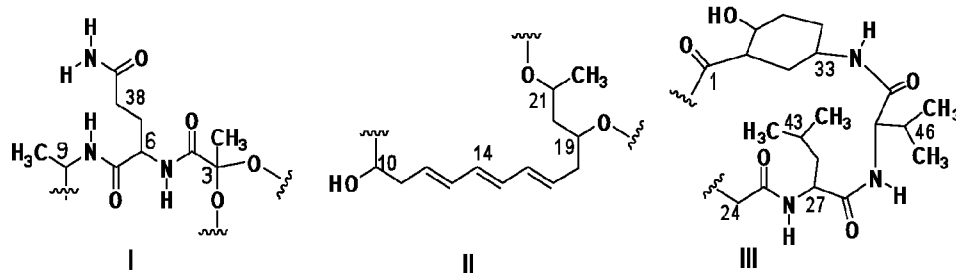
130.04, 129.98, 129.69, 129.69, 125.48, 98.05, 70.11, 69.75, 68.30, 68.25, 64.34, 60.94, 54.54, 52.82, 49.72, 48.57, 45.68, 40.38, 39.90, 38.18, 36.60, 31.98, 31.62, 31.58, 29.53, 28.83, 27.78, 24.41, 23.06, 22.09, 20.56, 19.31, 18.78, 17.66, 15.80 (see FIG. 5). The chromamide A was isolated as a white solid, which analyzed for the molecular formula

5 $C_{43}H_{68}N_6O_{12}$ (13 degrees of unsaturation), by ESI high-resolution mass spectrometry (obsd M^+ m/z 861.5376, calcd M^+ m/z 861.5343) (FIG. 3). The ^1H NMR spectral data of chromamide A in DMSO- d_6 exhibited 68 proton signals, in which nine protons [δ_H : 8.89, 8.44, 8.23, 8.22, 7.96, 7.64, 6.65, 5.10, 4.13], were assigned as either NH or OH due to lack of carbon correlation in a heteronuclear correlation NMR (HMQC) analysis. The ^{13}C NMR

10 spectrum, showed seven carbonyl signals [δ_C : 173.62, 172.92, 172.25, 172.17, 171.66, 171.28, 170.45] and in the ^1H NMR spectrum, six characteristic α -amino protons signals [δ_H : 4.07, 4.06, 3.96, 3.95, 3.88, 3.72] were observed which demonstrate that chromamide A is a peptide.

Interpretation of 2D NMR data led to the assignment of three amino acid units of the

15 six, one leucine (Leu), one valine (Val) and one glutamine (Gln). The presence of these amino acids were confirmed by results of amino acid analysis, which also showed the presence of the above three amino acids. Further analysis of DEPT and 2D NMR spectral data (COSY, HSQC and HMBC) established the presence three sub-structures I, II and III as showed below.



20

The connections of the three sub-structures in 1 were accomplished by routine HMBC NMR analysis using correlations between the α -amino proton and/or the secondary amide proton and the carbonyl carbon resonances and chemical shift consideration. The linkage of C-9 from sub-structure I to C-10 from sub-structure II was established by HMBC

25 correlations from CH_3 -40 [δ_H : 1.00] and the α -amino proton of alanine [δ_H : 3.42] to the C-10 carbon [δ_C : 70.11]. This was further confirmed by the three bond HMBC correlation from hydroxyl at [δ_H : 5.10] to C-9 at [δ_C : 49.78]. The methylene at [δ_H : 3.50] from sub-structure III showed a three bond HMBC correlation to C-19 [δ_C : 68.31] which connected

the sub-structure I and II. The quaternary carbon at C-3 [δ_C : 98.09] was connected to C-21 [δ_C : 64.40] through a weak correlation from H-21 [δ_H : 3.95] together with their chemical shift values to form a one ring system. Lastly, the ring closure linkage was secured by a three-bond HMBC correlation from H₃-36 [δ_H : 1.43] to C-1 [δ_C : 172.17], which allowed the planar structure of chromamide A (**1**) to be assigned.

The compound B with a molecular weight 874 exhibited similar NMR and UV data suggesting that this compound B also belongs to the class of peptide.

The structure for violacein (**2**) and deoxyviolacein (**3**) was assigned by comparison of the data of these compounds with those published in the literature. The structures of chromamide A, violacein and deoxyviolacein are shown in FIG. 7.

Example 2: Amino acids analysis of chromamide A

Chromamide A (0.05 mg) was hydrolyzed by using liquid phase hydrolysis (6N HCL, 1% Phenol, 110°C, 24 hr., in vacuum). After cooling, the reaction mixture was dried and the hydrolyzed product was dissolved in Norleu dilution buffer to 1.0 mL volume. A 50 μ l of the sample was loaded onto the ion-exchange column for analysis.

For standards and calibration, an amino acid standards solution for protein hydrolysate on the Na-based Hitachi 8800 (Sigma, A-9906) is used to determine response factors, and thus calibrate the Hitachi 8800 analyzer for all of the amino acids. Each injection contains NorLeucine as an internal standard to allow correction of the results for variations in sample volume and chromatography variables. System utilizes Pickering Na buffers, Pierce Sequanal grade HCl (hydrolysis), a Transgenomic Ion-Exchange column and an optimized method developed by Molecular Structure Facility (MSF), UC Davis, and the individual amino acid present in the sample are reported. The amino acids present in the sample (chromamide A) were found to be Glx (Glutamine/Glutamic acid), leu (leucine) and Val (Valine).

Example 3: Confirmation of toxicity on Cabbage looper (*Trichoplusia ni*)

Toxicity of the compound of interest in fraction 1 (F1) was confirmed in an *in vitro* assay using 1st instar cabbage looper larvae as a test object.

Two hundred microliters of commercial cabbage looper diet was distributed in each well of a 96-well microplate. After the diet had solidified, 100 μ L of solution containing 50 μ L of extract (corresponding to four individual peaks found in fraction 1; H1-H4), 350

uL EtOH and 600 uL sterile DI water was pipetted in each well, after which the plate was dried using a hand-held fan. The amount of extract in each well was 10 micrograms. Each treatment was replicated eight times, and a mixture of pure ethanol and water was used as a negative control.

- 5 One test insect (1st instar larvae of cabbage looper) was placed in each well, and the plate was covered with an adhesive seal. The seal was punctured for aeration, and the sealed plate was incubated at 26°C for four days.

The results presented in Table 1 below show good activity (>60% mortality) with a compound in peak H1. This particular peak corresponds with the chromamide A (1)

- 10 (FIG.1).

Table 1: Cabbage Looper Mortality (%) at 10 ug/well

F1 H1	66.7
F1 H2	11.1
F1 H3	33.3
F1 H4	11.1

Example 4 - Determination of LC₅₀ for violacein for Cabbage looper (*Trichoplusia ni*)

- The 96-well plate assay system described in the previous example was used to determine the concentration of pure violacein needed to kill 50% of the 1st instar cabbage
 20 looper larvae. The mortality values recorded after 4 days of incubation at 26 °C are presented in Table 2 below. Based on the data, violacein is a potent insecticide with an estimated LC₅₀ value of $7 * 10^{-6}$ micrograms per well for cabbage looper larvae in an *in vitro* diet-overlay assay.

Table 2. Effect of Violacein on Cabbage Looper Mortality

Violacein ug/well	% mortality Day4
10	100
1	100
0.1	100
0.01	100
0.001	100
0.0001	100
0.00001	71.4
0.000001	14.2
1E-07	0

EXAMPLE 5 – Nematicidal activity of *Chromobacterium substugae* (MBI-203) broth on Juvenile Root-Knot Nematodes

To assess the effect of filter-sterilized *C. substugae* on the motility (and subsequent recovery) of juvenile (J2) root-knot nematodes (*Meloidogyne incognita* VW6), the

5 following test was conducted on 24-well plastic cell-culture plates:

A 300-ul aliquot of each test solution (either 1x or 0.1x filter-sterilized broth) was added into appropriate wells after which, fifteen nematodes dispensed in 10 ul of DI water were added into each well, plate was closed with a lid, and incubated at 25°C for 24 hours. Water and Avid (avermectin) at 20,000x dilution were used as negative and positive
10 controls, respectively. Effect of each compound on nematode mobility was checked after 24 hours by probing each nematode with a needle, and the proportion of immobile nematodes in each treatment was recorded in a notebook using a % scale. To assess the recovery of mobility in each treatment, a volume of 200 ul was removed from each well, and the remaining solution in each well was diluted by adding 2 mL of DI water. Plates were again
15 incubated for 24 hours as described above, after which the second mobility evaluation (48 – hour) was performed.

The results presented in FIGS. 8 and 9 show that the undiluted filter-sterilized broth can immobilize the free-living juvenile root-knot nematodes. This effect lasts at least for 48-hours, which suggests that *C. substugae* broth has nematicidal activity.

Example 6: Effect of *Chromobacterium substugae* (MBI-203) broth on Galling of Cucumber Roots

MBI-203 was tested for its intrinsic activity against the root knot nematode *Meloidogyne sp.* in two mini drench tests.

Materials and Methods

Specifically MBI-203 was tested in a greenhouse assay conducted in 45 ml pots. Cucumber seeds cv. Toshka were sown directly into pots filled with a sandy loam soil. Ten days later pots were each treated with 5 ml of a suspension. Hereafter, pots were inoculated
30 with 3000 eggs of *M. incognita*. Four replicates were prepared for each treatment and rate. The trial was harvested fourteen days after trial application and inoculation. Root galling was assessed according to Zeck's gall index (Zeck, 1971). Specific conditions are set forth below in Table 3.

Phytotoxicity was measured as a reduction of growth of the emerged cucumber seedling in comparison to the control.

Table 3

	MBI-203
	Fosthiazate (Standard, EC 150)
Test species	<i>Meloidogyne sp.</i> applied at 3000 eggs per mini drench pot (in 2 ml)
Test plant	<i>Cucumis sativus</i> (cucumber cv. Toschka)
Test formulation	MBI-203 = 96% liquid formulation
Test concentrations for MBI-203	Mini-drench test #1: 100, 50 ml/L Mini-drench test #2: 50, 25, 12.5, 6, 3, 1.5 ml/L
Test application	Drench application

5 Results

Mini Drench Test no. 1

The activity of the treatments was very high and a reduction of almost 100% was observed when applied at a concentration of 50 ml/L (MBI- 203). Minor phytotoxicity was observed for MBI-203. Fosthiazate performed as usual (100% control at 20 ppm).

10 *Mini Drench Test no. 2*

MBI-203 showed phytotoxicity at the highest concentrations of 50 and 25 ml/L and assessments could not be made at these rates.

At a concentration of 12.5 ml/L nematode control was over 95% which decreased to 33% at 3 ml/L. At a rate of 1.5 ml/L no activity was recorded.

15 Fosthiazate performed as usual (100% control at 20 ppm).

Example 8: Synergistic Studies with *Chromobacterium substugae* (MBI-203) broth

Synergy tests were performed by treating artificial diet in 96-well plates and feeding treated diet to neonate larvae. 100 µL of treatment were pipetted into multiple wells of each plate. MBI-203 (whole cell broth concentrated to 7.6% dry cell weight) alone, the commercial insecticide alone, and the combination of the 2 were tested using predetermined LC₅₀ concentrations or fractions thereof. The diet was fan-dried to remove excess moisture. Neonate Beet Armyworm, *Spodoptera exigua*, or Cabbage Loopers, *Trichoplusia ni*, were transferred into each well of the multi-well plate. Infested plates were covered with adhesive plate sealer and a single small hole was poked into the sealer over each well to

allow for aeration. Plates were stored in an incubator at 26°C, 16h light/8h dark cycle for 3 days. On the third and fourth day after infesting, mortality was scored.

The determination of a synergistic, antagonistic, or additive interaction was determined using the methods from (Colby 1967). Due to variation in bioassays, it was determined that ratios between 0 and 0.9 would be considered antagonistic, 0.9 – 1.1 ratios would be additive, and ratios above 1.1 would be considered synergistic relationships.

MBI-203 synergy with insecticides against Cabbage Loopers was tested.

Chlorantranilipole (marketed as Coragen®, Dupont), *Bacillus thuringiensis var. kurstaki* (Dipel®, Valent Biosciences), Spinosad (marketed as Entrust®, Dow Agro Sciences), Spirotetramet (marketed as Movento®, Bayer Crop Science) and Pyrethrum/pyrethrins (marketed as Pyganic®, Arbico Organics) were tested with MBI-203. As noted above, except where indicated, LC₅₀ concentrations of MBI-203 and insecticides were used. The results are shown in Table 4. All, but Bt var. kurstaki and 1 instance of LC₅₀ concentration showed synergism.

Table 4: MBI-203 +Insecticide: Effect on cabbage loopers

Product	MBI-203 alone Kill %	Product alone Kill %	Calculated Combo Kill %	Actual Combo Kill %	Ratio	Defined relation ^a
Chlorantranilipole	21	3	23.4	33.3	1.42	syn
Bt var. kurstaki	61.7	89.6	96	100	1.04	add
Spinosad	41.5	54.3	72.99	100.00	1.37	syn
Spirotetramet	87.9	23.8	86.34	89.87	1.04	add
Spirotetramet (0.5X LC ₅₀); MBI-203 (0.3X LC ₅₀)	90.6	41.5	91.90	94.94	1.03	add
Pyrethrum	19.7	2.8	21.93	55.37	2.53	syn

^a syn=synergistic; add= additive

MBI-203 synergy with insecticides against Beet Army Worm (BAW) was tested.

Chlorantranilipole (marketed as Coragen®, Dupont), *Bacillus thuringiensis var. kurstaki* (Dipel®, Valent Biosciences), Spinosad (marketed as Entrust®, Dow Agro Sciences), Spirotetramet (marketed as Movento®, Bayer Crop Science) and Pyrethrum/pyrethrins (marketed as Pyganic®, Arbico Organics) were tested with MBI-203. As noted above, except where indicated, LC₅₀ concentrations of MBI-203 and insecticides were used. The results are shown in Table 5. MBI-203 and Chlorantranilipole interacted additively while *Bacillus thuringiensis var. kurstaki* and Spinosad showed synergistic control of BAW with MBI-203. Pyrethrum combinations with MBI-203 were antagonistic. Spirotetramet and MBI-203 combinations were primarily antagonistic against Beet Armyworm.

Table 5: MBI-203 +Insecticide: Effect on Beet Armyworm

Product	MBI-203 alone Kill %	Product alone Kill %	Calculated Combo Kill %	Actual Combo Kill %	Ratio	Defined relation^a
Chlorantranilipole	11.6	9.1	19.69	19.9	1.01	add
Bt var. kurstaki	24.5	19.8	39.4	68.3	1.73	syn
Spinosad	23.8	68.7	83.33	100	1.2	syn
Spirotetramet	0	21.6	36.10	27.60	0.76	antag
Spirotetramet (0.53X LC ₅₀); MBI-203 (0.7X LC ₅₀)	0	42.9	38.55	41.67	1.08	add
Spirotetramet	21.4	53.3	60.57	53.70	0.89	antag
Spirotetramet (1.4X LC ₅₀); MBI-203 (1.2X LC ₅₀)	10	77.5	78.22	41.23	0.53	antag
Pyrethram	14.4	74.5	78.17	12.16	0.16	antag
Pyrethram	70.7	11.1	73.97	27.78	0.38	antag

^a syn=synergistic; add= additive; antag=antagonistic

Although this invention has been described with reference to specific embodiments,
 5 the details thereof are not to be construed as limiting, as it is obvious that one can use
 various equivalents, changes and modifications and still be within the scope of the present
 invention.

Various references are cited throughout this specification, each of which is
 incorporated herein by reference in its entirety.

References

- Asolkar, R. N., Jensen, P. R., Kauffman, C. A., Fenical, W. 2006. Daryamides A-C, Weakly Cytotoxic Polyketides from a Marine-Derived Actinomycete of the Genus *Streptomyces* strain CNQ-085 *J. Nat. Prod.* 69:1756-1759.
- Arena, J. P., K. K. Liu, et al. (1995). "The mechanism of action of avermectins in *Caenorhabditis elegans* - correlation between activation of glutamate-sensitive chloride current, membrane binding and biological activity." *Journal of Parasitology* **81**: 286-294.
- Balibar, C.J. and C.T. Welsh (2006). "In Vitro Biosynthesis of Violacein from L-Tryptophan by the Enzymes VioA-E from *Chromobacterium violaceum*." *Biochemistry* **45**: 15444-15457.
- Chalvet-Monfray, K., P. Sabatier, et al. (1996). "Synergy between deltamethrin and prochloraz in bees: Modeling approach." *Environmental Toxicology and Chemistry* **15**(4): 525-534.
- Chitwood, D. J. (2003). Nematicides. *Encyclopedia of Agrochemicals*, vol 3. J. R. Plimmer. New York, John Wiley & Sons. **3**: 1104-1115.
- Colby, S. R. (1967). "Calculating Synergistic and Antagonistic Responses of Herbicide Combinations." *Weeds* **15**(1): 20-22.
- Durán, N., G. Z. Justo, et al. (2007). "Minireview. Violacein: properties and biological activities." *Biotechnol. Appl. Biochem.* **48**: 127-133.
- Durán, N. and C. F. M. Menck (2001). "*Chromobacterium violaceum*: a review of pharmacological and industrial perspectives." *Crit. Rev. Microbiol.* **27**: 201-222.
- Farenhorst, M., B. G. J. Knols, et al. (2010). "Synergy in Efficacy of Fungal Entomopathogens and Permethrin against West African Insecticide-Resistant *Anopheles gambiae* Mosquitoes." *PLoS ONE* **5**(8): e12081.

Hoshino, T., T. Takano, et al. (1987). "Biosynthesis of violacein: origins of the hydrogen, nitrogen and oxygen atoms in the 2-pyrrolidone nucleus." Agric. Biol. Chem. **51**: 2733-2741.

5 Hummelbrunner, L. A. and M. B. Isman (2001). "Acute, Sublethal, Antifeedant, and Synergistic Effects of Monoterpenoid Essential Oil Compounds on the Tobacco Cutworm, *Spodoptera litura* (Lep., Noctuidae)." Journal of Agricultural and Food Chemistry **49**(2): 715-720.

10 Hungria, M., S. Astolfi-Filho, et al. (2005). "Genetic characterization of *Chromobacterium* isolates from black water environments in the Brazilian Amazon." Lett. Appl. Microbiol. **41**: 17-23.

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

Kämpfer, P., H.-J. Busse, et al. (2009). "*Chromobacterium piscinae* sp. nov. and *Chromobacterium pseudoviolaceum* sp. nov., from environmental samples." Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **59**: 2486-2490.

20 Martin, P. A. W., D. Gundersen-Rindal, et al. (2007a). "*Chromobacterium substugae* sp. nov., a betaproteobacterium toxic to Colorado potato beetle and other insect pests." Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **57**: 993-999.

25 Martin, P.A., A.D.S. Shropshire, et al., (2007b). " *Chromobacterium substugae* sp. nov for control of insect pests" U.S. Patent No. 7244607 B2.

Martin, P.A.W., Hirose, E., and Aldrich, J.R. 2007c. " Toxicity of *Chromobacterium substugae* to southern green stink bug (Heteroptera:Pentatomidae) and corn rootworm (Coleoptera:Chrysomelidae)". J. Econ. Entomol. 100: 680-684.

30 Martin, P. A. W. (2004). "A freeze-dried diet to test pathogens of Colorado potato beetle." Biological Control **29**(1): 109-114.

McClean, K. H., M. K. Winson, et al. (1997). "Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of N-acyl homoserine lactones" Microbiology **143**: 3703-3711.

5

Meunier, L., P. Carubel, et al. (1999). Insecticidal combinations including an insecticide from the family chloronicotinyl family and an insecticide having pyrazole, pyrrole, or phenylimidazole group. U. States. United States, Rhone-Poulenc Agrochimie: 6.

10 Pederson, M. and H. S. Woldum. Synergistic Combination of Glutamate-and-Gaba-Gated Chloride Against Pesticide and at Least One Vitamin E, Niacin, or Derivatives Thereof, US 2009/0111579, published April 30 2009..

15 Puritch, G. and G. Salloum. Environmentally Safe Insecticide, US 5047424, issued September 10, 1991..

Shapiro-Ilan, D. I., T. E. Cottrell, et al. (2011). "Effects of combining microbial and chemical insecticides on mortality of the Pecan Weevil (Coleoptera: Curculionidae)." J Econ Entomol **104**(1): 14-20

20

Ryan, K. S. and C. L. Drennan (2009). "Divergent pathways in the biosynthesis of bisindole natural products." Chemistry&Biology **16**: 351-364.

25 Shapiro-Ilan, D. I., T. E. Cottrell, et al. (2011). "Effects of combining microbial and chemical insecticides on mortality of the Pecan Weevil (Coleoptera: Curculionidae)." J Econ Entomol **104**(1): 14-20.

Thompson, G. D., R. Dutton, et al. (2000). "Spinosad - a case study: an example from a natural products discovery programme." Pest Management Science **56**: 696-702.

30

Whitehead, A. G. (1998). Plant nematode control. Wallingford, UK, CAB International.

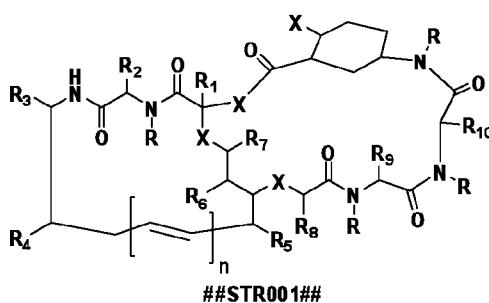
35 Wirth, M. C., J. A. Jiannino, et al. (2004). "Synergy between Toxins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and *Bacillus sphaericus*." Journal of Medical Entomology **41**: 935-941.

Young, C.-C., A. B. Arun, et al. (2008). "*Chromobacterium aquaticum* sp. nov., isolated from spring water samples." Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **58**: 877-880.

- Zeck W.M. (1971) Ein Bonitierungs-schema zur Felddauswertung von Wurzelgallenbefall.
5 Pflanzenschutznachrichten Bayer 24,1: 144-147.

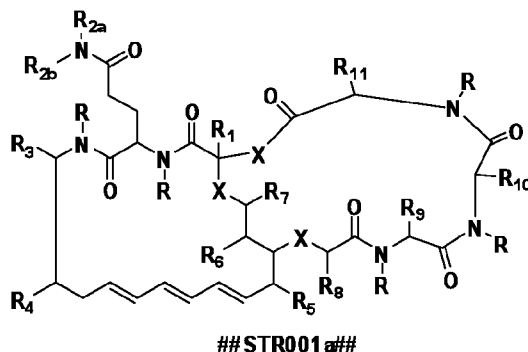
WHAT IS CLAIMED IS:

1. A compound that (a) has pesticidal activity; (b) has a molecular weight of about 840-900 as determined by Liquid Chromatography/Mass Spectroscopy (LC/MS) and (c) has an High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) retention time of about 7-12 minutes on a reversed phase C-18 HPLC column using a water:acetonitrile (CH₃CN) gradient solvent system (0-20 min; 90 - 0 % aqueous CH₃CN, 20-24 min; 100% CH₃CN, 24-27 min; 0 - 90 % aqueous CH₃CN, 27-30 min; 90% aqueous CH₃CN) at 0.5 mL/min flow rate and UV detection of 210 nm and (d) is optionally obtainable from a *Chromobacterium* species.
2. The compound according to claim 1, wherein said compound has 43 carbons, seven methyl, ten methylene carbons, twelve methines, 6 olefinic methines, eight quaternary carbons as determined by ¹³C NMR.
3. The compound according to claim 1, wherein said compound (i) has a molecular weight of about 840-890 as determined by Liquid Chromatography/Mass Spectroscopy (LC/MS); (ii) has ¹H NMR values of about δ 8.89, 8.44, 8.24, 8.23, 7.96, 7.63, 6.66, 5.42, 5.36, 5.31, 5.10, 4.13, 4.07, 4.05, 3.96, 3.95, 3.88, 3.77, 3.73, 3.51, 3.44, 3.17, 2.40, 2.27, 2.11, 2.08, 2.03, 2.01, 1.97, 1.95, 1.90, 1.81, 1.68, 1.63, 1.57, 1.53, 1.48, 1.43, 1.35, 1.24, 1.07, 1.02, 0.96, 0.89, 0.88, 0.87, 0.80 and (iii) has ¹³C NMR values of about δ 173.62, 172.92, 172.25, 172.17, 171.66, 171.28, 170.45, 132.13, 130.04, 129.98, 129.69, 129.69, 125.48, 98.05, 70.11, 69.75, 68.30, 68.25, 64.34, 60.94, 54.54, 52.82, 49.72, 48.57, 45.68, 40.38, 39.90, 38.18, 36.60, 31.98, 31.62, 31.58, 29.53, 28.83, 27.78, 24.41, 23.06, 22.09, 20.56, 19.31, 18.78, 17.66, 15.80.
4. The compound according to claim 1, wherein the compound is selected from the group consisting of
- (A) a compound having the structure ##STR001##



or a pesticidally acceptable salt or stereoisomers thereof, wherein R is -H, lower chain alkyl containing 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 or 9 alkyl moieties, aryl or arylalkyl moiety, substituted lower alkyl; n is 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 or 9; X is O, NH, NR or S; R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7, R8, R9, R10 are each independently H, are the same or different and independently an amino acid side-chain moiety or an amino acid side-chain derivative, alkyl, substituted alkyl, alkenyl, substituted alkenyl, alkynyl, substituted alkynyl, aryl, substituted aryl, heteroaryl, substituted heteroaryl, heterocyclic, substituted heterocyclic, cycloalkyl, substituted cycloalkyl, alkoxy, substituted alkoxy, thioalkyl, substituted thioalkyl, hydroxy, halogen, amino, amido, carboxyl, -C(O)H, acyl, oxyacyl, carbamate, sulfonyl, sulfonamide, or sulfonyl;

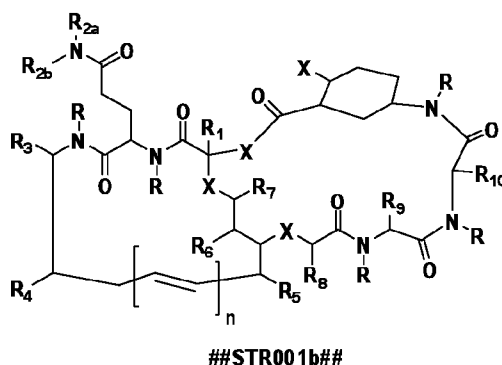
(B) a compound having the structure ##STR001a##



wherein R is -H, lower chain alkyl containing 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 or 9 alkyl moieties, aryl or arylalkyl moiety, substituted lower alkyl; X is O, NH, NR or S; R2a, R2b are independently selected from the group consisting of -H, alkyl, lower-alkyl, substituted alkyl and substituted lower-alkyl; R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7, R8, R9, R10, R11 are each independently H, are the same or different and independently an amino acid side-chain moiety or an amino acid side-chain derivative, alkyl, substituted alkyl, alkenyl, substituted alkenyl, alkynyl, substituted alkynyl, aryl, substituted aryl, heteroaryl, substituted heteroaryl, heterocyclic, substituted heterocyclic, cycloalkyl, substituted

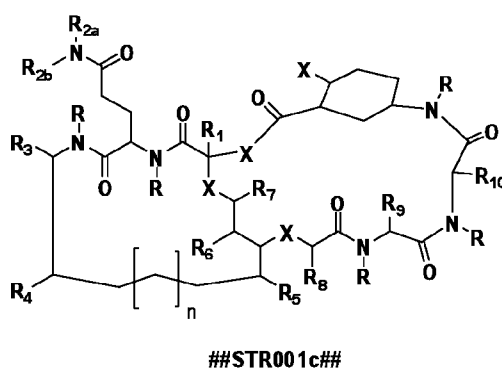
cycloalkyl, alkoxy, substituted alkoxy, thioalkyl, substituted thioalkyl, hydroxy, halogen, amino, amido, carboxyl, -C(O)H, acyl, oxyacyl, carbamate, sulfonyl, sulfonamide, or sulfuryl;

(C) a compound having the structure ##STR001b##



wherein R is -H, lower chain alkyl, aryl or aryl alkyl moiety, substituted lower alkyl; X is O, NH, NR or S; n is 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 or 9; R_{2a}, R_{2b} are independently selected from the group consisting of -H, alkyl, lower-alkyl, substituted alkyl and substituted lower-alkyl; R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, R₇, R₈, R₉, R₁₀, R₁₁ are each independently H, are the same or different and independently an amino acid side-chain moiety or an amino acid side-chain derivative, alkyl, substituted alkyl, alkenyl, substituted alkenyl, alkynyl, substituted alkynyl, aryl, substituted aryl, heteroaryl, substituted heteroaryl, heterocyclic, substituted heterocyclic, cycloalkyl, substituted cycloalkyl, alkoxy, substituted alkoxy, thioalkyl, substituted thioalkyl, hydroxy, halogen, amino, amido, carboxyl, -C(O)H, acyl, oxyacyl, carbamate, sulfonyl, sulfonamide, or sulfuryl;

(D) a compound having the structure ##STR001c##



wherein R is -H, lower chain alkyl, aryl or aryl alkyl moiety, substituted lower alkyl containing 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 or 9 alkyl moieties; X is O, NH, NR or S; n is 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 or 9; R_{2a}, R_{2b} are independently selected from the group consisting of -H, alkyl, lower-alkyl, substituted alkyl and substituted lower-alkyl; R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, R₇,

R₈, R₉, R₁₀, R₁₁ are each independently H, are the same or different and independently an amino acid side-chain moiety or an amino acid side-chain derivative, alkyl, substituted alkyl, alkenyl, substituted alkenyl, alkynyl, substituted alkynyl, aryl, substituted aryl, heteroaryl, substituted heteroaryl, heterocyclic, substituted heterocyclic, cycloalkyl, substituted cycloalkyl, alkoxy, substituted alkoxy, thioalkyl, substituted thioalkyl, hydroxy, halogen, amino, amido, carboxyl, -C(O)H, acyl, oxyacyl, carbamate, sulfonyl, sulfonamide, or sulfuryl.

5. A composition comprising (A) at least one of (i) the compound of claim 1; (ii) a compound having the following characteristics: (a) has pesticidal properties; (b) has a molecular weight of about 315-360 as determined by Liquid Chromatography/Mass Spectroscopy (LC/MS); (c) has an High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) retention time of about 8-15 minutes on a reversed phase C-18 HPLC column using a water:acetonitrile (CH₃CN) with a gradient solvent system (0-20 min; 90 - 0 % aqueous CH₃CN, 20-24 min; 100% CH₃CN, 24-27 min; 0 - 90 % aqueous CH₃CN, 27-30 min; 90% aqueous CH₃CN) at 0.5 mL/min flow rate and UV detection of 210 nm comprising and (d) is optionally obtainable from a *Chromobacterium* species and (B) at least one of (i) a second substance, wherein said second substance is a chemical or biological pesticide and (ii) at least one of a carrier, diluent, surfactant, or adjuvant.

7. A method for obtaining a compound selected from the group consisting of (i) the compound of claim 1 and (ii) a compound having the following characteristics: (a) has pesticidal properties; (b) has a molecular weight of about 315-360 as determined by Liquid Chromatography/Mass Spectroscopy (LC/MS) and (c) has an High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) retention time of about 8-15 minutes on a reversed phase C-18 HPLC column using a water:acetonitrile (CH₃CN) with a gradient solvent system (0-20 min; 90 - 0 % aqueous CH₃CN, 20-24 min; 100% CH₃CN, 24-27 min; 0 - 90 % aqueous CH₃CN, 27-30 min; 90% aqueous CH₃CN) at 0.5 mL/min flow rate and UV detection of 210 nm comprising:

(A) culturing a strain of a *Chromobacterium* sp. in a whole cell broth under conditions sufficient to produce said compound;

(B) isolating said compound produced in (A) from said whole cell broth.

7. The method according to claim 7, wherein said compound produced in step (A) is isolated by (a) applying the whole cell broth to at least one of an ion exchange column, a size exclusion column or a reversed phase HPLC column to obtain column fractions; (b) assaying the column fractions for pesticidal activity and (c) concentrating column fractions of (b) to obtain isolated compound.
8. A method for modulating pest infestation in a plant comprising applying to the plant and/or seeds thereof and/or substrate used for growing said plant an amount of (A) at least one of: (i) the compound of claim 1; (ii) a compound having the following characteristics: (a) has pesticidal properties; (b) has a molecular weight of about 315-360 as determined by Liquid Chromatography/Mass Spectroscopy (LC/MS); (c) has an High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) retention time of about 8-15 minutes on a reversed phase C-18 HPLC column using a water:acetonitrile (CH_3CN) with a gradient solvent system (0-20 min; 90 - 0 % aqueous CH_3CN , 20-24 min; 100% CH_3CN , 24-27 min; 0 - 90 % aqueous CH_3CN , 27-30 min; 90% aqueous CH_3CN) at 0.5 mL/min flow rate and UV detection of 210 nm and (d) is optionally obtainable from a strain of *Chromobacterium* species and (B) optionally another pesticidal substance effective to modulate said pest infestation.
9. The method according to claim 8, wherein said compound used in said method (I) has at least one of: (a) a molecular weight of about 343 as determined by Liquid Chromatography/Mass Spectroscopy (LC/MS) and (b) an HPLC retention of about 10 minutes on said C-18 reversed phase HPLC column or (II) has at least one of: (a) a molecular weight of about 327 as determined by Liquid Chromatography/Mass Spectroscopy (LC/MS) and (b) an HPLC retention of about 12 minutes on said C-18 reversed phase HPLC column.
10. The method according to claim 8, wherein said compound is selected from the group consisting of chromamide A, violacein and deoxyviolacein.
11. A method for modulating nematode infestation in a plant comprising applying to the plant and/or seeds thereof and/or substrate used for growing said plant an amount of a supernatant, filtrate and/ or extract and/or one or more metabolites of said supernatant, filtrate and/ or extract of a strain of *Chromobacterium sp.* and optionally another

nematocidal substance in an amount effective to modulate said nematode infestation.

12. A pesticidal combination synergistic to at least one pest comprising as active components: (a) a supernatant, filtrate and/ or extract of a strain of *Chromobacterium sp.*

5 and (b) another pesticidal substance, wherein (a) and (b) are present in synergistic amounts.

13. The combination according to claim 12, wherein said pest is a nematode pest.

14. The combination according to claim 12, wherein said pesticidal substance is (a) derived
10 from a microorganism; (b) a natural product or (b) a chemical compound.

15. The combination according to claim 12, wherein said pesticidal substance is derived from a microorganism and is selected from the group consisting of *Bacillus sp.* and spinosad.

15

16. The combination according to claim 12, wherein said pesticidal substance is a chemical insecticide selected from the group consisting of pyrethrins, spirotetramet and an anthranilic diamide.

20 17. The combination according to claim 12, wherein said combination is a composition.

18. A method for synergistically modulating infestation of at least one pest strain in a plant comprising applying to the plant and/or seeds thereof and/or substrate used for growing said plant an amount of a combination of claim 13 effective to synergistically modulate

25 infestation of at least one pest in a plant.

19. Use of a compound selected from the group consisting of (i) the compound of claims 1-4; (ii) a compound having the following characteristics: (a) has pesticidal properties; (b) has a molecular weight of about 315-360 as determined by Liquid Chromatography/Mass

30 Spectroscopy (LC/MS); (c) has an High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) retention time of about 8-15 minutes on a reversed phase C-18 HPLC column using a water:acetonitrile (CH₃CN) with a gradient solvent system (0-20 min; 90 - 0 % aqueous CH₃CN, 20-24 min; 100% CH₃CN, 24-27 min; 0 - 90 % aqueous CH₃CN, 27-30 min; 90%

aqueous CH₃CN) at 0.5 mL/min flow rate and UV detection of 210 nm comprising and (d) is optionally obtainable from a *Chromobacterium* species for formulating a composition for modulating pest infestation in a plant.

FIG. 1

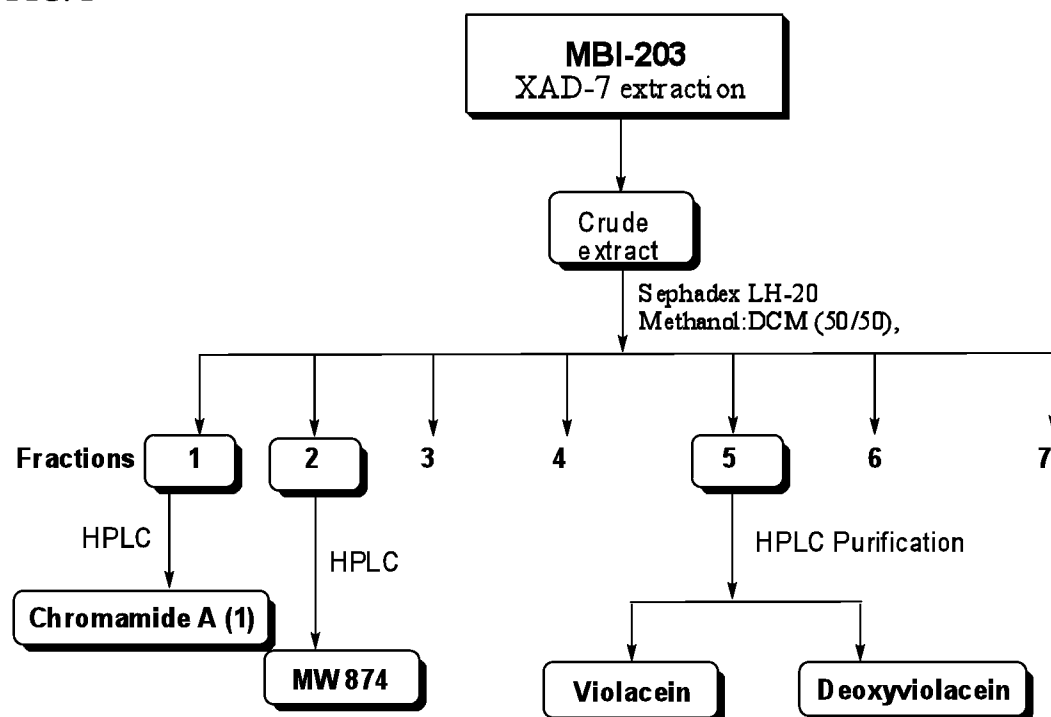


FIG. 2

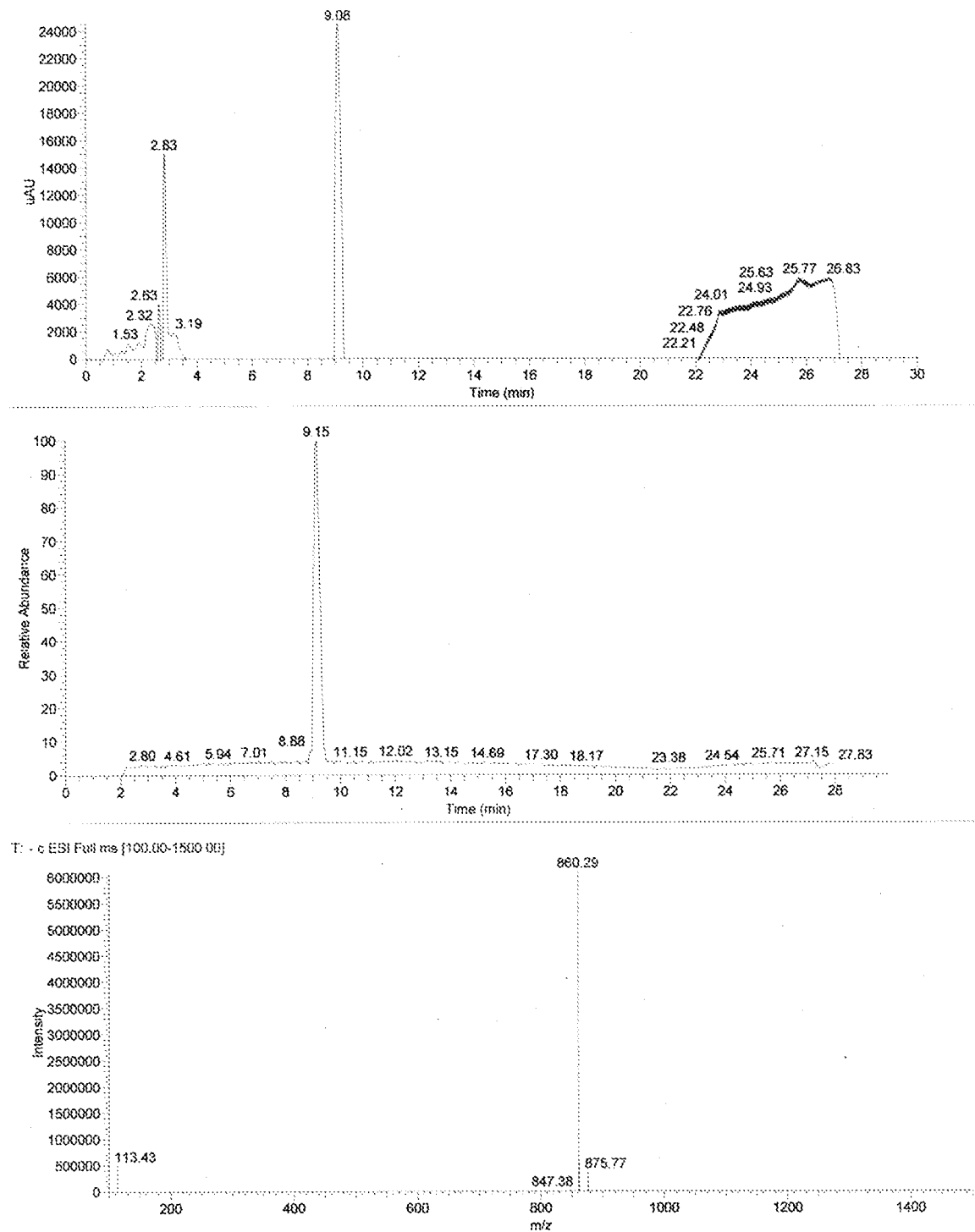


FIG. 3

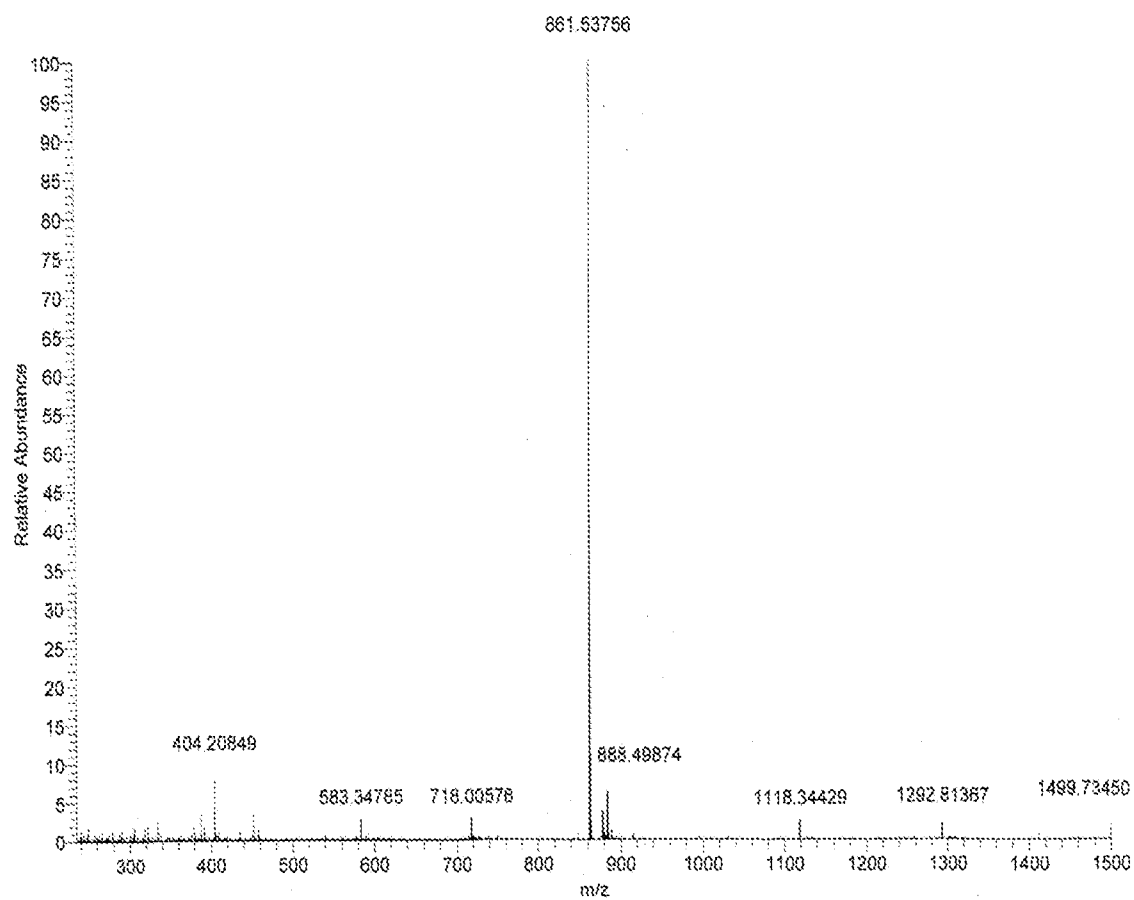


FIG. 4

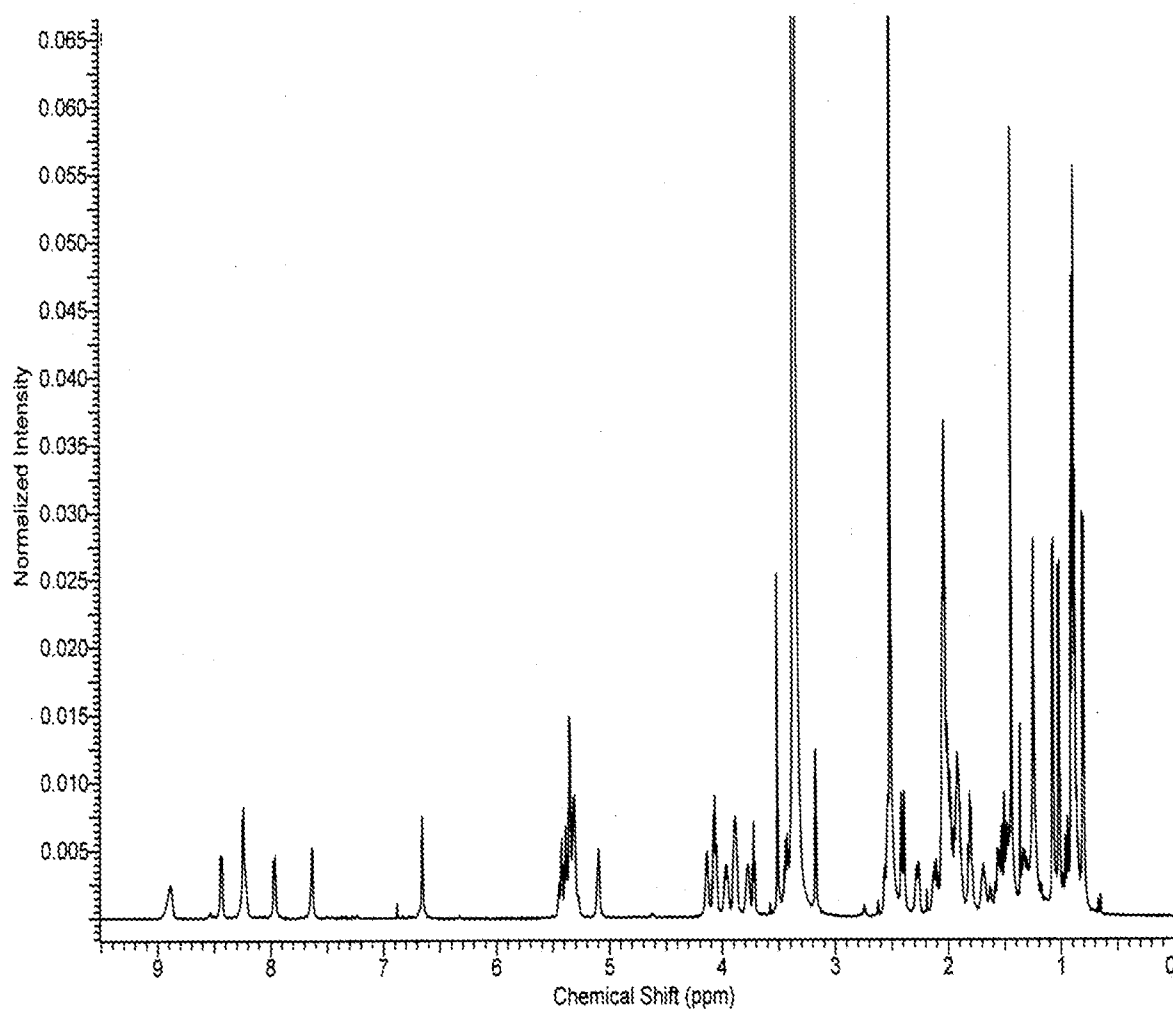


FIG. 5

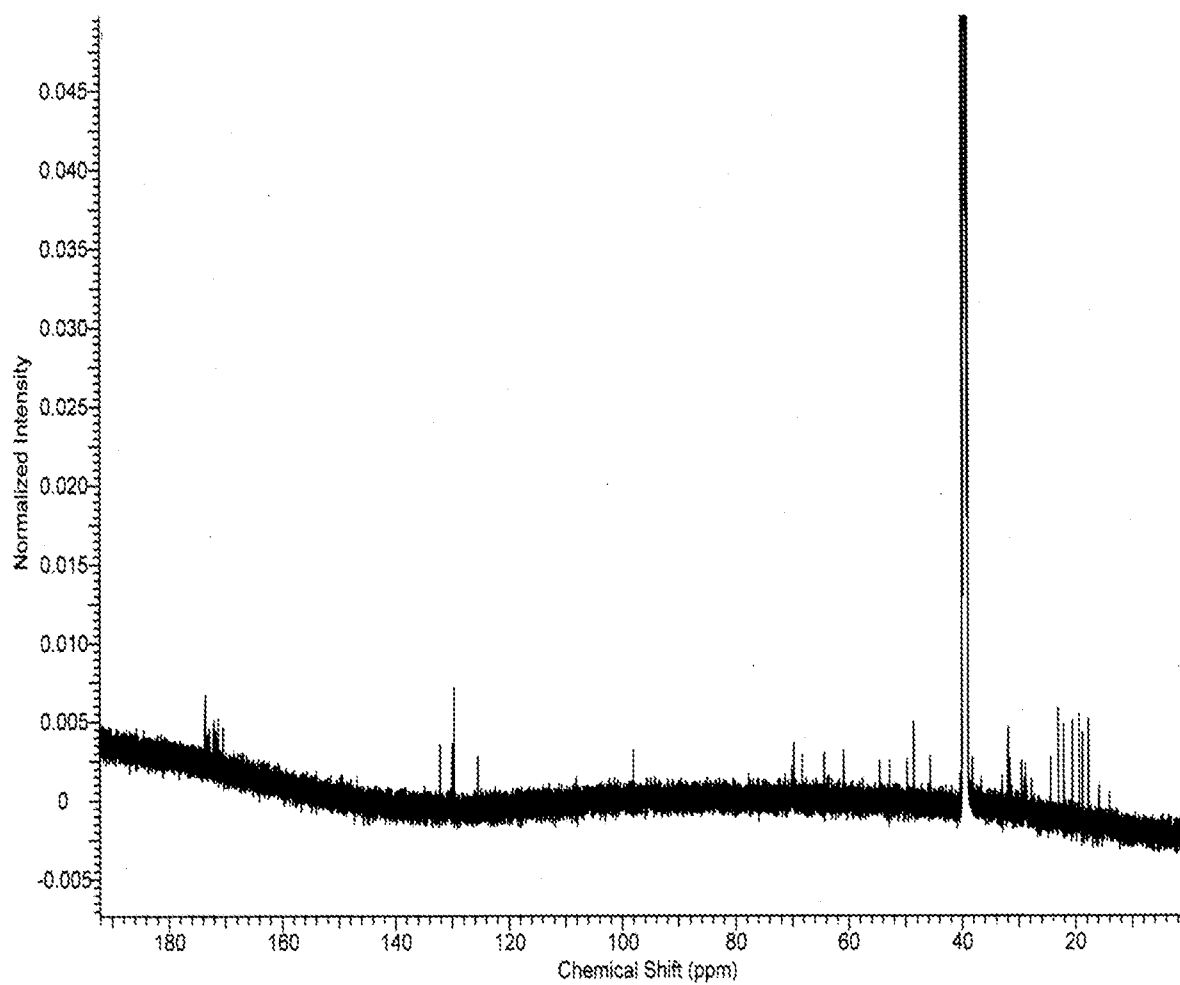


FIG. 6

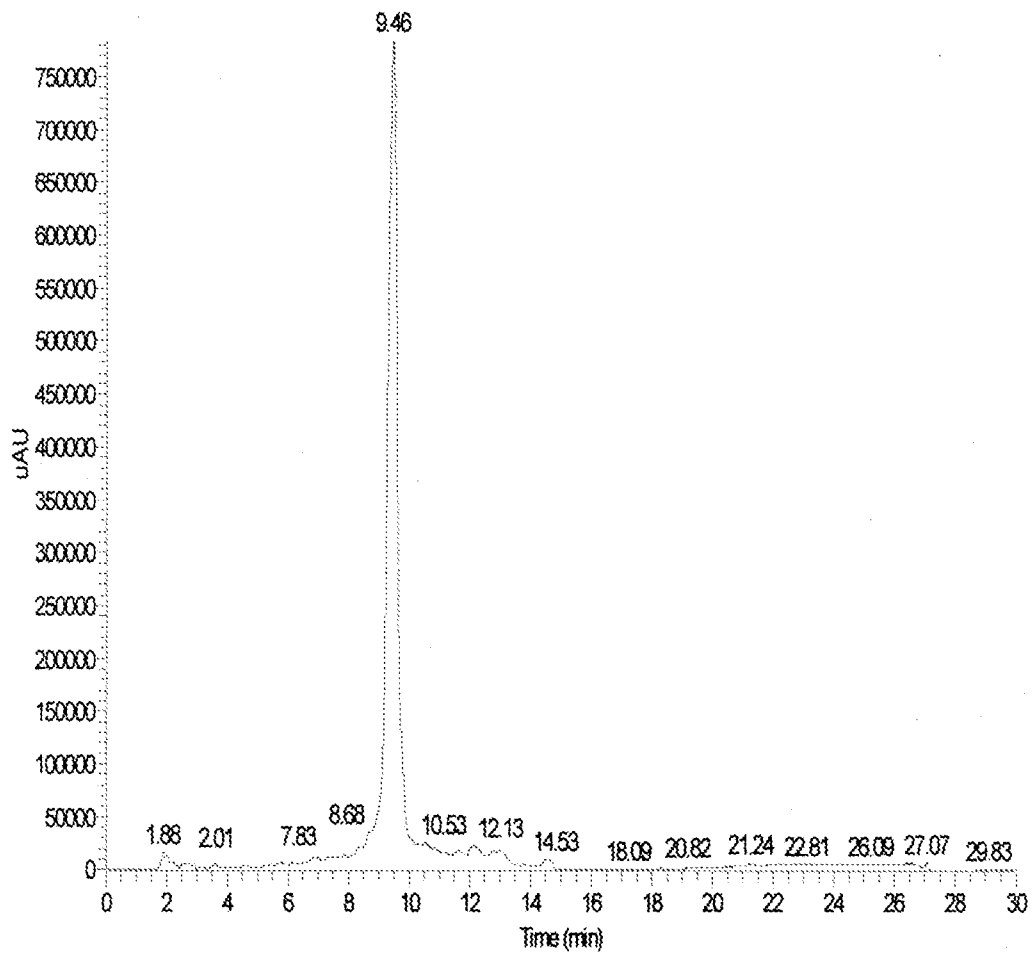


FIG. 7

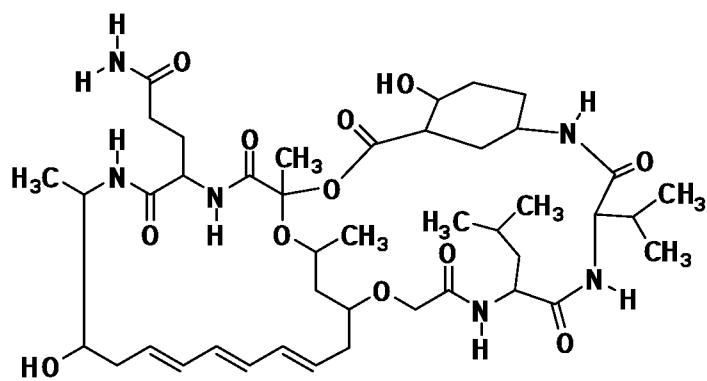
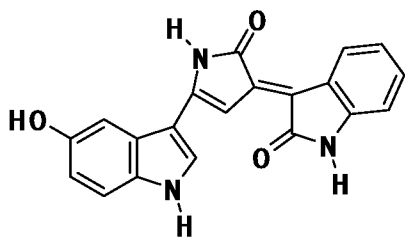
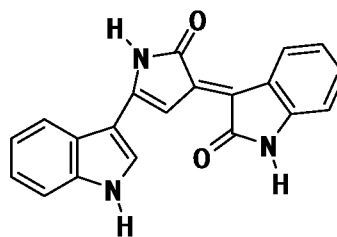
**Chromamide A (1)****Violacein (2)****Deoxyviolacein (3)**

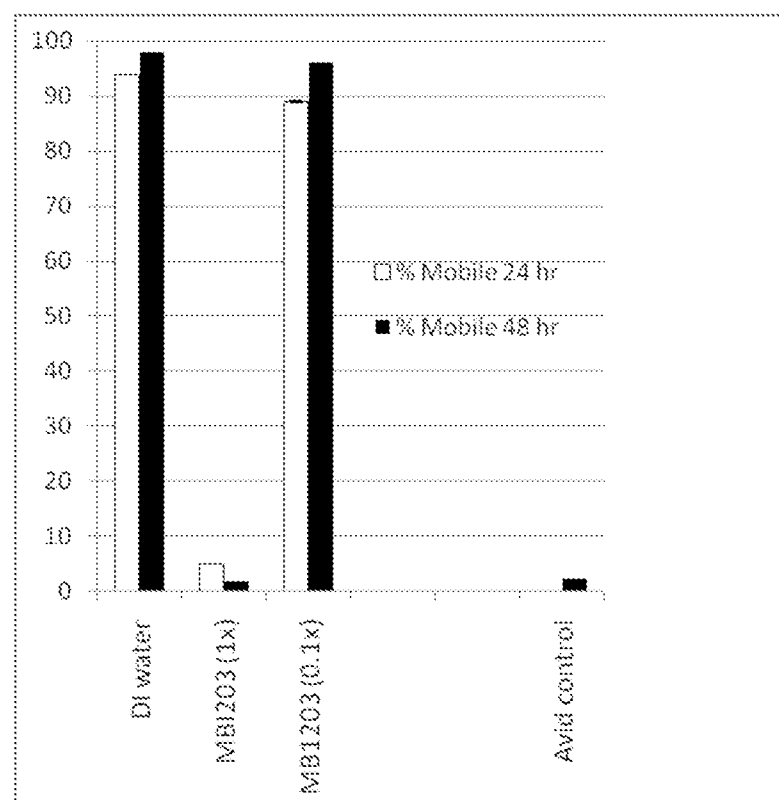
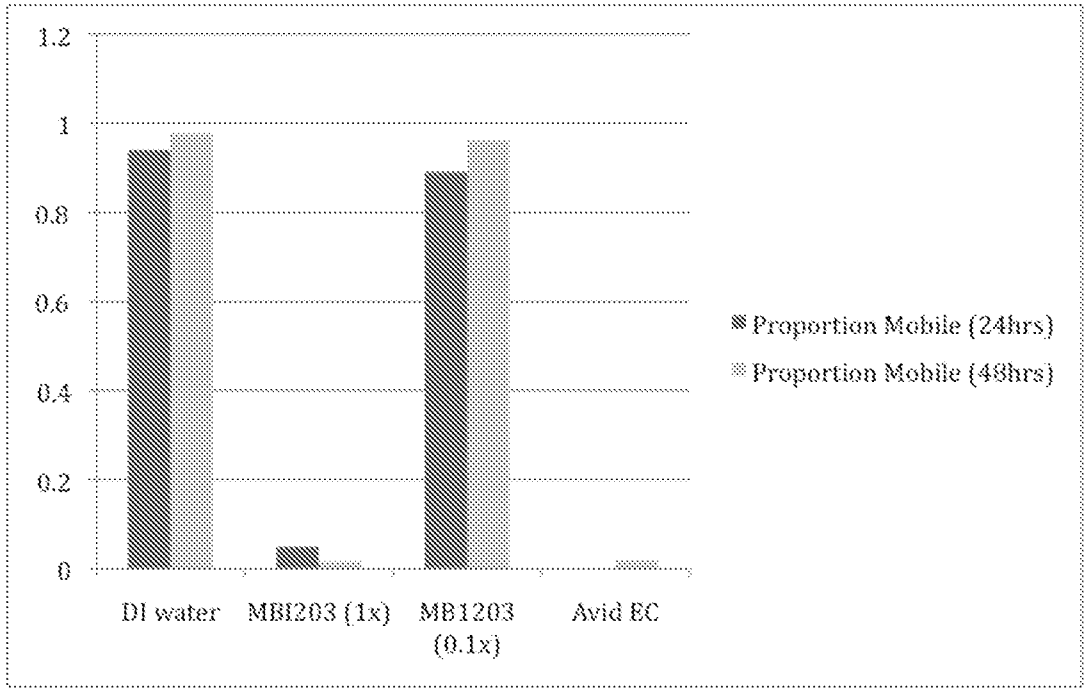
FIG. 8

FIG. 9



COMPOSICIONES BIOACTIVAS DE *CHROMOBACTERIUM* Y METABOLITOS

CAMPO DE LA INVENCION

Se describen en la presente composiciones bioactivas y metabolitos derivados de *Chromobacterium* y particularmente cultivo de *Chromobacterium substugae* responsable de controlar plagas así como también sus métodos de uso para controlar plagas.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Los productos naturales son sustancias producidas por microbios, plantas y otros organismos. Los productos microbianos naturales ofrecen una fuente abundante de diversidad química, y existe una larga historia de utilización de productos naturales para propósitos farmacéuticos. Debido al énfasis en productos naturales para terapéuticos humanos, en donde más de 50% se derivan de productos naturales, solamente 11% de pesticidas se derivan de fuentes naturales. Sin embargo, pesticidas de productos naturales tienen un potencial para jugar un papel importante en el control de plagas en granjas tanto convencionales como orgánicas. Los metabolitos secundarios producidos por microbios (bacterias, actinomicetes y hongos), proporcionan nuevos compuestos químicos los cuales pueden ser usados ya sea solos o en combinación con compuestos conocidos para controlar efectivamente plagas de insectos y reducir el riesgo de desarrollo de resistencia. Existen varios ejemplos bien conocidos de productos naturales microbianos que son exitosos como insecticidas agrícolas (Thompson et al., 2000; Arena et al., 1995; Krieg et al. 1983).

El desarrollo de un pesticida microbiano inicia con el aislamiento de un microbio en un cultivo puro. Después procede con selección de espectro y eficacia usando ensayos a escala *in*

vitro, *in vivo* o pilotos en invernaderos y en el campo. Al mismo tiempo, los compuestos activos producidos por el microbio son aislados e identificados. Para la comercialización de un pesticida microbiano, el microbio tiene que ser económicamente producido por fermentación a una escala industrial y formulado con aditivos biocompatibles y aprobados para incrementar la eficacia y maximizar la facilidad de aplicación así como también la estabilidad de almacenaje bajo condiciones de campo.

Como los granjeros observan ampliar su arsenal insecticida y como nuevos productos microbianos se colocan en el mercado, existe un potencial para que ocurra una variedad de interacciones entre nuevos y viejos insecticidas. A menudo se han usado combinaciones de 2 o más insecticidas aplicados a un cultivo único simultáneamente o secuencialmente. Para atender estas preocupaciones, científicos han examinado la interacción de aceites, hongos y pesticidas químicos contra plagas e insectos benéficos usando métodos de alimentación y tópicos (véase, por ejemplo, Chalvet-Monfray, Sabatier et al. 1996; Meunier, Carubel et al. 1999; Hummelbrunner and Isman 2001; Wirth, Jiannino et al. 2004; Farenhorst, Knols et al. 2010; Shapiro-Ilan, Cottrell et al. 2011); sin embargo, no todas las interacciones se han estudiado aún.

Chromobacterium

La cepa Beta-Proteobacterium, *Chromobacterium subtsugae*, exhibe actividad pesticida contra una amplia variedad de insectos (Martin, Blackburn et al. 2004; Martin 2004; Martin, Gundersen-Rindal et al. 2007; Martin, Hirose et al. 2007; Martin, Shropshire et al. 2007). El modo de acción parece ser una combinación de actividad de toxina y anti-alimentaria, con

inhibición de alimentación observada a dosis subletales (Martin, Gundersen-Rindal et al. 2007). En particular, se ha encontrado que *Chromobacterium substugae* son efectivas contra el escarabajo colorado adulto de la papa (*Leptinotarse decemlineata*), gusano occidental de la raíz del maíz adulto (*Diabrotica virgifera*), gusano sureño de la raíz del maíz adulto y larval (*Diabrotica undecimpunctata*), escarabajo colmenar larval (*Aethina tumida*), polillas dorso de diamante larval (*Plutella xylostella*), palomilla de la papa dulce larval (*Bernisia tabaci*) y chinche verde del sur adulta (*Nezara viridula*).

Desde el hallazgo de *C. substugae* por Martin y sus colaboradores, al menos tres nuevas especies de *Chromobacteria* se han aislado y caracterizado; Young et al. (2008) asiló una nueva especie de *Chromobacterium*, *C. aquaticum*, de muestras agua de manantial en Taiwán, y Kampfer et al. (2009) aisló dos especies, *C. piscinae* y *C. pseudoviolaceum*, de muestras ambientales recolectadas en Malaysia.

Metabolitos secundarios del género *Chromobacterium*

De todas las especies conocidas de *Chromobacteria*, la más estudiada es *Chromobacterium violaceum*, y la información publicada en metabolitos secundarios producidos por *Chromobacteria* se basa en estudios en *Chromobacterium violaceum* solamente. Durán y Menck (2001) han publicado una revisión comprehensiva de las perspectivas farmacológicas e industriales de *Chromobacterium violaceum*, una saprófita Gram-negativa del suelo y agua. Se consideran normalmente no patogénicas a humanos, pero como un patógeno oportunista, han sido ocasionalmente el agente causativo para septicemia e infecciones fatales en humanos y animales. El *Chromobacterium violaceum* se conoce por producir

un pigmento púrpura, violaceína, el cual es una molécula bisindol generada por una fusión de las dos moléculas de L-triptofano en la presencia de oxígeno (Hoshino et al., 1987; Ryan and Drennan; 2009). La biosíntesis de violaceína es regulada por detección de quórum, un mecanismo común que regula varias otras trayectorias del metabolismo secundario en bacterias Gram-negativas (McClellan et al., 1997).

Otros metabolitos conocidos de *Chromobacterium violaceum* resumidos por Durán y Menck (2001) incluyen cianuro de hidrógeno, ferrioxamina E, glicopéptidos B-lactámicos SQ28,504 y SQ28,546, antibióticos tales como aerocianidina, aerocavina, 3,6-dihidroxi-indoxaceno, y monobactam SB-26.180, y un depsipéptido antitumoral FR901228. De conformidad con el artículo revisado por Durán y Menck (2001), el *Chromobacterium violaceum* también produce compuestos de azúcar inusual tales como polisacáridos extracelulares y lipopolisacáridos.

Nemátodos y Nematocidas

Los nemátodos son no segmentados, bilateralmente simétricos, invertebrados similares a gusanos que poseen una cavidad corporal y sistema digestivo completo pero carecen de sistemas respiratorio y circulatorio. Su pared corporal está compuesta de una cutícula de capas múltiples, una hipodermis con cuatro cordones longitudinales y musculatura interna (Chitwood, 2003). Sus contenidos corporales están principalmente ocupados por sistemas reproductivos y digestivos. La mayoría de nemátodos son de vida libre pero un número pequeño de especies son parásitos ubicuos de animales o plantas.

Los nemátodos del nudo de la raíz (*Meloidogyne* spp.) parasitizan un amplio intervalo de cultivos anuales y perenes,

impactando tanto en calidad como cantidad de rendimientos comerciales. Los nemátodos en este género son considerados los nemátodos parasíticos de plantas más importantes económicamente (Whitehead, 1998). Las pérdidas de cultivos anuales causadas por nemátodos parasíticos de las plantas se han estimado por exceder \$100 billones de dólares (Koenning et al. 1999), con más de la mitad causada por el género *Meloidogyne*. El inoculo en esta cepa viene de huevos que bajo condiciones favorables eclosionan para liberar larvas infectivas de segunda etapa (J2s), las cuales migran en el suelo hacia una raíz de planta hospedera. La infección ocurre a través de la penetración en la punta de la raíz, después de lo cual las larvas se mueven al tejido vascular en donde los nemátodos llegan a ser sedentarios, alimentándose directamente de células de plantas. La planta responde produciendo células gigantes que forman agallas (nudos de la raíz). A través de la vida reproductiva, las hembras permanecen incrustadas en el tejido de la planta, y solamente las masas de huevos sobresalen de la raíz.

Los medios más eficientes para controlar nemátodos del nudo de la raíz son vía nematicidas que inhiben ya sea el eclosionamiento del huevo, movilidad juvenil y/o infectividad de la planta. El desarrollo del control químico para nemátodos parasíticos de plantas es desafiante debido a ambas razones ambientales y fisiológicas: 1. Nemátodos muy fitoparasíticos viven en un área confinada en el suelo cerca de las raíces y por lo tanto, se dificulta el suministro de un nematicida químico. 2. La superficie externa de nemátodos es un objetivo bioquímico pobre, y es impermeable a muchas moléculas orgánicas (Chitwood, 2003). Sin embargo, el suministro de compuestos tóxicos por una

ruta oral es casi imposible debido a que la mayoría de las especies parasíticas de plantas ingieren material solamente después de que han penetrado e infectado las raíces de las plantas. Por lo tanto, los nematicidas han pretendido ser toxinas de amplio espectro con alta volatilidad o con otras propiedades químicas y físicas promoviendo su movilidad en el suelo.

Durante la década pasada, hidrocarburos halogenados (por ejemplo, dibromuro de etileno, bromuro de metilo) han sido los nematicidas más pesadamente usados alrededor del mundo. Debido a su alta toxicidad humana y efectos perjudiciales en la capa de ozono estratosférica, estos compuestos fueron prohibidos en el Protocolo de Montreal pero el uso de bromuro de metilo para el control de patógenos de plantas y nemátodos se extendió en los Estados Unidos debido a la carencia de productos de sustitución. Junto con organofosfatos, los carbamatos son los nematicidas no fumigantes más efectivos. Desafortunadamente, muchos carbamatos tales como aldicarb y oxamil también son altamente tóxicos. A partir de Agosto de 2010, el fabricante de aldicarb, Bayer, se ha comprometido a cancelar todos los registros de productos en papas y cítricos en los Estados Unidos, y el aldicarb será completamente desfasado a finales de Agosto de 2018. Recientemente, la abamectina - una mezcla de dos avermectinas producidas por un actinomiceto del suelo, *Streptomyces avermitilis* - ha sido registrada para uso nematicida (Faske and Starr, 2006). Syngenta comercializa este ingrediente activo como un tratamiento para semilla para algodón y vegetales bajo el nombre comercial Avicta®.

Varios patógenos de nemátodos/plantas antimicrobianos han sido reportados por ser activos contra nemátodos parasíticos

de plantas (Guerena, 2006). Estos agentes de control biológico incluyen las bacterias *Bacillus thuringiensis*, *Burkholderia cepacia*, *Pasteuria penetrans* y *P. usgae*. Pasteuria Biosciences ha lanzado *P. usgae* contra nemátodos picadores en césped en el sureste de los Estados Unidos. Los hongos nematocidas incluyen *Trichoderma harzianum*, *Hirsutella rhossiliensis*, *H. minnesotensis*, *Verticillium chlamydosporum*, *Arthrobotrys dactyloides*, y *Paecilomyces lilanicus* (comercializado como BioAct® y Melcon® por Prophyta). Otro hongo, *Myrothecium verrucaria* está disponible en una formulación comercial, DiTera®, por Valent Biosciences. Este es un hongo inactivo; por lo tanto la actividad es debido a los compuestos nematocidas. Otros bionematocidas comerciales incluyen Deny® y Blue Circle® (*B. cepacia*), Activate® (*Bacillus chitinosporus*) (Quarles, 2005) y un producto Israelí BioNem® (*Bacillus firmus*) (ahora comercializado por Bayer como un tratamiento para semillas Votivo®) (Terefe et al. 2009). Se ha supuesto que el efecto perjudicial de aislados microbianos en eclosionamiento de huevos de nemátodos, movilidad juvenil e infectividad puede ser atribuida a toxinas producidas por estos organismos (Hallman and Sikora, 1996; Marrone et al, 1998; Siddiqui and Mahmood, 1999; Saxena et al., 2000; Meyer and Roberts, 2002), la capacidad para parasitizar o aún atrapar nemátodos (Siddiqui and Mahmood, 1996; Kerry, 2001; Jaffee and Muldoon, 1995), la inducción de resistencia sistémica (Hasky-Gunther et al. 1998), el cambio del comportamiento del nemátodo (Sikora and Hoffman-Hergarter, 1993) o interferencia con el reconocimiento de la planta (Oostendorp and Sikora, 1990).

Nematocidas botánicos, tales como extractos de plantas y aceites esenciales, se pueden usar para controlar alimentos

(Kokalis-Burrelle and Rodriguez-Kabana, 2006). Chitwood ha resumido las opciones de usar compuestos derivados de plantas para el control de nemátodos en su reciente artículo revisado (Chitwood, 2002). Siddiqui y Alam (2001) demostraron que tierra para macetas modificada con partes de plantas del árbol de neem (*Azadirachta indica*) y árbol del paraíso (*Melia azadirah*) inhibe el desarrollo de nemátodos del nudo de la raíz de tomates. Sin embargo, productos de neem no están actualmente registrados en los Estados Unidos para uso contra nemátodos. Un nuevo producto botánico de Chile (Nema-Q®) a base de un extracto de árbol de *Quillaja saponaria* que contiene saponinas (derivados bidesmosídicos de ácido quillájico sustituido con un trisacárido en C-3 y un oligosacárido en C-28), ha sido recientemente registrado como un nematicida orgánico a través de la EPA de Estados Unidos y listado para granjas orgánicas por el Instituto de Revisión de Materiales Orgánicos (OMRI). Es comercializado por Monterey AgResources.

La rotación de cultivos a un cultivo no hospedero es a menudo adecuada por sí misma para prevenir a poblaciones de nemátodos de alcanzar niveles económicamente dañinos (Guerena 2006). Los aleloquímicos son compuestos producidos por plantas que afectan el comportamiento de organismos en el ambiente de la planta. Ejemplos de aleloquímicos nematocidas incluyen politienilos, glucisonolatos, alcaloides, lípidos, terpenoides, esteroides, triterpenoides y fenólicos (Kokalis-Burrelle and Rodriguez-Kabana, 2006; Chitwood, 2002). Cuando se cultivan como cultivos de cobertura, los compuestos bioactivos de plantas alelopáticas son exudados durante el periodo de crecimiento y/o liberados al suelo durante la descomposición de la biomasa. Los

cultivos de Brassica pueden ser usados para biofumigación -una estrategia para manejo de plagas con base en la liberación de volátiles biocidas durante la descomposición de tejido incorporado en el suelo (Kirkegaard and Sarwar, 1998). Sin embargo, estudios de Roubtsova et al (2007) en el efecto de la descomposición del tejido de brócoli en números de *M. incognita* indica que para el control apropiado, fue necesario en mezclado completo de tejido de planta con el volumen completo del suelo infectado con el nemátodo.

El futuro del control de nemátodos en suelos agrícolas depende de dos factores: desarrollo de cultivos resistentes a nemátodos y el descubrimiento y desarrollo de nuevos nematocidas menos tóxicos, de amplio espectro. El costo de investigación, desarrollo y registro de nuevos nematocidas químicos es extremadamente alto (>\$200 millones de dólares), los cuales limitan su desarrollo. De los 497 nuevos ingredientes activos registrados para uso como un pesticida desde 1967 hasta 1997, solamente siete se registraron como nematocidas (Aspelin and Grube, 1999). Además de los métodos químicos convencionales, el ARN de interferencia (RNAi) ha sido propuesto como un método para controlar nemátodos. El uso de silenciamiento de gen vía ARNi fue demostrado primero en *Caenorhabditis elegans* y casi recientemente también para nemátodos parasíticos de las plantas tales como *Meloidogyne* spp. (Bakhetia et al. 2005). La búsqueda para nuevas cepas microbianas para uso como fuentes para nematocidas biológicos es una meta importante para reducir el daño económico significativo causado por nemátodos parasíticos de plantas así como también para reducir el uso de compuestos tóxicos actualmente registrados para el control de nemátodos.

De conformidad con Sasser y Freckman (1987), las pérdidas de cultivos por nemátodos varían desde 8 hasta 20% en cultivos principales alrededor del mundo. Los nemátodos parasíticos de plantas pueden causar considerable daño al cultivo con pérdidas anuales estimadas en \$87 billones de dólares en todo el mundo (Dong and Zhang, 2006). Variedades de cultivos resistentes a nemátodos y nematicidas químicos son actualmente las opciones principales para el control de nemátodos. Fumigantes tales como bromuro de metilo son muy efectivos en controlar tanto enfermedades de plantas originadas por el suelo como nemátodos pero debido a la alta toxicidad de mamíferos, efectos de la capa de ozono y otros efectos residuales, el uso de bromuro de metilo ya ha sido prohibido en varios países y su completo retiro del mercado se planeó por acuerdo internacional (Oka et al., 2000). Alternativas químicas tales como yoduro de metilo, 1,3-Dicloropropeno, y colorpicrina también tienen problemas con la seguridad de los mamíferos y ambiental. Nematicidas no fúngicos químicos están siendo desfasados y prohibidos. Más recientemente, la EPA Estadounidense anunció que el aldicarb está siendo desfasado.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Proporcionados en la presente están nuevos usos y combinaciones y, en particular, composiciones que comprenden una cepa de *Chromobacterium* sp., particularmente una cepa de *Chromobacterium substugae* y más particularmente, una cepa de *Chromobacterium substugae* sp. nov. y aún más particularmente una cepa de *Chromobacterium substugae* sp. nov. que tiene las características de identificación de NRRL B-30655 descrito en la Patente Estadounidense No. 7,244,607.

De este modo proporcionado en la presente está un método para modular la infestación de nemátodos en una planta que comprende aplicar a una planta, y/o semillas de la misma y/o sustrato usado para hacer crecer la planta, una cantidad de un sobrenadante, filtrado y/o extracto y/o uno o más metabolitos del sobrenadante, filtrado y/o extracto de una cepa de *Chromobacterium* sp., particularmente una cepa de *Chromobacterium substugae* y más particularmente, una cepa de *Chromobacterium substugae* sp. nov. y aún más particularmente una cepa de *Chromobacterium substugae* sp. nov. que tiene las características de identificación de NRRL B-30655 descrito en la Patente Estadounidense No. 7,244,607 y opcionalmente otra sustancia nematocida en una cantidad efectiva para modular la infestación de nemátodos.

También proporcionada en la presente está una combinación pesticida sinérgica con al menos una plaga que comprende como componentes activos: (a) un sobrenadante, filtrado y/o extracto de una cepa de *Chromobacterium* sp., particularmente una cepa de *Chromobacterium substugae* y más particularmente, una cepa de *Chromobacterium substugae* sp. nov. y aún más particularmente una cepa de *Chromobacterium substugae* sp. nov. que tiene las características de identificación de NRRL B-30655 descrita en la Patente Estadounidense No. 7,244,607 y/o uno o más metabolito(s) del sobrenadante, filtrado y/o extracto de *Chromobacterium* sp., particularmente una cepa de *Chromobacterium substugae* y más particularmente, una cepa de *Chromobacterium substugae* sp. nov. y aún más particularmente una cepa de *Chromobacterium substugae* sp. nov. que tiene las características de identificación de NRRL B-30655 descrita en la Patente

Estadounidense No. 7,244,607 y (b) otra sustancia pesticida, en donde (a) y (b) están presentes en cantidades sinérgicas. La plaga, en una modalidad particular, puede ser una plaga de insecto, pero puede también incluir, pero no se limita a, un nemátodo, hongos de plantas, virus de plantas y bacterias de plantas y malezas. Además, la combinación puede ser una composición. La sustancia plaguicida puede ser (a) derivada de un microorganismo; (b) un producto natural y/o (c) un pesticida químico y en particular un insecticida químico.

En particular, la combinación puede comprender un sobrenadante, filtrado y/o extracto de *Chromobacterium* sp., particularmente una cepa de *Chromobacterium substugae* y más particularmente, una cepa de *Chromobacterium substugae* sp. nov. y aún más particularmente una cepa de *Chromobacterium substugae* sp. nov. que tiene las características de identificación de NRRL B-30655 descrita en la Patente Estadounidense No. 7,244,607, y una sustancia pesticida derivada de un microorganismo que incluye pero no se limita a *Bacillus* sp. (por ejemplo, *Bacillus thuringiensis* o *Bacillus thuringiensis kurstaki*) y spinosad. Alternativamente, la combinación puede comprender un sobrenadante, filtrado y/o extracto de una cepa de *Chromobacterium* sp., particularmente una cepa de *Chromobacterium substugae* y más particularmente, una cepa de *Chromobacterium substugae* sp. nov. y aún más particularmente una cepa de *Chromobacterium substugae* sp. nov. que tiene las características de identificación de NRRL B-30655 descrita en la Patente Estadounidense No. 7,244,607, y una sustancia pesticida derivada de un producto natural tal como piretrum. Alternativamente, la combinación puede comprender un sobrenadante, filtrado y/o

extracto de una cepa de *Chromobacterium* sp., particularmente una cepa de *Chromobacterium substugae* y más particularmente, una cepa de *Chromobacterium substugae* sp. nov. y aún más particularmente una cepa de *Chromobacterium substugae* sp. nov. que tiene las características de identificación de NRRL B-30655 descrita en la Patente Estadounidense No. 7,244,607, y una sustancia pesticida la cual es un pesticida químico, particularmente, un insecticida, donde el insecticida incluye pero no se limita a piretrinas, espirotetramet y organoclorinas.

En un aspecto relacionado, proporcionado en la presente está un método para modular sinérgicamente la infestación de al menos una plaga o especies de plagas en una planta que comprende aplicar a una planta y/o semillas de la misma y/o sustrato para hacer crecer la planta, las combinaciones expuestas anteriormente con una cantidad de la combinación efectiva para modular la infestación la plaga o especies de plagas. También proporcionados en la presente están compuestos aislados obtenibles o derivados de especies de *Chromobacterium*, más particularmente, *Chromobacterium substugae* y más particularmente, una cepa de *Chromobacterium substugae* sp. nov. y aún más particularmente una cepa de *Chromobacterium substugae* sp. nov. que tiene las características de identificación de NRRL B-30655 descrita en la Patente Estadounidense No. 7,244,607 o alternativamente, organismos capaces de producir estos compuestos que pueden ser usados para controlar varias plagas, y particularmente, plagas nematocidas.

En una modalidad, el compuesto puede ser un compuesto que (a) tiene actividad pesticida; (b) tiene un peso molecular de aproximadamente 840-900 como se determina por Cromatografía

Líquida/Espectroscopia de Masas (LC/MS) y (c) tiene una Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC) tiempo de retención de aproximadamente 7-12 minutos en una columna HPLC C-18 de fase inversa usando un sistema de solvente de gradiente agua:acetonitrilo (CH₃CN) (0-20 min; 90 - 0% CH₃CN acuoso, 20-24 min; 100% CH₃CN, 24-27 min; 0-90% CH₃CN acuoso, 27-30 min; 90% CH₃CN acuoso) a 0.5 mL/min velocidad de flujo y detección UV de 210 nm y (d) se obtiene opcionalmente de una cepa de *Chromobacterium sp.*, particularmente una cepa de *Chromobacterium substagae* y más particularmente, una cepa de *Chromobacterium substagae* sp. nov. y aún más particularmente una cepa de *Chromobacterium substagae* sp. nov. que tiene las características de identificación de NRRL B-30655 descrita en la Patente Estadounidense No. 7,244,607. El compuesto en una modalidad puede ser un péptido.

En una modalidad particular, el compuesto tiene 43 carbonos, siete metilos, diez carbonos de metileno, doce metinas, 6 metinas olefínicas, y ocho carbonos cuaternarios como se determina por ¹³C NMR.

En una modalidad específica, el compuesto "A": (a) es obtenible de una especie de *Chromobacterium sp.*, y más particularmente, una cepa de *Chromobacterium substagae* sp. nov. y aún más particularmente una cepa de *Chromobacterium substagae* sp. nov. que tiene las características de identificación de NRRL B-30655 descrita en la Patente Estadounidense No. 7,244,607; (b) es tóxico a una plaga; (c) tiene un peso molecular de aproximadamente 840-890 y más particularmente, 860 como se determina por Cromatografía Líquida/Espectroscopia de Masas (LC/MS); (d) tiene valores de ¹H NMR de δ 8.89, 8.44, 8.24, 8.23,

7.96, 7.63, 6.66, 5.42, 5.36, 5.31, 5.10, 4.13, 4.07, 4.05, 3.96, 3.95, 3.88, 3.77, 3.73, 3.51, 3.44, 3.17, 2.40, 2.27, 2.11, 2.08, 2.03, 2.01, 1.97, 1.95, 1.90, 1.81, 1.68, 1.63, 1.57, 1.53, 1.48, 1.43, 1.35, 1.24, 1.07, 1.02, 0.96, 0.89, 0.88, 0.87, 0.80 y tiene valores de ^{13}C NMR de δ 173.62, 172.92, 172.25, 172.17, 171.66, 171.28, 170.45, 132.13, 130.04, 129.98, 129.69, 129.69, 125.48, 98.05, 70.11, 69.75, 68.30, 68.25, 64.34, 60.94, 54.54, 52.82, 49.72, 48.57, 45.68, 40.38, 39.90, 38.18, 36.60, 31.98, 31.62, 31.58, 29.53, 28.83, 27.78, 24.41, 23.06, 22.09, 20.56, 19.31, 18.78, 17.66, 15.80 (e) tiene una Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC) tiempo de retención de aproximadamente 7-12 minutos, más específicamente aproximadamente 9 minutos y aún más específicamente aproximadamente 9.08 min en una columna HPLC C-18 de fase inversa (Phenomenex, Luna 5 μ C18(2) 100 A, 100 x 4.60 mm) usando agua:acetonitrilo (CH_3CN) con un sistema solvente de gradiente (0-20 min; 90-0% CH_3CN acuoso, 20-24 min; 100% CH_3CN , 24-27 min; 0-90% CH_3CN acuoso, 27-30 min; 90% CH_3CN acuoso) a 0.5 mL/min velocidad de flujo y detección UV de 210 nm. En particular, el espectro de ^{13}C NMR revela señales para 43 carbonos, para siete metilos, diez carbonos de metileno, doce metinas, 6 metinas olefínicas, ocho carbonos cuaternarios y/o el espectro de ^1H NMR exhibe características de un péptido típico, ilustrando cinco señales de NH de amida [δ_{H} : 8.89, 8.44, 8.23, 8.22, 7.96], una señal de NH_2 de amina [δ_{H} : 7.64, 6.65], seis protones α -amino [δ_{H} : 4.07, 4.06, 3.96, 3.95, 3.88, 3.72] y en el espectro de ^{13}C NMR, seis/siete resonancias de amida o éster [δ_{C} : 173.62, 172.92, 172.25, 172.17, 171.66, 171.28, 170.45].

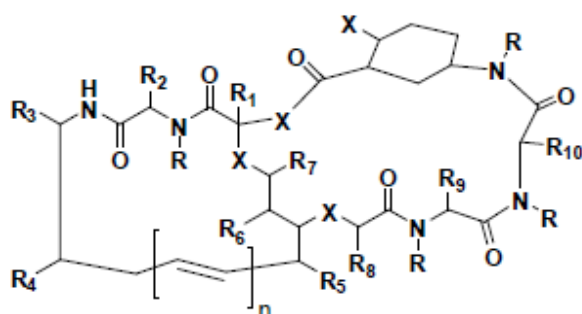
En otra modalidad específica, el compuesto "B" tiene

las siguientes características: (a) es obtenible de una cepa de *Chromobacterium sp.*, particularmente una cepa de *Chromobacterium substugae* y más particularmente, una cepa de *Chromobacterium substugae sp. nov.* y aún más particularmente una cepa de *Chromobacterium substugae sp. nov.* que tiene las características de identificación de NRRL B-30655 descrita en la Patente Estadounidense No. 7,244,607; (b) es tóxico a una plaga; (c) tiene un peso molecular de aproximadamente 850-900 y más particularmente, 874 como se determina por Cromatografía Líquida/Espectroscopia de Masas (LC/MS); (d) tiene una Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC) tiempo de retención de aproximadamente 7-12 minutos, más específicamente aproximadamente 9 minutos y aún más específicamente aproximadamente 9.54 min en una columna HPLC C-18 de fase inversa (Phenomenex, Luna 5 μ C18(2) 100 A, 100 x 4.60 mm) usando agua:acetonitrilo (CH₃CN) con un sistema solvente de gradiente (0-20 min; 90-0% CH₃CN acuoso, 20-24 min; 100% CH₃CN, 24-27 min; 0-90% CH₃CN acuoso, 27-30 min; 90% CH₃CN acuoso) a 0.5 mL/min velocidad de flujo y detección UV de 210 nm.

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

(A) un compuesto que tiene la estructura

##STR001##



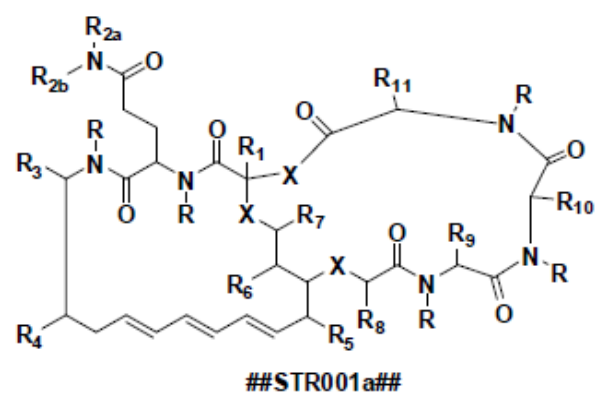
##STR001##

o una sal pesticídicamente aceptable o estereoisómeros

de la misma, en donde R es -H, alquilo de cadena inferior que contiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 porciones alquilo, porciones arilo o arilalquilo, alquilo inferior sustituido; X es O, NH, NR o S; n es 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9; R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, R₇, R₈, R₉, R₁₀, R₁₁ son cada uno independientemente H, son el mismo o diferente e independientemente una porción de cadena lateral de aminoácido o un derivado de cadena lateral de aminoácido, alquilo, alquilo sustituido, alquenoilo, alquenoilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterocíclico, heterocíclico sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, tioalquilo, tioalquilo sustituido, hidroxilo, halógeno, amino, amido, carboxilo, -C(O)H, acilo, oxiacilo, carbamato, sulfonilo, sulfonamida, o sulfurilo;

(B) un compuesto que tiene la estructura

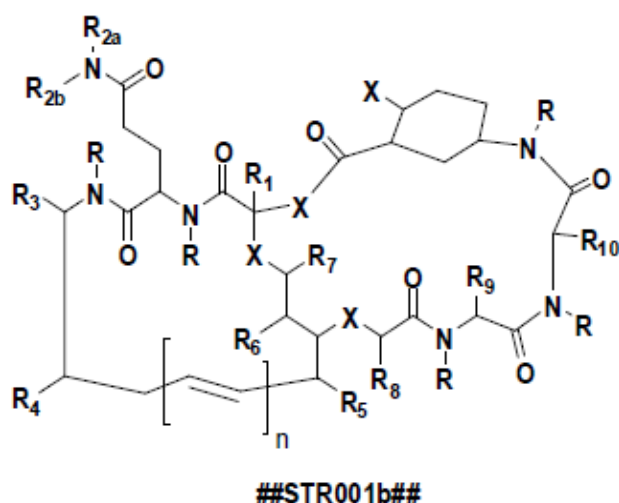
##STR001a##



en donde R es -H, alquilo de cadena inferior que contiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 porciones alquilo, porciones arilo o arilalquilo, alquilo inferior sustituido; X es O, NH, NR o S; R_{2a}, R_{2b} se seleccionan independientemente a partir del grupo que consiste de -H, alquilo, alquilo inferior, alquilo sustituido y alquilo inferior sustituido; R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, R₇, R₈, R₉, R₁₀, R₁₁ son cada uno independientemente H, son el

mismo o diferente e independientemente una porción de cadena lateral de aminoácido o un derivado de cadena lateral de aminoácido, alquilo, alquilo sustituido, alqueno, alqueno sustituido, alquino, alquino sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterocíclico, heterocíclico sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, tioalquilo, tioalquilo sustituido, hidroxilo, halógeno, amino, amido, carboxilo, $-C(O)H$, acilo, oxiacilo, carbamato, sulfonilo, sulfonamida, o sulfurilo.

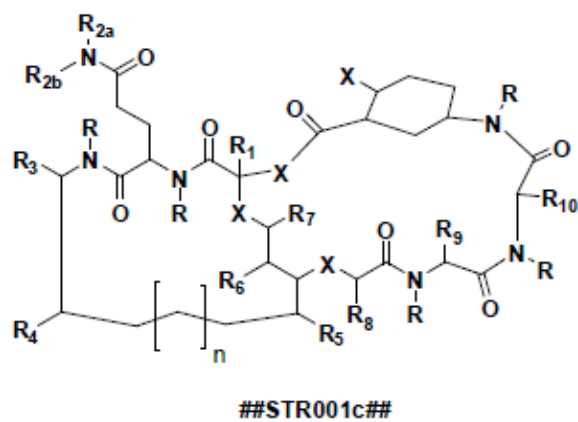
(C) un compuesto que tiene la estructura
##STR001b##



en donde R es $-H$, alquilo de cadena inferior que contiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 porciones alquilo, porción arilo o arilalquilo, alquilo inferior sustituido; X es O, NH, NR o S; n es 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9;; R2a, R2b se seleccionan independientemente a partir del grupo que consiste de $-H$, alquilo, alquilo inferior, alquilo sustituido y alquilo inferior sustituido; R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7, R8, R9, R10, R11 son cada uno independientemente H, son el mismo o diferente e independientemente una porción de cadena lateral de aminoácido o un derivado de cadena lateral de aminoácido, alquilo, alquilo

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

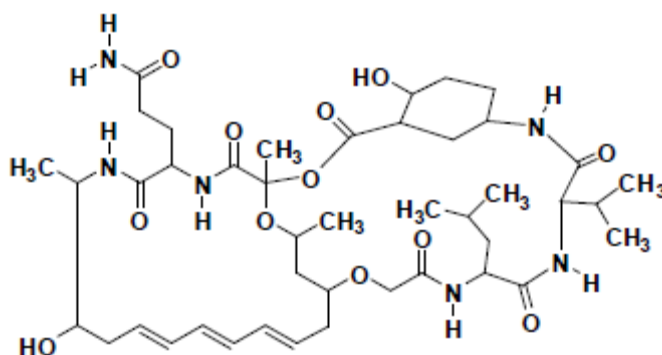
(D) un compuesto que tiene la estructura
##STR001c##



en donde R es -H, alquilo de cadena inferior, porción arilo o arilalquilo, alquilo inferior sustituido que contiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 porciones alquilo; X es O, NH, NR o S; n es 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9; R_{2a}, R_{2b} se seleccionan independientemente a partir del grupo que consiste de -H, alquilo, alquilo inferior, alquilo sustituido y alquilo inferior sustituido; R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, R₇, R₈, R₉, R₁₀, R₁₁ son cada uno independientemente H, son el mismo o diferente e independientemente una porción de cadena lateral de aminoácido o un derivado de cadena lateral de aminoácido, alquilo, alquilo sustituido, alqueno, alqueno sustituido, alquino, alquino sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo

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

En una modalidad más particular, el compuesto es cromamida A (1).



Cromamida A (1)

Estos compuestos se pueden obtener mediante (a) cultivar una cepa de *Chromobacterium* sp., particularmente una cepa de *Chromobacterium substagae* y más particularmente, una cepa de *Chromobacterium substagae* sp. nov. y aún más particularmente una cepa de *Chromobacterium substagae* sp. nov. que tiene las características de identificación de NRRL B-30655 descrita en la Patente Estadounidense No. 7,244,607 en un medio de cultivo bajo condiciones suficientes para producir el compuesto para obtener un cultivo de *Chromobacterium* y (b) aislar el compuesto producido en (a) del caldo de células completo de (a). En particular, el compuesto en la etapa (b) puede ser aislado mediante (i) aplicar el caldo de células completo con al menos uno de una columna de intercambio iónico, una columna de exclusión de tamaño o una columna de HPLC de fase inversa para obtener fracciones de columna; (ii) someter a ensayo las fracciones de columna para

determinar la actividad pesticida y (iii) concentrar fracciones de columna de (ii) para obtener compuesto aislado.

Además se proporcionan composiciones, particularmente composiciones pesticidas que comprenden los compuestos así como también otros compuestos obtenibles de una cepa de *Chromobacterium* sp., particularmente una cepa de *Chromobacterium substugae* y más particularmente, una cepa de *Chromobacterium substugae* sp. nov. y aún más particularmente una cepa de *Chromobacterium substugae* sp. nov. que tiene las características de identificación de NRRL B-30655 descrita en la Patente Estadounidense No. 7,244,607 con actividad pesticida. Estos otros compuestos pueden tener las siguientes características: (a) un peso molecular de aproximadamente 315-360 como se determina por Cromatografía Líquida/Espectroscopia de Masas (LC/MS); (b) una Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC) tiempo de retención de aproximadamente 8-15 minutos en una columna HPLC C-18 de fase inversa usando agua:acetonitrilo (CH₃CN) con un sistema solvente de gradiente (0-20 min; 90-0% CH₃CN acuoso, 20-24 min; 100% CH₃CN, 24-27 min; 0 - 90% CH₃CN acuoso, 27-30 min; 90% CH₃CN acuoso) a 0.5 mL/min velocidad de flujo y detección UV de 210 nm y se puede obtener mediante (A) cultivar una cepa de *Chromobacterium* sp., particularmente una cepa de *Chromobacterium substugae* y más particularmente, una cepa de *Chromobacterium substugae* sp. nov. y aún más particularmente una cepa de *Chromobacterium substugae* sp. nov. que tiene las características de identificación de NRRL B-30655 descrita en la Patente Estadounidense No. 7,244,607, en un medio de cultivo bajo condiciones suficientes para producir el compuesto para obtener una cepa de *Chromobacterium* sp., particularmente una cepa de *Chromobacterium substugae* y más

particularmente, una cepa de *Chromobacterium substagae* sp. nov. y aún más particularmente una cepa de *Chromobacterium substagae* sp. nov. que tiene las características de identificación de NRRL B-30655 descrita en la Patente Estadounidense No. 7,244,607 y (B) aislar el compuesto producido en (A) del caldo de células completo de (A).

En una modalidad particular, un compuesto usado en la composición expuesto anteriormente, el compuesto "C", tiene las siguientes características: (a) es obtenible de una cepa de *Chromobacterium* sp., particularmente una cepa de *Chromobacterium substagae* y más particularmente, una cepa de *Chromobacterium substagae* sp. nov. y aún más particularmente una cepa de *Chromobacterium substagae* sp. nov. que tiene las características de identificación de NRRL B-30655 descrita en la Patente Estadounidense No. 7,244,607; (b) es tóxico a plagas; (c) tiene un peso molecular de aproximadamente 325-360 y más particularmente, aproximadamente 343 como se determina por Cromatografía Líquida/Espectroscopia de Masas (LC/MS); (d) tiene una Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC) tiempo de retención de aproximadamente 8-14 minutos, más específicamente aproximadamente 10 minutos y aún más específicamente aproximadamente 10.88 min en una columna HPLC C-18 de fase inversa (Phenomenex, Luna 5 μ C18(2) 100 A, 100 x 4.60 mm) usando agua:acetonitrilo (CH₃CN) con un sistema solvente de gradiente (0-20 min; 90-0% CH₃CN acuoso, 20-24 min; 100% CH₃CN, 24-27 min; 0 - 90% CH₃CN acuoso, 27-30 min; 90% CH₃CN acuoso) a 0.5 mL/min velocidad de flujo y detección UV de 210 nm. En una modalidad particular, el compuesto "C" puede ser violaceína (2), un compuesto conocido aislado anteriormente de *Chromobacterium*

violaceum.

En otra modalidad, otro compuesto usado en la composición expuesta anteriormente, el compuesto "D", tiene las siguientes características: (a) es obtenible de especies de *Chromobacterium*; (b) es tóxico a una plaga; (c) tiene un peso molecular de aproximadamente 315-350 y más particularmente, aproximadamente 327 como se determina por Cromatografía Líquida/Espectroscopia de Masas (LC/MS); (d) tiene una Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC) tiempo de retención de aproximadamente 10-15 minutos, más específicamente aproximadamente 12 minutos y aún más específicamente aproximadamente 12.69 min en una columna HPLC C-18 de fase inversa (Phenomenex, Luna 5 μ C18(2) 100 A, 100 x 4.60 mm) usando agua:acetonitrilo (CH₃CN) con un sistema solvente de gradiente (0-20 min; 90-0% CH₃CN acuoso, 20-24 min; 100% CH₃CN, 24-27 min; 0 - 90% CH₃CN acuoso, 27-30 min; 90% CH₃CN acuoso) a 0.5 mL/min velocidad de flujo y detección UV de 210 nm. En una modalidad particular, el compuesto "D" puede ser caracterizado como desoxiviolaceína (3), un compuesto conocido aislado anteriormente de *Chromobacterium violaceum*.

Las composiciones además pueden comprender adicionalmente una segunda sustancia, en donde la segunda sustancia es un pesticida químico o biológico y/o al menos una de un portador, diluyente, tensoactivo o adyuvante.

También se proporciona un método para usar los compuestos (por ejemplo, los compuestos "A", "B", "C" y "D") y composiciones expuestas anteriormente para modular infestación de plagas, particularmente plagas de insectos no *Culicidae* (no mosquitos) y plagas nematocidas en una planta que comprende

aplicar a la planta una cantidad del compuesto o composiciones y opcionalmente un segundo pesticida químico o biológico efectivo para modular la infestación de plagas. Además se proporciona el uso de los compuestos expuestos anteriormente para formular una composición para modular la infestación de plagas en una planta.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La FIG. 1 es una representación esquemática del esquema de purificación para obtener los compuestos de la invención a partir del caldo de cultivo.

La FIG. 2 representa el cromatograma de ESI-LCMS para cromamida A (1).

La FIG.3 representa los datos de HRMS para cromamida A (1).

La FIG. 4 representa ^1H NMR para cromamida A (1) en $\text{DMSO}-d_6$ a 600 MHz.

La FIG. 5 representa ^{13}C NMR para cromamida A (1) en $\text{DMSO}-d_6$ a 600 MHz.

La FIG. 6 representa el cromatograma de HPLC para el compuesto B (PM 874).

La FIG. 7 representa estructuras químicas para cromamida A (1) violaceína (2) y desoxiviolaceína (3).

FIG. 8 Porcentaje de nemátodos móviles después del tratamiento con caldo esterilizado de *C. substugae* (1x - no diluido; 0.1x - diluido 10 veces) después de 24 horas.

FIG. 9 Porcentaje de nemátodos móviles después del tratamiento con caldo esterilizado de *C. substugae* (1x - no diluido; 0.1x - diluido 10 veces) después de 48 horas.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Mientras las composiciones y métodos hasta ahora son susceptibles a varias modificaciones y formas alternativas,

modalidades ejemplares serán en la presente descritas en detalle. Se debe entender, sin embargo, que no existe intención de limitar la invención a las formas particulares descritas, sino por el contrario, la intención es cubrir todas las modificaciones, equivalentes, y alternativas que caen dentro del espíritu y alcance de la invención como se define por las reivindicaciones adjuntas.

Donde se proporciona un intervalo de valores, se entiende que cada valor que interviene, a la décima unidad del límite inferior a menos que el contexto claramente lo dicte de otro modo, entre el límite superior e inferior de tal intervalo y cualquier otro valor declarado o que interviene en tal intervalo declarado, está incluido en la misma. Los intervalos más pequeños también están incluidos. Los límites superior e inferior de estos intervalos más pequeños también se incluyen en la misma, sometidos a cualquier límite específicamente excluido en el intervalo declarado.

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

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

Como se define en la presente, "derivada de" significa directamente aislado u obtenido de una fuente particular o alternativamente que tiene características de identificación de una sustancia u organismo aislado u obtenida de una fuente particular. En el caso de que la "fuente" sea un organismo, "derivada de" significa que puede ser aislada u obtenida del organismo mismo o medio usado para cultivar o reproducir el organismo.

Como se define en la presente, "caldo de cultivo completo" se refiere a un cultivo líquido que contiene tanto células como medio. Si la bacteria se hace crecer en una placa las células pueden ser recolectadas en agua u otro líquido, de cultivo completo.

El término "sobrenadante" se refiere al líquido que permanece cuando las células crecen en caldo o se recolectan en otro líquido de una placa de agar y se remueven por centrifugación, filtración, sedimentación u otros medios bien conocidos en la técnica.

Como se define en la presente, "filtrado" se refiere a un líquido de un caldo de cultivo completo que ha pasado a través de la membrana.

Como se define en la presente, "extracto" se refiere a una sustancia líquida removida de las células por un solvente (agua, detergente, amortiguador), y separada de las células por centrifugación, filtración u otro método.

Como se define en la presente, "metabolito" se refiere a un compuesto, sustancia o subproducto de una fermentación de un microorganismo o sobrenadante, filtrado, o extracto obtenido de un microorganismo que tiene actividad pesticida y

particularmente, insecticida. Como se define en la presente, un “compuesto aislado” está esencialmente libre de otros compuestos o sustancias, por ejemplo, al menos aproximadamente 20% puro, preferiblemente al menos aproximadamente 40% puro, más preferiblemente aproximadamente 60% puro, aún más preferiblemente aproximadamente 80% puro, muy preferiblemente aproximadamente 90% puro, y aún muy preferiblemente aproximadamente 95% puro, como se determina por métodos analíticos, que incluyen pero no se limitan a métodos cromatográficos, métodos electroforéticos.

Como se define en la presente, un “portador” es un material inerte, orgánico o inorgánico, con el cual el ingrediente activo se mezcla o fórmula para facilitar su aplicación a la planta u otro objeto a ser tratado, o su almacenaje, transporte y/o manipulación.

El término “modula” se usa para significar alterar la cantidad de infestación de plagas o velocidad de dispersión de infestación de plagas.

Como se define en la presente, el término “infestación de plagas” es la presencia de una plaga en una cantidad que causa un efecto perjudicial que incluye una enfermedad o infección en una población hospedera o emergencia de una maleza indeseada en un sistema de crecimiento.

Como se define en la presente, un “pesticida” es una sustancia derivada de un producto biológico o sustancia química que incrementa la mortalidad o inhibe la tasa de crecimiento de plagas de plantas e incluye pero no se limita a nematocidas, insecticidas, fungicidas de plantas, bactericidas de plantas y virucidas de plantas.

Como se define en la presente, el término “alquilo” se

refiere a un grupo hidrocarburo de cadena ramificada o recta monovalente que tiene de uno hasta aproximadamente 12 átomos de carbono, que incluyen metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, terc-butilo, n-hexilo, y similares.

Como se define en la presente, "alquilo sustituido" se refiere a grupos alquilo que portan además uno o más sustituyentes seleccionados de hidroxilo, alcoxi, mercapto, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, heterocíclico, heterocíclico sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, ariloxi, ariloxi sustituido, halógeno, ciano, nitro, amino, amido, $-\text{C}(\text{O})\text{H}$, acilo, oxiacilo, carboxilo, sulfonilo, sulfonamida, sulfurilo, y similares.

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

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

Como se define en la presente, "arilo" se refiere a grupos aromáticos que tienen en el intervalo de 6 hasta 14 átomos de carbono y "arilo sustituido" se refiere a grupos arilo que además portan uno o más sustituyentes como se expone anteriormente.

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

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

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

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

Como se define en la presente, "heterocíclico", se refiere a grupos cíclicos (es decir, que contienen anillos) grupos que contienen uno o más heteroátomos (por ejemplo, N, O, S, o similares) como parte de la estructura del anillo, y que tienen en el intervalo de 3 hasta 14 átomos de carbono y "heterocíclico sustituido" se refiere a grupos heterocíclicos que

además portan uno o más sustituyentes como se expone anteriormente.

MÉTODOS DE PRODUCCIÓN

Como se indica anteriormente, compuestos o metabolitos se pueden obtener, son obtenibles o derivados de un organismo que tienen las características de identificación de especies de *Chromobacterium*, más particularmente, de un organismo que tiene las características de identificación de una cepa de *Chromobacterium substugae*, más particularmente de una cepa de *Chromobacterium substugae* sp. nov. la cual puede tener las características de identificación de NRRL B-30655, o alternativamente de cualquier otro microorganismo. Los métodos comprenden cultivar estos organismos y obtener los compuestos y/o composiciones de la presente invención aislando estos compuestos del cultivo de estos organismos.

En particular, los organismos son cultivados en medio nutriente usando métodos conocidos en la técnica. Los organismos pueden ser cultivados por cultivación de matraz sacudido, fermentación a escala grande o escala menor (que incluye pero no se limita a fermentaciones continuas, de lote, alimentación por lotes o de estado sólido) en fermentadores industriales o laboratorio realizados en medio adecuado y bajo condiciones que permiten hacer crecer la célula. El cultivo puede tomar lugar en medio nutriente adecuado que comprende fuentes de carbono y nitrógeno y sales inorgánicas, usando procedimientos conocidos en la técnica. Los medios adecuados son disponibles y pueden ser disponibles de fuentes comerciales o preparados de conformidad con composiciones publicadas.

Después del cultivo, un sobrenadante, filtrado y/o

extracto de o derivado de *Chromobacterium* sp. Puede ser usado en la formulación de una composición pesticida.

Alternativamente, después del cultivo, los compuestos y/o metabolitos pueden ser extraídos del caldo de cultivo.

El extracto puede ser fraccionado por cromatografía. Las fracciones cromatográficas pueden ser sometidas a ensayo por actividad tóxica contra, por ejemplo, gusano medidor de la Col (*Trichoplusia ni*) o gusano soldado de la remolacha (*Spodoptera exigua*) usando métodos conocidos en la técnica. Este proceso puede ser repetido una o más veces usando los mismos o diferentes métodos cromatográficos.

Composiciones

Las composiciones pueden comprender caldos de cultivo completo, cultivos líquidos, o suspensiones de una cepa de una *Chromobacterium* sp., por ejemplo, una cepa que tiene las características de identificación de *Chromobacterium substugae* sp. Nov y más particularmente, que tiene las características de identificación de NRRL B-30655 (véase Patente Estadounidense No. 7,244,607), así como también sobrenadantes, filtrados o extractos obtenidos de una cepa de *Chromobacterium* sp., por ejemplo, una cepa que tiene las características de identificación de *Chromobacterium substugae* sp. Nov y más particularmente, que tiene las características de identificación de NRRL B-30655 (véase Patente Estadounidense No. 7,244,607), o el sobrenadante, filtrado y/o extracto o uno o más metabolitos o compuestos aislados derivados de una cepa de *Chromobacterium* sp. o combinaciones de los mencionados anteriormente los cuales en particular tienen actividad nematocida.

Las composiciones expuestas anteriormente pueden ser formuladas en cualquier manera. Ejemplos de formulación no limitante incluyen, pero no se limitan a, Concentrados emulsificables (EC), Polvos humectables (WP), líquidos solubles (SL), Aerosoles, soluciones concentradas de ultra-bajo volumen (ULV), polvos solubles (SP), Microencapsulación, Gránulos dispersados en agua, Fluibles (FL), Microemulsiones (ME), Nano-emulsiones (NE), etc. EN cualquier formulación descrita en la presente, el porcentaje del ingrediente activo está dentro de un intervalo de 0.01% hasta 99.99%.

Las composiciones pueden estar en la forma de un líquido, gel o sólido.

Se puede preparar una composición sólida suspendiendo un portador sólido en una solución de ingrediente(s) activo(s) y secar la suspensión bajo condiciones medias, tales como evaporación a temperatura ambiente o evaporación a vacío a 65°C o inferior.

Una composición puede comprender ingrediente(s) activo(s) encapsulados en gel. Tales materiales encapsulados en gel pueden ser preparados mezclando un agente que forma gel (por ejemplo, gelatina, celulosa o lignina) con un cultivo o suspensión de *Chromobacterium* viva o inactivada, o un filtrado libre de célula o fracción celular de un cultivo o suspensión de *Chromobacterium*, o un cultivo secado por congelamiento o atomización, célula, o fracción de célula en una solución de compuestos pesticidas usados en el método de la invención; e inducir la formación de gel del agente.

La composición puede comprender adicionalmente un tensoactivo a ser usado con el propósito de emulsificación,

dispersión, humectación, dispersión, integración, control de desintegración, estabilización de ingredientes activos y mejoramiento de fluidez o inhibición de roya. En una modalidad particular, el tensoactivo es un tensoactivo no iónico no fitotóxico el cual preferiblemente pertenece a la Lista 4B de EPA. En otra modalidad particular, el tensoactivo no iónico es monolaurato de polioxietileno (20). La concentración de tensoactivos puede variar entre 0.1-35% de la formulación total, el intervalo preferido es 5-25%. La elección de agentes emulsificantes y dispersantes, tales como agentes dispersantes y emulsificantes no iónicos, aniónicos, anfotéricos y catónicos, y la cantidad empleada se determina por la naturaleza de la composición y la capacidad del agente para facilitar la dispersión de las composiciones de la presente invención.

La composición expuesta anteriormente puede ser combinada con otros microorganismos y/o pesticidas (por ejemplo, nematocida, fungicida, insecticida). El microorganismo puede incluir pero no se limita a un agente derivado de *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Brevabacillus* sp., *Lecanicillium* sp., non-*Ampelomyces* sp., *Pseudozyma* sp., *Streptomyces* sp, *Burkholderia* sp, *Trichoderma* sp, *Gliocladium* sp. Alternativamente, el agente puede ser un aceite natural o producto de aceite que tiene actividad fungicida y/o insecticida (por ejemplo, aceite parafínico, aceite del árbol del té, aceite de zacate limón, aceite de clavo, aceite de canela, aceite de cítricos, aceite de romero, piretram). Además, el plaguicida puede ser un agente anti-fúngico de sitio único el cual puede incluir pero no se limita a bencimidazol, un inhibidor de desmetilación (DMI) (por ejemplo, imidazol, piperazina, pirimidina, triazol), morfolina,

hidroxipirimidina, anilinopirimidina, fosforotiolato, inhibidor externo de quinona, quinolina, dicarboximida, carboximida, fenilamida, anilinopirimidina, fenilpirrol, hidrocarburos aromáticos, ácido cinámico, hidroxianilida, antibiótico, polioxina, acilamina, ftalimida, benzenoide (xililalanina), un inhibidor de desmetilación seleccionado a partir del grupo que consiste de imidazol, piperazina, pirimidina y triazol (por ejemplo, bitertanol, miclobutanil, penconazol, propiconazol, triadimefon, bromuconazol, ciproconazol, diniconazol, fenbuconazol, hexaconazol, tebuconazol, tetraconazol), miclobutanil, una diamida antranílica (por ejemplo, clorantranilipol) y un inhibidor externo de quinona (por ejemplo, estrobilurina). La estrobilurina puede incluir pero no se limita a azoxiestrobina, kresoxim-metilo o trifloxiestrobina. En aún otra modalidad particular, el agente anti-fúngico es una quinona, por ejemplo, quinoxifen (4-fluorofenil éter de 5,7-dicloro-4-quinolilo). El agente anti-fúngico también puede ser derivado de un extracto de *Reynoutria*.

El fungicida también puede ser un fungicida químico no inorgánico de sitio múltiple, seleccionado a partir del grupo que consiste de cloronitrilo, quinoxalina, sulfamida, fosfonato, fosfita, ditiocarbamato, cloralquiltios, fenilpiridin-amina, oxima de ciano-acetamida.

La composición puede como se indica anteriormente, comprende además un insecticida. El insecticida puede incluir pero no se limita a avermectina, Bt (por ejemplo, *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*), aceite de neem, spinosads, *Burkholderia* sp. como se expone en el documento WO2011/106491, hongos entomopatogénicos tales como *Beauveria bassiana* e

insecticidas químicos que incluyen pero no se limita a compuestos de organocloro, compuestos de organofósforo, carbamatos, piretroides, piretrinas y neonicotinoides.

Como se indica anteriormente, la composición puede comprender además un nematocida. Este nematocida puede incluir, pero no se limita a, avermectina, productos microbianos tales como Bioma (*Bacillus firmus*), *Pasteuria* spp y productos orgánicos tales como saponinas.

Las composiciones pueden ser aplicadas usando métodos conocidos en la técnica. Específicamente, estas composiciones pueden ser aplicadas a plantas o partes de plantas. Las plantas se entiende por significar en el presente contexto a todas las plantas y poblaciones de plantas tal como se desean y plantas silvestres o cultivos de plantas indeseadas (que incluyen cultivos de plantas que se originan naturalmente). Los cultivos de plantas pueden ser plantas, las cuales se pueden obtener por reproducción vegetal convencional y métodos de optimización o por métodos de ingeniería genética y biotecnológica o por combinaciones de estos métodos, que incluyen las plantas transgénicas y que incluyen cultivares de plantas que se pueden proteger o no proteger por los derechos de los obtentores de plantas. Las partes de plantas se entiende significan todas las partes y órganos de plantas arriba y abajo del suelo, tal como brotes, hojas, flores y raíz, ejemplos de los cuales pueden ser mencionados son hojas, agujas, tallos, troncos, flores, cuerpos de frutos, frutos, semillas, raíces, tubérculos y rizomas. Las partes de plantas también incluyen material recolectado y material de propagación vegetativo y generativo, por ejemplo, esquejes, tubérculos, rizomas, retoños y semillas.

El tratamiento de plantas y partes de plantas con las composiciones expuestas anteriormente se puede llevar a cabo directamente o permitiendo a las composiciones actuar en sus ambientes, hábitat o espacios de almacenajes mediante, por ejemplo, inmersión, atomización, evaporación, inundación, dispersión, pintado o inyección. En el caso de que la composición se aplique a una semilla, la composición puede ser aplicada a la semilla como uno o más revestimientos previos a plantar la semilla usando uno o más revestimientos usando métodos conocidos en la técnica.

Usos

Las composiciones, cultivos, sobrenadantes, metabolitos y compuestos pesticidas expuestos anteriormente, pueden ser usados como pesticidas. En particular, las composiciones, cultivos, sobrenadantes, metabolitos y compuestos pesticidas como se expone anteriormente pueden ser usados como insecticidas y nematocidas, solos o en combinación con una o más sustancias pesticidas como se expone anteriormente.

Específicamente, los nemátodos que pueden ser controlados usando el método expuesto anteriormente incluyen pero no se limitan a nemátodos parasíticos tales como nemátodos del nudo de raíz, quistes, y lesión, que incluyen pero no se limitan a *Meloidogyne* sp. *Tylenchorhynchus* sp., *Hoplolaimus* sp., *Helicotylenchus* sp., *Pratylenchus* sp., *Heterodera* sp., *Globodera* sp., *Trichodorus* sp. *Paratrichodorus* sp., *Xiphinema* sp., y *Criconea* sp.; particularmente *Meloidogyne incognita* (nemátodos del nudo de la raíz), así como también *Globodera rostochiensis* y *globodera pailida* (nemátodos de quiste de papa); *Heterodera glycines* (nemátodo de quiste de soya); *Heterodera schachtii*

(nematodo de quiste de remolacha); y *Heterodera avenae* (nematodo de quiste de cereal).

Insectos fitopatogénicos controlados por el método expuesto anteriormente incluyen pero no se limitan a insectos de larvas no *Culicidae* del orden (a) *Lepidoptera*, por ejemplo, *Acleris* spp., *Adoxophyes* spp., *Aegeria* spp., *Agrotis* spp., *Alabama argillaceae*, *Amylois* spp., *Anticarsia gemmatalis*, *Archips* spp., *Argyrotaenia* spp., *Autographa* spp., *Busseola fusca*, *Cadra cautella*, *Carposina nipponensis*, *Chilo* spp., *Choristoneura* spp., *Clysia ambiguella*, *Cnaphalocrocis* spp., *Cnephasia* spp., *Cochylis* spp., *Coleophora* spp., *Crocidolomia binotalis*, *Cryptophlebia leucotreta*, *Cydia* spp., *Diatraea* spp., *Diparopsis castanea*, *Earias* spp., *Ephestia* spp., *Eucosma* spp., *Eupoecilia ambiguella*, *Euproctis* spp., *Euxoa* spp., *Grapholita* spp., *Hedya nubiferana*, *Heliothis* spp., *Hellula undalis*, *Hyphantria cunea*, *Keiferia lycopersicella*, *Leucoptera scitella*, *Lithocollethis* spp., *Lobesia botrana*, *Lymantria* spp., *Lyonetia* spp., *Malacosoma* spp., *Mamestra brassicae*, *Manduca sexta*, *Operophtera* spp., *Ostrinia nubilalis*, *Pammene* spp., *Pandemis* spp., *Panolis flammea*, *Pectinophora gossypiella*, *Phthorimaea operculella*, *Pieris rapae*, *Pieris* spp., *Plutella xylostella*, *Prays* spp., *Scirpophaga* spp., *Sesamia* spp., *Sparganothis* spp., *Spodoptera* spp., *Synanthedon* spp., *Thaumetopoea* spp., *Tortrix* spp., *Trichoplusia ni* y *Yponomeuta* spp.; (b) *Coleoptera*, por ejemplo, *Agriotes* spp., *Anthonomus* spp., *Atomaria linearis*, *Chaetocnema tibialis*, *Cosmopolites* spp., *Curculio* spp., *Dermestes* spp., *Diabrotica* spp., *Epilachna* spp., *Eremnus* spp., *Leptinotarsa decemlineata*, *Lissorhoptrus* spp., *Melolontha* spp., *Orycaephilus* spp., *Otiorhynchus* spp., *Phlyctinus* spp., *Popillia* spp., *Psylliodes* spp., *Rhizopertha* spp.,

Scarabeidae, *Sitophilus* spp., *Sitotroga* spp., *Tenebrio* spp.,
Tribolium spp. y *Trogoderma* spp.; (c) *Orthoptera*, por ejemplo,
Blatta spp., *Blattella* spp., *Gryllotalpa* spp., *Leucophaea*
maderae, *Locusta* spp., *Periplaneta* spp. y *Schistocerca* spp.; (d)
Isoptera, por ejemplo, *Reticulitermes* spp.; (e) *Psocoptera*, por
ejemplo, *Liposcelis* spp.; (f) *Anoplura*, por ejemplo, *Haematopinus*
spp., *Linognathus* spp., *Pediculus* spp., *Pemphigus* spp. y
Phylloxera spp.; (g) *Mallophaga*, por ejemplo, *Damalinea* spp. y
Trichodectes spp.; (h) *Thysanoptera*, por ejemplo, *Frankliniella*
spp., *Hercinotnrips* spp., *Taeniothrips* spp., *Thrips palmi*, *Thrips*
tabaci y *Scirtothrips aurantii*; (i) *Heteroptera*, por ejemplo,
Cimex spp., *Distantiella theobroma*, *Dysdercus* spp., *Euchistus*
spp., *Eurygaster* spp., *Leptocorisa* spp., *Nezara* spp., *Piesma*
spp., *Rhodnius* spp., *Sahlbergella singularis*, *Scotinophara* spp. y
Tniatoma spp.; (j) *Homoptera*, por ejemplo, *Aleurothrixus*
floccosus, *Aleyrodes brassicae*, *Aonidiella* spp., *Aphididae*, *Aphis*
spp., *Aspidiotus* spp., *Bemisia tabaci*, *Ceroplaster* spp.,
Chrysomphalus aonidium, *Chrysomphalus dictyospermi*, *Coccus*
hesperidum, *Empoasca* spp., *Eriosoma larigerum*, *Erythroneura* spp.,
Gascardia spp., *Laodelphax* spp., *Lecanium corni*, *Lepidosaphes*
spp., *Macrosiphus* spp., *Myzus* spp., *Nephotettix* spp., *Nilaparvata*
spp., *Paratoria* spp., *Pemphigus* spp., *Planococcus* spp.,
Pseudaulacaspis spp., *Pseudococcus* spp., *Psylla* spp., *Pulvinaria*
aethiopica, *Quadraspidiotus* spp., *Rhopalosiphum* spp., *Saissetia*
spp., *Scaphoideus* spp., *Schizaphis* spp., *Sitobion* spp.,
Trialeurodes vaporariorum, *Trioza erytreae* y *Unaspis citri*; (k)
Hymenoptera, por ejemplo, *Acromyrmex*, *Atta* spp., *Cephus* spp.,
Diprion spp., *Diprionidae*, *Gilpinia polytoma*, *Hoplocampa* spp.,
Lasius spp., *Monomorium pharaonis*, *Neodiprion* spp., *Solenopsis*

spp. y *Vespa* spp.; (l) *Diptera*, por ejemplo, *Aedes* spp., *Antherigona soccata*, *Bibio hortulanus*, *Calliphora erythrocephala*, *Ceratitis* spp., *Chrysomyia* spp., *Culex* spp., *Cuterebra* spp., *Dacus* spp., *Drosophila melanogaster*, *Fannia* spp., *Gastrophilus* spp., *Glossina* spp., *Hypoderma* spp., *Hyppobosca* spp., *Liriomyza* spp., *Lucilia* spp., *Melanagromyza* spp., *Musca* spp., *Oestrus* spp., *Orseolia* spp., *Oscinella frit*, *Pegomyia hyoscyami*, *Phorbia* spp., *Rhagoletis pomonella*, *Sciara* spp., *Stomoxys* spp., *Tabanus* spp., *Tannia* spp. y *Tipula* spp.; (m) *Siphonaptera*, por ejemplo, *Ceratophyllus* spp. und *Xenopsylla cheopis* y (n) del orden *Thysanura*, por ejemplo, *Lepisma saccharina*. Los ingredientes activos de conformidad con la invención pueden además ser usados para controlar escarabajos pulga de crucíferas (*Phyllotreta* spp.), larvas de la raíz (*Delia* spp.), picudo de la vaina de la col (*Ceutorhynchus* spp.) y áfidos en cultivos de semillas para aceite tales como canola (colza), semilla de mostaza, e híbridos de los mismos, y también arroz y maíz. En una modalidad particular, el insecto puede ser un miembro de *Spodoptera*, más particularmente, *Spodoptera exigua*, *Myzus persicae*, *Plutella xylostella* o *Euschistus* sp.

Se proporciona la aplicación de una cantidad de control pesticida efectiva de un sobrenadante, filtrado o extracto que contiene un metabolito pesticidamente activo, o compuesto aislado producido por la *Chromobacterium* sp. o aplicación de combinaciones de los anteriores. La cepa o sobrenadante o filtrado o extracto, metabolito y/o compuesto son aplicados, solos o en combinación con otra sustancia pesticida, en una cantidad pesticida o para control pesticida efectiva. Una cantidad efectiva se define como tales cantidades de células de

microorganismo, sobrenadante, filtrado o extracto, metabolito y/o compuesto solo o en combinación con otra sustancia pesticida que es suficiente para modular la infestación de plagas. La tasa efectiva puede ser afectada por especies de plagas presentes, estado de crecimiento de la plaga, densidad de población de la plaga, y factores ambientales tales como temperatura, velocidad del viento, lluvia, tiempo de día y temporada. La cantidad que estará dentro de un intervalo efectivo en un caso particular puede ser determinada por pruebas de campo o laboratorio.

EJEMPLOS

La composición y métodos mostrados anteriormente pueden además ser ilustrados en los siguientes Ejemplos no limitantes. Los ejemplos son ilustrativos de varias modalidades únicamente y no limita la invención reivindicada con respecto a los materiales, condiciones, proporciones en peso, parámetros de proceso y similares descritos en la presente.

Ejemplo 1: EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS A PARTIR DE *CHROMOBACTERIUM SUBSTUGAE*

Se usa el siguiente procedimiento para la purificación de compuestos extraídos del cultivo de *Chromobacterium substugae*:

El caldo de cultivo derivado de la fermentación de *C. substugae* 10 L en caldo L se extrajo con resina Amberlite XAD-7 (Asolkar et al., 2006) agitando la suspensión celular con resina a 225 rpm por dos horas a temperatura ambiente. La resina y la masa celular se recolectaron por filtración a través de estopilla y se lavaron con agua DI para remover las sales. La resina, masa celular y estopilla después se mojaron por 2 horas en acetona/metanol (50/50) después de lo cual la acetona/metanol se filtró y se secó bajo vacío usando evaporador rotatorio para dar

el extracto crudo. El extracto crudo después se fraccionó usando cromatografía de exclusión por tamaño Sephadex LH 20 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$; 50/50) para dar 7 fracciones (Fig. 1). Estas fracciones después se concentraron a sequedad usando evaporador rotatorio y los residuos secos resultantes se tamizaron para actividad biológica usando una alimentación de ensayo con Medidor de la col (*Trichoplusia ni*) o gusano soldado de betabel (*Spodoptera exigua*). Las fracciones activas después se sometieron a HPLC de fase inversa (Spectra System P4000 (Thermo Scientific) para dar compuestos puros, los cuales entonces se tamizaron en bioensayos mencionados anteriormente para localizar/identificar los compuestos activos. Para confirmar la identidad del compuesto, se registraron datos espectroscópicos adicionales tales como LC/MS y NMR.

Se obtuvo cromamida A (1) y el compuesto B de la fracción 1 y 2 respectivamente mientras se purificaron violaceína (2) & desoxiviolaceína (3) de la fracción 5, todos los cuales se obtuvieron de la cromatografía Sephadex LH 20. Las estructuras de estos compuestos se exponen en la FIG. 7.

Purificación de Compuestos

Se realizó la purificación de cromamida A (1) usando columna C-18 por HPLC (Phenomenex, Luna 10u C18(2) 100 A, 250 x 10), sistema de solvente de gradiente agua:acetonitrilo (0-10 min, CH_3CN acuoso al 80-75%; 10-45 min, CH_3CN acuoso al 75-60%; 45-55 min, CH_3CN acuoso al 60-50%; 55-65 min, CH_3CN acuoso al 50-100%; 65-70 min, CH_3CN al 100%; 55-70 min, CH_3CN acuoso al 0-80%) a una velocidad de flujo de 2.5 ml/min y detección UV de 210 nm. El compuesto activo de cromamida A (1) tiene un tiempo de retención de 23.19 min.

Se realizó la purificación del compuesto B de la invención usando columna C-18 de HPLC (Phenomenex, Luna 10u C18 (2) 100 A, 250 x 10), sistema de solvente de gradiente agua:acetonitrilo (0-10 min, CH₃CN acuoso al 80-75%; 10-54 min, CH₃CN acuoso al 75-60%; 45-55 min, CH₃CN acuoso al 60-50%; 55-65 min, CH₃CN acuoso al 50-100%; 65-70 min, CH₃CN al 100%; 55-70 min, CH₃CN acuoso al 0-80%) a velocidad de flujo de 2.5 ml/min y detección UV de 210 m, el compuesto activo B, tiempo de retención 26.39 min (véase, Fig 6).

Se realizaron la purificación de violaceína (2) y desoxiviolaceína (3) usando columna C-18 de HPLC (Phenomenex, Luna 10u C18(2) 100 A, 250 x 10), sistema de solvente de gradiente agua:acetonitrilo (0-10 min, CH₃CN acuoso al 70-60%; 10-40 min, CH₃CN acuoso al 60-20%; 40-60 min, CH₃CN acuoso al 20-0%; 60-65 min, CH₃CN al 100%; 65-75 min, CH₃CN acuoso al 0-70%) a velocidad de flujo 2.5 ml/min y detección UV de 210 nm, los compuestos activos violaceína (2), tienen un tiempo de retención de 7.86 min y desoxiviolaceína (3) con tiempo de retención de 12.45 min.

Análisis de Espectroscopia de Masa de los Compuestos

Se realizó en análisis de espectroscopia de masa de máximos activos en un instrumento de electrorrocío (ESI) LCQ Deca XP Plus de Thermo Finnigan usando formas de ionización tanto positivas como negativas en una forma de exploración completa (m/z 100-150 Da) en un Espectrómetro de Masa LCQ DECA XP^{plus} (Thermo Electron Corp., San Jose, CA). Instrumento de cromatografía líquida de alto termo desempeño (HPLC) equipado con detector Finnigan Surveyor PDA plus, automuestreador plus, bomba MS y una columna Luna C18 5 µ 100A, 4.6 x 100 mm (Phenomenex). El

sistema de solvente consistió de agua (solvente A) y acetonitrilo (solvente B). La fase móvil comenzó a 10% del solvente B y es linealmente incrementada a 100% del solvente B durante 20 minutos y después se mantuvo por 4 minutos, y finalmente regresó al 100% del solvente B durante 3 minutos y se mantuvo por 3 minutos. La velocidad de flujo es 0.5 ml/min. El volumen de inyección fue 10 µl y las muestras se mantuvieron a temperatura ambiente en un automuestreador. Los compuestos se analizaron por LC-MS utilizando la LC y cromatografía de fase inversa. Se realizó el análisis de espectroscopia de masa de los presentes compuestos bajo las siguientes condiciones: La velocidad de flujo del gas nitrógeno se fijó a 30 y 15 arb para la vaina y velocidad de flujo de gas aux/barrido. Se realizó la ionización por electrorrocío con voltaje de rocío fijado a 5000 V u voltaje capilar a 35.0 V. La temperatura capilar fue fijada a 400°C. Los datos se analizaron en software Xcalibur. La cromamida A (1) tiene una masa molecular de 860 en forma de ionización positiva (véase, Fig 2). El cromatograma LC-MS para otro compuesto activo B sugiere una masa molecular de 874 en forma de ionización positiva. Violaceína (2) y desoxiviolaceína (3) tienen las masas moleculares de 313 y 327 respectivamente en forma de ionización positiva.

Análisis de Espectroscopia NMR de Compuestos

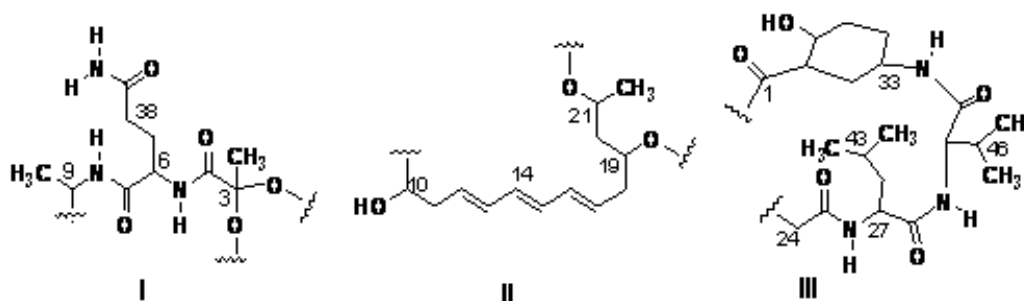
Se midieron los espectros NMR-NMR en un espectrómetro de campo del gradiente Bruker 600 MHz. La referencia se fijó en el tetrametilsilano estándar interno (TMS, 0.00 ppm). Se llevaron a cabo los análisis de aminoácido en un analizador de aminoácido Hitachi 8800.

Para elucidación de estructura, la cromamida A

purificada con peso molecular de 860 se analizó adicionalmente usando un instrumento de NMR 600 MHz, y tiene valores ^1H NMR δ a 8.89, 8.44, 8.24, 8.23, 7.96, 7.63, 6.66, 5.42, 5.36, 5.31, 5.10, 4.13, 4.07, 4.05, 3.96, 3.95, 3.88, 3.77, 3.73, 3.51, 3.44, 3.17, 2.40, 2.27, 2.11, 2.08, 2.03, 2.01, 1.97, 1.95, 1.90, 1.81, 1.68, 1.63, 1.57, 1.53, 1.48, 1.43, 1.35, 1.24, 1.07, 1.02, 0.96, 0.89, 0.88, 0.87, 0.80 (véase, Fig. 4) y tiene valores ^{13}C NMR de 173.62, 172.92, 172.25, 172.17, 171.66, 171.28, 170.45, 132.13, 130.04, 129.98, 129.69, 129.69, 125.48, 98.05, 70.11, 69.75, 68.30, 68.25, 64.34, 60.94, 54.54, 52.82, 49.72, 48.57, 45.68, 40.38, 39.90, 38.18, 36.60, 31.98, 31.62, 31.58, 29.53, 28.83, 27.78, 24.41, 23.06, 22.09, 20.56, 19.31, 18.78, 17.66, 15.80 (véase, Fig. 5). La cromamida A se aisló como un sólido blanco, la cual se analizó por la fórmula molecular $\text{C}_{43}\text{H}_{68}\text{N}_6\text{O}_{12}$ (13 grados de insaturación), por espectrometría de masa de alta resolución ESI (obs M^+ m/z 861.5376, calc M^+ m/z 861.5343). Los datos espectrales de ^1H NMR de cromamida A en DMSO- d_6 exhibió 68 señales de protón, en las cuales nueve protones [δ_{H} : 8.89, 8.44, 8.23, 8.22, 7.96, 7.64, 6.65, 5.10, 4.13], son asignados como ya sea NH u OH debido a la carencia de correlación de carbono en un análisis NMR de correlación heteronuclear (HMQC). El espectro ^{13}C NMR, mostró siete señales de carbonilo [δ_{C} : 173.62, 172.92, 172.25, 172.17, 171.66, 171.28, 170.45] y en el espectro ^1H NMR, se observaron seis características de señales de protones α -amino [δ_{H} : 4.07, 4.06, 3.96, 3.95, 3.88, 3.72] las cuales demostraron que la cromamida A es un péptido.

La interpretación de datos NMR 2D conduce a la asignación de tres unidades de aminoácido de las seis, una leucina (Leu), una valina (Val) y una glutamina (Gln). La

presencia de estos aminoácidos se confirmada por resultados de análisis de aminoácido, lo cual también mostró la presencia de los tres aminoácidos anteriores. Análisis adicionales de datos espectrales DEPT y NMR 2D (COSY, HSQC y HMBC) establecieron la presencia de tres sub-estructuras I, II y III como se muestra posteriormente.



Las conexiones de las tres su-estructuras en 1 se lograron por análisis NMR HMBC de rutina usando correlaciones entre el protón α -amino y/o el protón de amida secundaria y las resonancias de carbono de carbonilo y consideración de cambio químico. El enlace C-9 de la sub-estructura I a C-10 de la sub-estructura II fue establecido por correlaciones HMBC de CH₃-40 [δ_H : 1.00] y el protón α -amino de alanina [δ_H : 3.42] al carbono C-10 [δ_C : 70.11]. Esto fue además conformado por las tres correlaciones de HMBC unidas de hidroxilo a [δ_H : 5.10] hasta C-9 a [δ_C : 49.78]. El metileno a [δ_H : 3.50] de la sub-estructura III mostró una correlación de HMBC unida a C-19 [δ_C : 68.31] la cual se conectó a la sub-estructura I y II. El carbono cuaternario a C-3 [δ_C : 98.09] se conectó a C-21 [δ_C : 64.40] a través de una correlación débil de H-21 [δ_H : 3.95] junto con sus valores de cambio químico para formar un sistema de anillo. Por último, el enlace de cierre del anillo se aseguró por una correlación HMBC de tres enlaces a partir de H₃-36 [δ_H : 1.43] hasta C-1 [δ_C : 172.17], el cual mostró la estructura plana de cromamida A (1) a

ser asignada.

El compuesto B con un peso molecular de 874 exhibió datos NMR y UV similares que sugieren que este compuesto B también pertenece a la clase del péptido.

La estructura para violaceína (2) y desoxiviolaceína (3) se asignó por comparación de los datos de estos compuestos con aquellos publicados en la literatura. Las estructuras de cromamida A, violaceína y desoxiviolaceína se muestran en la Fig. 7.

Ejemplo 2: Análisis de aminoácido de cromamida A

Se hidrolizó cromamida A (0.05 mg) usando hidrólisis de fase líquida (HCl 6N, Fenol al 1%, 110°C, 24 horas, a vacío). Después del enfriamiento, la mezcla de reacción se secó y el producto hidrolizado se disolvió en amortiguador de dilución Norleu a un volumen de 1.0 ml. Se cargó 50 µl de la muestra en la columna de intercambio iónico para análisis.

Para estándares y calibración, se usó una solución estándar de aminoácido para hidrolizar la proteína en el Hitachi 8800 a base de Na (Sigma, A-9906) para determinar factores de respuesta, y así calibrar el analizador Hitachi 8800 para todos los aminoácidos. Cada inyección contiene NorLeucina como un estándar interno para permitir la corrección de los resultados para variaciones en volumen de muestra y variables de cromatografía. El sistema utiliza amortiguadores Na de Pickering, HCl grado Sequanal de Pierce (hidrólisis), una columna de Intercambio Iónico Transgenómica y un método optimizado desarrollado por Molecular Structure Facility (MSF), se reportaron UC Davis y el aminoácido individual presente en la muestra. Los aminoácidos presentes en la muestra (cromamida A) se encontraron ser Glx (Glutamina/Ácido glutámico), leu (leucina) y Val (Valina).

Ejemplo 3: Confirmación de toxicidad en Medidor de la col (*Trichoplusia ni*)

Se confirmó la toxicidad del compuesto de interés en la fracción 1 (F1) en un ensayo *in vitro* usando larvas de medidor de la col 1^{er} estadio como un objeto de prueba.

Se distribuyeron doscientos microlitros de alimento para medidor de la col comercial en cada cavidad de una microplaca de 96 cavidades. Después que el alimento se ha solidificado, se pipeteo 100 µl de solución que contiene 50 µL de extracto (que corresponde a cuatro máximos individuales encontrados en la fracción 1; H1-H4), 350 µl de EtOH y 600 µl de agua DI estéril en cada cavidad, después de lo cual la placa se secó usando un ventilador portátil. La cantidad de extracto en cada cavidad fue 10 microgramos. Cada tratamiento se replicó ocho veces, y se usó una mezcla de etanol puro y agua como un control negativo.

Se colocó un insecto de prueba (larva en 1^{er} estadio de medidor de la col) en cada cavidad, y la placa se cubrió con un sello adhesivo. El sello se perforó para aireación, y la placa sellada se incubó a 26°C por cuatro días.

Los resultados presentados en la Tabla 1 posterior muestran buena actividad (>60% de mortalidad) con un compuesto en máximo H1. Este máximo particular corresponde con la cromamida A (1) (Fig. 1).

Tabla 1: Mortalidad de Medidor de la Col (%) a 10 ug/cavidad

F1 H1	66.7
F1 H2	11.1
F1 H3	33.3
F1 H4	11.1

Ejemplo 4 - Determinación de LC₅₀ para violaceína para Medidor de

la col (*Trichoplusia ni*)

Se usó el sistema de ensayo de placa de 96 cavidades descrito en el ejemplo previo para determinar la concentración de violaceína pura necesaria para eliminar el 50% de larvas de medidor de la col de 1^{er} estadio. Los valores de mortalidad registrados después de 4 días de incubación a 26°C se presentan en la Tabla 2 posterior. En base a los datos, la violaceína es un potente insecticida con un valor LC50 estimado de 7×10^{-6} microgramos por cavidad para larvas de medidor de la col en un ensayo de dieta de cubierta *in vitro*.

Tabla 2. Efecto de Violaceína en Mortalidad de Medidor de la Col

Violaceína ug/cavidad	% de mortalidad al Día 4
10	100
1	100
0.1	100
0.01	100
0.001	100
0.0001	100
0.00001	71.4
0.000001	14.2
1E-07	0

EJEMPLO 5 - Actividad nematocida de caldo de *Chromobacterium substugae* (MBI-203) en Nemátodos de Nudo de Raíz Juveniles

Para valorar el efecto de *C. substugae* esterilizado por filtro en la mortalidad (y subsecuente recuperación) de nemátodos de nudo de raíz juveniles (J2) (*Meloidogyne incognita* VW6), se condujo la siguiente prueba en placas de cultivo celular de plástico de 24 cavidades:

Se agregó una alícuota de 300 ul de cada solución de

prueba (ya sea 1x o 0.1x de caldo esterilizado con filtro) en cavidades apropiadas después de lo cual, se agregaron quince nemátodos dispersados en 10 ul de agua DI en cada cavidad, la placa se cerró con una tapa, y se incubó a 25°C por 24 horas. Se usaron agua y Avid (avermectina) a 20,000x de dilución como controles negativo y positivo, respectivamente. Se verificó el efecto de cada compuesto en la movilidad del nemátodo después de 24 horas sondeando cada nemátodo con una aguja, y la relación de nemátodos inmóviles en cada tratamiento se registró en una libreta usando una escala de %. Para valorar la recuperación de movilidad en cada tratamiento, se removi6 un volumen de 200 ul de cada cavidad, y la solución restante en cada cavidad se diluyó agregando 2 ml de agua DI. Las placas nuevamente se incubaron por 24 horas como se describe anteriormente, después de lo cual se realizó la segunda evaluación de movilidad (48 horas).

Los resultados presentados en las Figs. 8 y 9 mostraron que el caldo esterilizado con filtro sin diluir puede inmovilizar los nemátodos de nudo de raíz juveniles de vida libre. Este efecto dura al menos por 48 horas, lo cual sugiere que el caldo de *C. substugae* tiene actividad nematicida.

Ejemplo 6: Efecto de caldo de *Chromobacterium substugae* (MBI-203) en Agallamiento de Raíces del Pepino

Se probó MBI-203 por su actividad intrínseca contra el nemátodo de nudo de la raíz *Meloidogyne* sp. en dos pruebas mini riego.

Materiales y Métodos

Se probó específicamente MBI-203 en un ensayo de invernadero conducido en ollas de 45 ml. Se sembraron semillas de pepino cv. Toshka directamente en las ollas rellenas con un

suelo franco arenoso. Diez días más tarde las ollas son cada una tratada con 5 ml de una suspensión. En lo sucesivo, las ollas se inoculan con 3000 huevos de *M. incognita*. Se prepararon cuatro replicas para cada tratamiento y relación. El ensayo se recolectó catorce días después de la aplicación e inoculación del ensayo. Se valoró el agallamiento de raíz de conformidad con el índice de agalla de Zeck (Zeck, 1971). Las condiciones específicas se muestran posteriormente en la Tabla 3.

Se midió la fitotoxicidad como una reducción del crecimiento del pepino emergido sembrado en comparación al control.

Tabla 3

	MBI-203
	Fostiazato (Estándar, EC 150)
Especies de prueba	<i>Meloidogyne sp.</i> aplicado a 3000 huevos por olla de mini riego (en 2 ml)
Vegetal de prueba	<i>Cucumis sativus</i> (pepino cv. Toschka)
Formulación de prueba	MBI-203 = 96% de formulación líquida
Concentraciones de prueba para MBI-203	Prueba Mini-riego #1: 100, 50 ml/L Prueba Mini-riego #2: 50, 25, 12.5, 6, 3, 1.5 ml/L
Aplicación de prueba	Aplicación de Riego

Resultados

Prueba Mini Riego no. 1

La actividad de los tratamientos es muy alta y se observó una reducción de al menos 100% cuando se aplicó a una concentración de 50 ml/L (MBI-203). Se observó menos fitotoxicidad para MBI-203. El fostiazato se desempeño como el ordinario (100% de control a 20 ppm).

Prueba Mini Riego no. 2

MBI-203 mostró fitotoxicidad en las mayores concentraciones de 50 y 25 ml/L y las mediciones pueden no ser hechos a estas proporciones.

A una concentración de 12.5 ml/L el control de nemátodo fue sobre 95% el cual disminuyó a 33% a 3 ml/L. A una relación de 1.5 ml/L no se registró actividad.

El fostiazato se desempeñó como el ordinario (100% de control a 20 ppm).

Ejemplo 8: Estudios Sinérgicos con caldo de *Chromobacterium substugae* (MBI-203)

Se realizaron pruebas sinérgicas por tratamiento de alimento artificial en placas de 96 cavidades y alimentando con alimento tratado a larvas neonatas. Se pipetearon 100 uL del tratamiento en múltiples cavidades de cada placa. Se probaron MBI-203 solo (caldo celular completo concentrado a 7.6% en peso de célula seco), el insecticida comercial solo y la combinación de los 2, usando concentraciones LC_{50} predeterminadas o fracciones de las mismas. El alimento se secó con ventilador para remover el exceso de humedad. Se transfirieron Gusanos Soldado del Betabel, *Spodoptera exigua*, o Medidores de la Col, *Trichoplusia ni*, a cada cavidad de la placa de cavidades múltiples. Las placas infestadas se cubrieron con sellador adhesivo para placa y se pinchó un agujero pequeño en el sellador sobre cada cavidad para permitir la aireación. Las placas se almacenaron en una incubadora a 26°C, ciclo de luz 16 horas/oscuridad 8 horas durante 3 días. Al tercero y cuarto día después de la infestación, se registró la mortalidad.

La determinación de una interacción sinérgica, antagonística o aditiva se determinó usando los métodos de (Colby

1967). Debido a la variación en los bioensayos, se determinó que las proporciones entre 0 y 0.9 pueden ser consideradas como antagonísticas, las proporciones 0.9-1.1 pueden ser aditivas y las proporciones por arriba de 1.1 pueden ser consideradas relaciones sinérgicas.

Se probó la sinergia de MBI-203 con insecticidas contra Medidores de la Col. Se probaron Clorantranilipol (comercializado como Coragen®, Dupont), *Bacillus thuringiensis* var. *Kurstaki* (Dipel®, Valent Biosciences), Spinosad (comercializado como Entrust®, Dow Agro Sciences), Spirotetramet (comercializado como Movento®, Bayer Crop Science) y Piretrum/piretrinas (comercializado como Pyganic®, Arbico Organics) con MBI-203. Como se notó anteriormente, excepto en donde se indica, se usaron las concentraciones de LC₅₀ de MBI-203 e insecticidas. Los resultados se muestran en la Tabla 4. Todas, pero Bt var. *kurstaki* y 1 ejemplo de la concentración LC₅₀ mostraron sinergismo.

Tabla 4: MBI-203+Insecticida: Efecto en Medidores de la Col

Producto	% de eliminación de MBI-203 solo	% de eliminación del Producto solo	% de eliminación del combo calculado	% de eliminación del combo actual	Relación	Relación definida ^a
Clorantranilipol	21	3	23.4	33.3	1.42	sin
Bt var. <i>kurstaki</i>	61.7	89.6	96	100	1.04	Agregado
Spinosad	41.5	54.3	72.99	100.00	1.37	sin
Spirotetramet	87.9	23.8	86.34	89.87	1.04	Agregado
Spirotetramet (0.5X LC ₅₀); MBI-203 (0.3X LC ₅₀)	90.6	41.5	91.90	94.94	1.03	Agregado
Piretrum	19.7	2.8	21.93	55.37	2.53	sin

^asin = sinérgico; ad = aditivo
 Se probó la sinergia de MBI-203 con insecticidas contra el Gusano Soldado de Betabel (BAW). Se probaron Clorantranilipol

(comercializado como Coragen®, Dupont), *Bacillus thuringiensis* var. *Kurstaki* (Dipel®, Valent Biosciences), Spinosad (comercializado como Entrust®, Dow Agro Sciences), Spirotetramet (comercializado como Movento®, Bayer Crop Science) y Piretrum/piretrinas (comercializado como Pyganic®, Arbico Organics) con MBI-203. Como se notó anteriormente, excepto en donde se indica, se usaron las concentraciones de LC₅₀ de MBI-203 e insecticidas. Los resultados se muestran en la Tabla 5. MBI-203 y Clorantranilipol interactuaron aditivamente mientras *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* y Spinosad mostraron control sinérgico de BAW con MBI-203. Las combinaciones de Piretrum con MBI-203 son atagónicas. Las combinaciones de spirotetramet y MBI203 son principalmente antagonísticas contra Gusano Soldado de Betabel.

Tabla 5. MBI-203+Insecticida: Efecto en Gusano Soldado de Betabel

Producto	% de eliminación de MBI-203 solo	% de eliminación del producto solo	% de eliminación de combo calculado	% de eliminación de combo actual	Relación	Relación definida ^a
Clorantranilipol	11.6	9.1	19.69	19.9	1.01	agregado
Bt var. kurstaki	24.5	19.8	39.4	68.3	1.73	sin
Spinosad	23.8	68.7	83.33	100	1.2	sin
Spirotetramet	0	21.6	36.10	27.60	0.76	antag
Spirotetramet (0.53X LC ₅₀); MBI-203 (0.7X LC ₅₀)	0	42.9	38.55	41.67	1.08	agregado
Spirotetramet	21.4	53.3	60.57	53.70	0.89	antag
Spirotetramet (1.4X LC ₅₀); MBI-203 (1.2X LC ₅₀)	10	77.5	78.22	41.23	0.53	antag
Piretram	14.4	74.5	78.17	12.16	0.16	antag
Pretram	70.7	11.1	73.97	27.78	0.38	antag

^asin = sinérgico; ad = aditivo; antag = antagonístico

A pesar que esta invención se ha descrito con referencia a modalidades específicas, los detalles de la misma no se deben construir como limitantes, como es obvio que uno puede usar varios equivalentes, cambios y modificaciones y estarán dentro del alcance de la presente invención.

Se citan varias referencias a través de esta especificación, cada una de las cuales se incorpora en la presente para referencia en su totalidad.

Referencias

Asolkar, R. N., Jensen, P. R., Kauffman, C. A., Fenical, W. 2006. Daryamides A-C, Weakly Cytotoxic Polyketides from a Marine-Derived Actinomycete of the Genus *Streptomyces* strain CNQ-085 *J. Nat. Prod.* 69:1756-1759.

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

Balibar, C.J. and C.T. Welsh (2006). "In Vitro Biosynthesis of Violacein from L-Tryptophan by the Enzymes VioA-E from *Chromobacterium violaceum*." Biochemistry **45**: 15444-15457.

Chalvet-Monfray, K., P. Sabatier, et al. (1996). "Synergy between deltamethrin and prochloraz in bees: Modeling approach." Environmental Toxicology and Chemistry **15**(4): 525-534.

Chitwood, D. J. (2003). Nematicides. Encyclopedia of Agrochemicals , vol 3. J. R. Plimmer. New York, John Wiley & Sons. **3**: 1104-1115.

Colby, S. R. (1967). "Calculating Synergistic and

Antagonistic Responses of Herbicide Combinations." Weeds **15**(1): 20-22.

Durán, N., G. Z. Justo, et al. (2007). "Minireview. Violacein: properties and biological activities." Biotechnol. Appl. Biochem. **48**: 127-133.

Durán, N. and C. F. M. Menck (2001). "*Chromobacterium violaceum*: a review of pharmacological and industrial perspectives." Crit. Rev. Microbiol. **27**: 201-222.

Farenhorst, M., B. G. J. Knols, et al. (2010). "Synergy in Efficacy of Fungal Entomopathogens and Permethrin against West African Insecticide-Resistant *Anopheles gambiae* Mosquitoes." PLoS ONE **5**(8): e12081.

Hoshino, T., T. Takano, et al. (1987). "Biosynthesis of violacein: origins of the hydrogen, nitrogen and oxygen atoms in the 2-pyrrolidone nucleus." Agric. Biol. Chem. **51**: 2733-2741.

Hummelbrunner, L. A. and M. B. Isman (2001). "Acute, Sublethal, Antifeedant, and Synergistic Effects of Monoterpenoid Essential Oil Compounds on the Tobacco Cutworm, *Spodoptera litura* (Lep., Noctuidae)." Journal of Agricultural and Food Chemistry **49**(2): 715-720.

Hungria, M., S. Astolfi-Filho, et al. (2005). "Genetic characterization of *Chromobacterium* isolates from black water environments in the Brazilian Amazon." Lett. Appl. Microbiol. **41**: 17-23.

Krieg, A., A. M. Huger, et al. (1983). "*Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*: Ein neuer, gegenüber Larven von Coleopteren wirksamer Pathotyp." Z. Angew. Entomol. **96**: 500-508.

Kämpfer, P., H.-J. Busse, et al. (2009). "*Chromobacterium piscinae* sp. nov. and *Chromobacterium*

pseudoviolaceum sp. nov., from environmental samples." Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **59**: 2486-2490.

Martin, P. A. W., D. Gundersen-Rindal, et al. (2007a). "*Chromobacterium substugae* sp. nov., a betaproteobacterium toxic to Colorado potato beetle and other insect pests." Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **57**: 993-999.

Martin, P.A., A.D.S. Shropshire, et al., (2007b). "*Chromobacterium substugae* sp. nov for control of insect pests" U.S. Patent No. 7244607 B2.

Martin, P.A.W., Hirose, E., and Aldrich, J.R. 2007c. "Toxicity of *Chromobacterium substugae* to southern green stink bug (Heteroptera:Pentatomidae) and corn rootworm (Coleoptera:Chrysomelidae)". J. Econ. Entomol. 100: 680-684.

Martin, P. A. W. (2004). "A freeze-dried diet to test pathogens of Colorado potato beetle." Biological Control **29**(1): 109-114.

McClellan, K. H., M. K. Winson, et al. (1997). "Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of N-acyl homoserine lactones" Microbiology **143**: 3703-3711.

Meunier, L., P. Carubel, et al. (1999). Insecticidal combinations including an insecticide from the family chloronicotinyl family and an insecticide having pyrazole, pyrrole, or phenylimidazole group. U. States. United States, Rhone-Poulenc Agrochimie: 6.

Pederson, M. and H. S. Woldum. Synergistic Combination of Glutamate-and-Gaba-Gated Chloride Against Pesticide and at Least One Vitamin E, Niacin, or Derivatives Thereof, US 2009/0111579, published April 30 2009..

Puritch, G. and G. Salloum. Environmentally Safe Insecticide, US 5047424, issued September 10, 1991..

Shapiro-Ilan, D. I., T. E. Cottrell, et al. (2011). "Effects of combining microbial and chemical insecticides on mortality of the Pecan Weevil (Coleoptera: Curculionidae)." J Econ Entomol **104**(1): 14-20

Ryan, K. S. and C. L. Drennan (2009). "Divergent pathways in the biosynthesis of bisindole natural products." Chemistry&Biology **16**: 351-364.

Shapiro-Ilan, D. I., T. E. Cottrell, et al. (2011). "Effects of combining microbial and chemical insecticides on mortality of the Pecan Weevil (Coleoptera: Curculionidae)." J Econ Entomol **104**(1): 14-20.

Thompson, G. D., R. Dutton, et al. (2000). "Spinosad - a case study: an example from a natural products discovery programme." Pest Management Science **56**: 696-702.

Whitehead, A. G. (1998). Plant nematode control. Wallingford, UK, CAB International.

Wirth, M. C., J. A. Jiannino, et al. (2004). "Synergy between Toxins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and *Bacillus sphaericus*." Journal of Medical Entomology **41**: 935-941.

Young, C.-C., A. B. Arun, et al. (2008). "*Chromobacterium aquaticum* sp. nov., isolated from spring water samples." Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **58**: 877-880.

Zeck W.M. (1971) Ein Bonitierungsschema zur Felddauswertung von Wurzelgallenbefall. Pflanzenschutznachrichten Bayer 24,1: 144-147.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto **caracterizado** porque (a) tiene actividad pesticida; (b) tiene un peso molecular de aproximadamente 840-900 como se determina por Cromatografía Líquida/Espectroscopia de Masas (LC/MS) y (c) tiene una Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC) tiempo de retención de aproximadamente 7-12 minutos en una columna HPLC C-18 de fase inversa usando un sistema de solvente de gradiente agua:acetonitrilo (CH_3CN) (0-20 min; 90 - 0% CH_3CN acuoso, 20-24 min; 100% CH_3CN , 24-27 min; 0 - 90% CH_3CN acuoso, 27-30 min; 90% CH_3CN acuoso) a 0.5 mL/min velocidad de flujo y detección UV de 210 nm y (d) se obtiene opcionalmente de especies de *Chromobacterium*.

2. El compuesto de conformidad con la reivindicación 1, **caracterizado** porque el compuesto tiene 43 carbonos, siete metilos, diez carbonos de metileno, doce metinas, 6 metinas olefínicas, ocho carbonos cuaternarios como se determina por ^{13}C NMR.

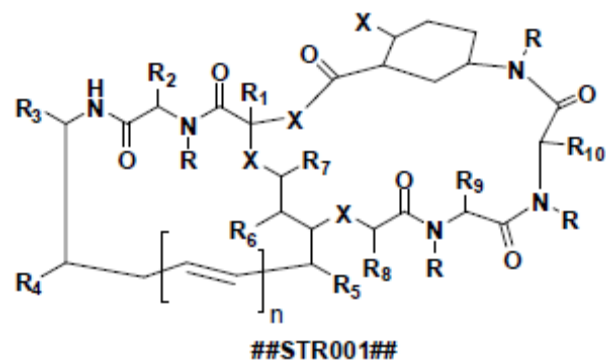
3. El compuesto de conformidad con la reivindicación 1, **caracterizado** porque el compuesto (i) tiene un peso molecular de aproximadamente 840-890 como se determina por Cromatografía Líquida/Espectroscopia de Masas (LC/MS); (ii) tiene valores de ^1H NMR de aproximadamente δ 8.89, 8.44, 8.24, 8.23, 7.96, 7.63, 6.66, 5.42, 5.36, 5.31, 5.10, 4.13, 4.07, 4.05, 3.96, 3.95, 3.88, 3.77, 3.73, 3.51, 3.44, 3.17, 2.40, 2.27, 2.11, 2.08, 2.03, 2.01, 1.97, 1.95, 1.90, 1.81, 1.68, 1.63, 1.57, 1.53, 1.48, 1.43, 1.35, 1.24, 1.07, 1.02, 0.96, 0.89, 0.88, 0.87, 0.80 y (iii) tiene valores de ^{13}C NMR de aproximadamente δ 173.62, 172.92, 172.25,

172.17, 171.66, 171.28, 170.45, 132.13, 130.04, 129.98, 129.69, 129.69, 125.48, 98.05, 70.11, 69.75, 68.30, 68.25, 64.34, 60.94, 54.54, 52.82, 49.72, 48.57, 45.68, 40.38, 39.90, 38.18, 36.60, 31.98, 31.62, 31.58, 29.53, 28.83, 27.78, 24.41, 23.06, 22.09, 20.56, 19.31, 18.78, 17.66, 15.80.

4. El compuesto de conformidad con la reivindicación 1, **caracterizado** porque el compuesto se selecciona a partir del grupo que consiste de

(A) un compuesto que tiene la estructura

##STR001##

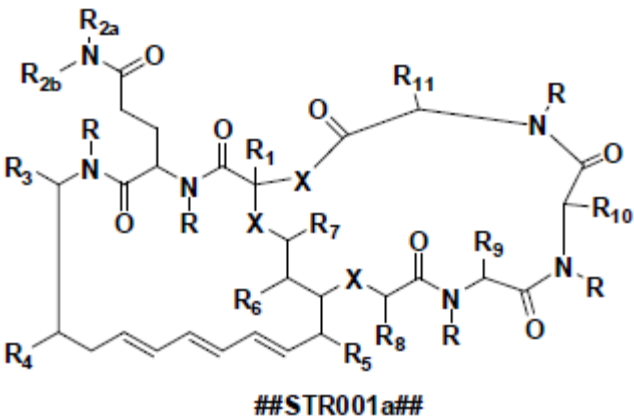


o una sal pesticídicamente aceptable o estereoisómeros de la misma, en donde R es -H, alquilo de cadena inferior que contiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 porciones alquilo, porciones arilo o arilalquilo, alquilo inferior sustituido; n es 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9; X es O, NH, NR o S; R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7, R8, R9, R10 son cada uno independientemente H, son el mismo o diferente e independientemente una porción de cadena lateral de aminoácido o un derivado de cadena lateral de aminoácido, alquilo, alquilo sustituido, alquenoilo, alquenoilo sustituido, alquiniilo, alquiniilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterocíclico, heterocíclico sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, tioalquilo, tioalquilo sustituido, hidroxilo, halógeno,

amino, amido, carboxilo, -C(O)H, acilo, oxiacilo, carbamato, sulfonilo, sulfonamida, o sulfurilo;

(B) un compuesto que tiene la estructura

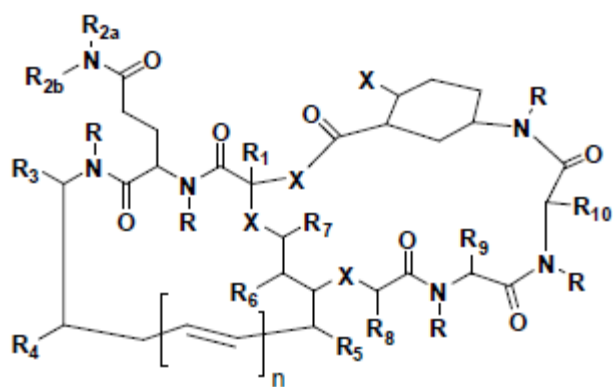
##STR001a##



en donde R es -H, alquilo de cadena inferior que contiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 porciones alquilo , porciones arilo o arilalquilo, alquilo inferior sustituido; X es O, NH, NR o S; R2a, R2b se seleccionan independientemente a partir del grupo que consiste de -H, alquilo, alquilo inferior, alquilo sustituido y alquilo inferior sustituido; R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7, R8, R9, R10, R11 son cada uno independientemente H, son el mismo o diferente e independientemente una porción de cadena lateral de aminoácido o un derivado de cadena lateral de aminoácido, alquilo, alquilo sustituido, alqueno, alqueno sustituido, alquino, alquino sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterocíclico, heterocíclico sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, tioalquilo, tioalquilo sustituido, hidroxilo, halógeno, amino, amido, carboxilo, -C(O)H, acilo, oxiacilo, carbamato, sulfonilo, sulfonamida, o sulfurilo;

(C) un compuesto que tiene la estructura

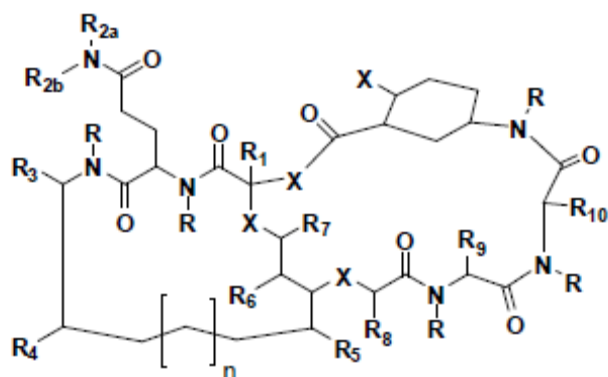
##STR001b##



##STR001b##

en donde R es -H, alquilo de cadena inferior, porción arilo o arilalquilo, alquilo inferior sustituido; X es O, NH, NR o S; n es 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9; R2a, R2b se seleccionan independientemente a partir del grupo que consiste de -H, alquilo, alquilo inferior, alquilo sustituido y alquilo inferior sustituido; R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7, R8, R9, R10, R11 son cada uno independientemente H, son el mismo o diferente e independientemente una porción de cadena lateral de aminoácido o un derivado de cadena lateral de aminoácido, alquilo, alquilo sustituido, alquenoilo, alquenoilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterocíclico, heterocíclico sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, tioalquilo, tioalquilo sustituido, hidroxilo, halógeno, amino, amido, carboxilo, -C(O)H, acilo, oxiacilo, carbamato, sulfonilo, sulfonamida, o sulfurilo;

(D) un compuesto que tiene la estructura ##STR001c##



##STR001c##

en donde R es -H, alquilo de cadena inferior, porción arilo o arilalquilo, alquilo inferior sustituido que contiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 porciones alquilo; X es O, NH, NR o S; n es 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9; R_{2a}, R_{2b} se seleccionan independientemente a partir del grupo que consiste de -H, alquilo, alquilo inferior, alquilo sustituido y alquilo inferior sustituido; R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, R₇, R₈, R₉, R₁₀, R₁₁ son cada uno independientemente H, son el mismo o diferente e independientemente una porción de cadena lateral de aminoácido o un derivado de cadena lateral de aminoácido, alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterocíclico, heterocíclico sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, tioalquilo, tioalquilo sustituido, hidroxilo, halógeno, amino, amido, carboxilo, -C(O)H, acilo, oxiacilo, carbamato, sulfonilo, sulfonamida, o sulfurilo.

5. Una composición **caracterizada** porque comprende (A) al menos uno de (i) el compuesto de la reivindicación 1; (ii) un compuesto que tiene las siguientes características: (a) tiene propiedades pesticidas; (b) tiene un peso molecular de aproximadamente 315-360 como se determina por Cromatografía Líquida/Espectroscopia de Masas (LC/MS); (c) tiene un tiempo de retención de Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC) de aproximadamente 8-15 minutos en una columna de HPLC C-18 de fase inversa usando agua:acetonitrilo (CH₃CN) con un sistema de solvente gradiente (0-20 min; 90-0% de CH₃CN acuoso, 20-24 min; 100% de CH₃CN, 24-27 min; 0-90% de CH₃CN acuoso, 27-30 min; 90% de CH₃CN acuoso) a velocidad de flujo de 0.5 mL/min y detección

UV de 210 nm que comprende y (d) es opcionalmente obtenible de especies de *Chromobacterium* y (B) al menos uno de (i) una segunda sustancia, donde la segunda sustancia es un pesticida biológico o químico y (ii) al menos uno de un portador, diluyente, tensoactivo o adyuvante.

6. Un método para obtener un compuesto seleccionado del grupo que consiste de (i) el compuesto de conformidad con la reivindicación 1 y (ii) un compuesto que tiene las siguientes características: (a) tiene propiedades pesticidas; (b) tiene un peso molecular de aproximadamente 315-360 como se determina por Cromatografía Líquida/Espectroscopia de Masas (LC/MS); (c) tiene un tiempo de retención de Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC) de aproximadamente 8-15 minutos en una columna de HPLC C-18 de fase inversa usando agua:acetonitrilo (CH_3CN) con un sistema de solvente gradiente (0-20 min; 90-0% de CH_3CN acuoso, 20-24 min; 100% de CH_3CN , 24-27 min; 0-90% de CH_3CN acuoso, 27-30 min; 90% de CH_3CN acuoso) a velocidad de flujo de 0.5 mL/min y detección UV de 210 nm que comprende:

(A) cultivar una cepa de *Chromobacterium* en un caldo celular completo bajo condiciones suficientes para producir el compuesto;

(B) aislar el compuesto producido en (A) a partir del caldo celular completo.

7. El compuesto de conformidad con la reivindicación 7, **caracterizado** porque el compuesto producido en la etapa (A) es aislado mediante (a) aplicar el caldo celular completo en al menos uno de una columna de intercambio iónico, una columna de exclusión de tamaño o una columna de HPLC de fase inversa para obtener las fracciones de la columna; (b) someter a ensayo las

fracciones de la columna para actividad pesticida y (c) concentrar las fracciones de la columna de (b) para obtener el compuesto aislado.

8. Un método para modular la infestación de plagas en una planta **caracterizado** porque comprende aplicar a la planta y/o semillas e la misma y/o sustrato usado para hacer crecer la planta, una cantidad de (A) al menos uno de (i) el compuesto de conformidad con las reivindicaciones 1 y (ii) un compuesto que tiene las siguientes características: (a) tiene propiedades pesticidas; (b) tiene un peso molecular de aproximadamente 315-360 como se determina por Cromatografía Líquida/Espectroscopia de Masas (LC/MS) y (c) tiene una Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC) tiempo de retención de aproximadamente 8-15 minutos en una columna HPLC C-18 de fase inversa usando agua:acetonitrilo (CH_3CN) con un sistema solvente de gradiente (0-20 min; 90 - 0% CH_3CN acuoso, 20-24 min; 100% CH_3CN , 24-27 min; 0 - 90% CH_3CN acuoso, 27-30 min; 90% CH_3CN acuoso) a 0.5 mL/min velocidad de flujo y detección UV de 210 nm y (d) se obtiene opcionalmente de especies de *Chromobacterium* y (B) opcionalmente otra sustancia pesticida efectiva para modular la infestación de plagas.

9. El método de conformidad con la reivindicación 8, **caracterizado** porque el compuesto usado en el método (I) tiene al menos uno de: (a) un peso molecular de aproximadamente 343 como se determina por Cromatografía Líquida/Espectroscopia de Masas (LC/MS) y (b) una retención de HPLC de aproximadamente 10 minutos en la columna de HPLC de fase inversa C-18 o (II) tiene al menos uno de: (a) un peso molecular de aproximadamente 327 como se determina por Cromatografía Líquida/Espectroscopia de Masas

(LC/MS) y (b) una retención de HPLC de aproximadamente 12 minutos en la columna de HPLC de fase inversa C-18.

10. El método de conformidad con la reivindicación 8, **caracterizado** porque el compuesto se selecciona a partir del grupo que consiste de cromamida A, violaceína y desoxiviolaceína.

11. Un método para modular la infestación de nemátodos en una planta **caracterizado** porque comprende aplicar a la planta y/o semillas de la misma y/o sustrato usado para hacer crecer la planta una cantidad de un sobrenadante, filtrado y/o extracto y/o uno o más metabolitos del sobrenadante, filtrado y/o extracto de una cepa de *Chromobacterium sp.* y opcionalmente otra sustancia nematocida en una cantidad efectiva para modular la infestación de nemátodos.

12. Una combinación pesticida sinérgica con al menos una plaga **caracterizada** porque comprende como componentes activos: (a) un sobrenadante, filtrado y/o extracto de *Chromobacterium sp.* y (b) otra sustancia pesticida, en donde (a) y (b) están presentes en cantidades sinérgicas.

13. La combinación de conformidad con la reivindicación 12, **caracterizada** porque la plaga es una plaga de nemátodo.

14. La combinación de conformidad con la reivindicación 12, **caracterizada** porque la sustancia pesticida es (a) derivada de un microorganismo; (b) un producto natural o (b) un compuesto químico.

15. La combinación de conformidad con la reivindicación 12, **caracterizada** porque la sustancia pesticida es derivada de un microorganismo y se selecciona a partir del grupo que consiste de *Bacillus sp.* y spinosad.

16. La combinación de conformidad con la reivindicación

12, **caracterizada** porque la sustancia pesticida es un insecticida químico seleccionado a partir del grupo que consiste de piretrinas, espirotetramet y una diamida antranílica.

17. La combinación de conformidad con la reivindicación 12, **caracterizada** porque la combinación es una composición.

18. Un método para modular sinérgicamente la infestación de al menos una cepa de plaga en una planta, **caracterizado** porque comprende aplicar a la planta y/o semillas de la misma y/o sustrato usado para hacer crecer la planta una cantidad de una combinación de conformidad con la reivindicación 13 efectiva para modular sinérgicamente la infestación de al menos una plaga en una planta.

19. Uso de un compuesto seleccionado del grupo que consiste de (i) el compuesto de las reivindicaciones 1-4; (ii) un compuesto que tiene las siguientes características: (a) tiene propiedades pesticidas; (b) tiene un peso molecular de aproximadamente 315-360 como se determina por Cromatografía Líquida/Espectroscopia de Masas (LC/MS); (c) tiene una Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC) tiempo de retención de aproximadamente 8-15 minutos en una columna HPLC C-18 de fase inversa usando agua:acetonitrilo (CH_3CN) con un sistema solvente de gradiente (0-20 min; 90 - 0% CH_3CN acuoso, 20-24 min; 100% CH_3CN , 24-27 min; 0 - 90% CH_3CN acuoso, 27-30 min; 90% CH_3CN acuoso) a 0.5 mL/min velocidad de flujo y detección UV de 210 nm que comprende y (d) se obtiene opcionalmente de especies de *Chromobacterium* para formular una composición para modular la infestación de plagas en una planta.

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a compuestos bioactivos y metabolitos derivados de cultivos de especies de *Chromobacterium* responsables de controlar plagas, composiciones que contienen estos compuestos, métodos para obtener estos compuestos y métodos para usar estos compuestos y composiciones para controlar plagas.

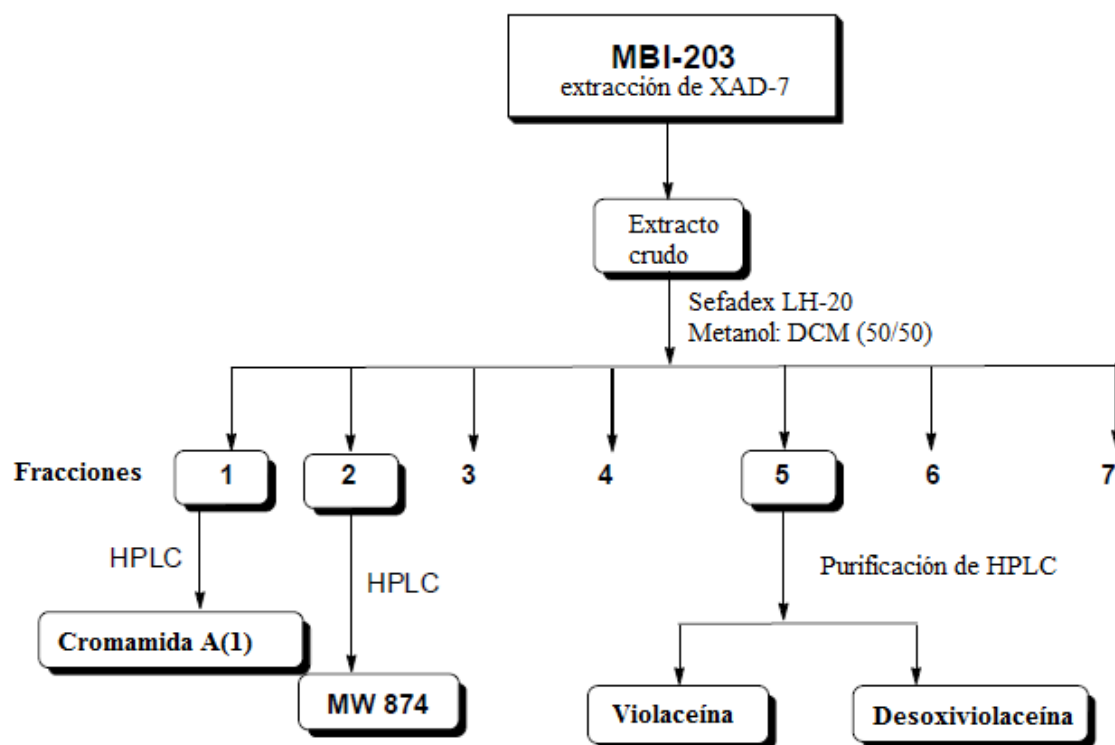
FIG. 1

FIG. 2

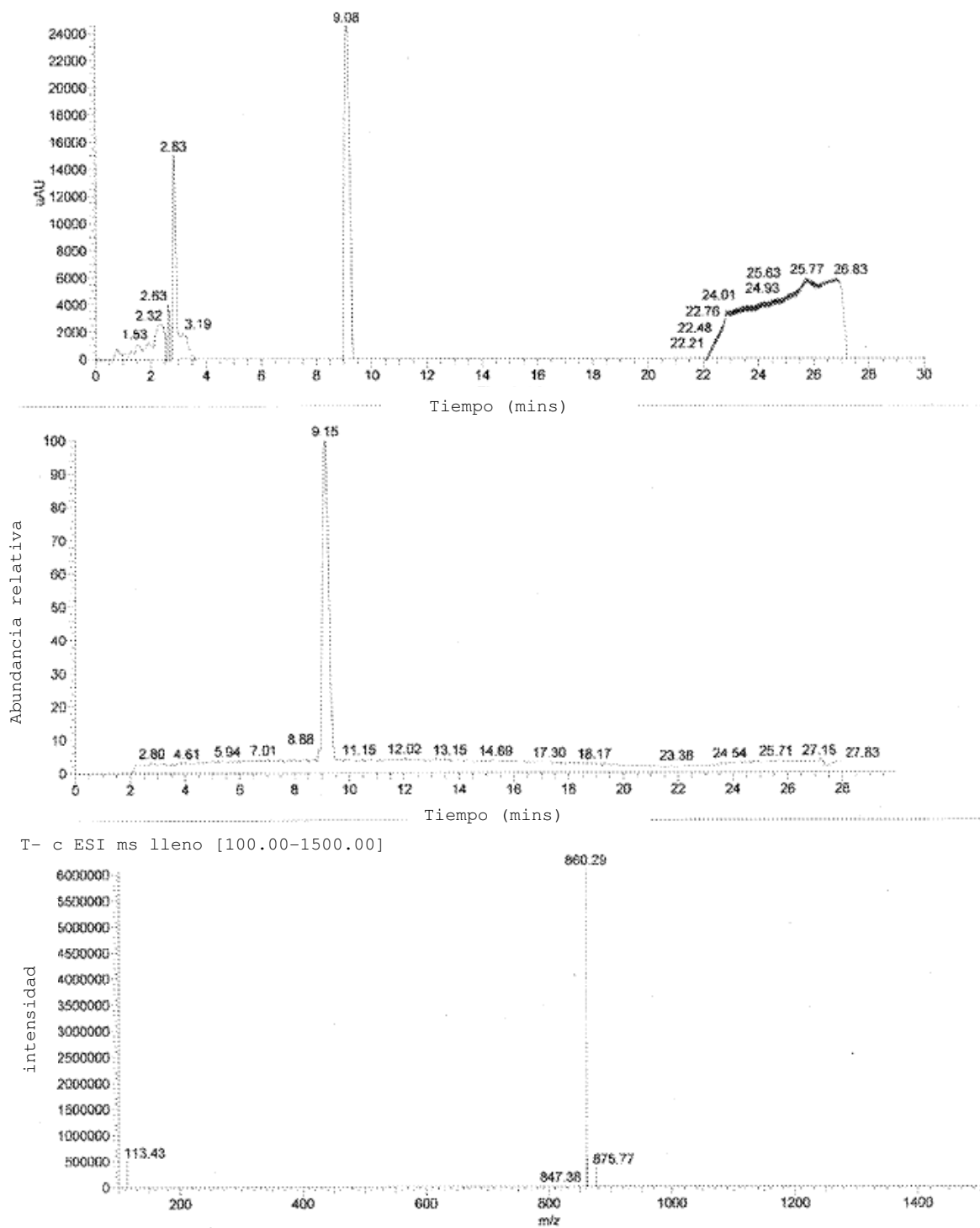


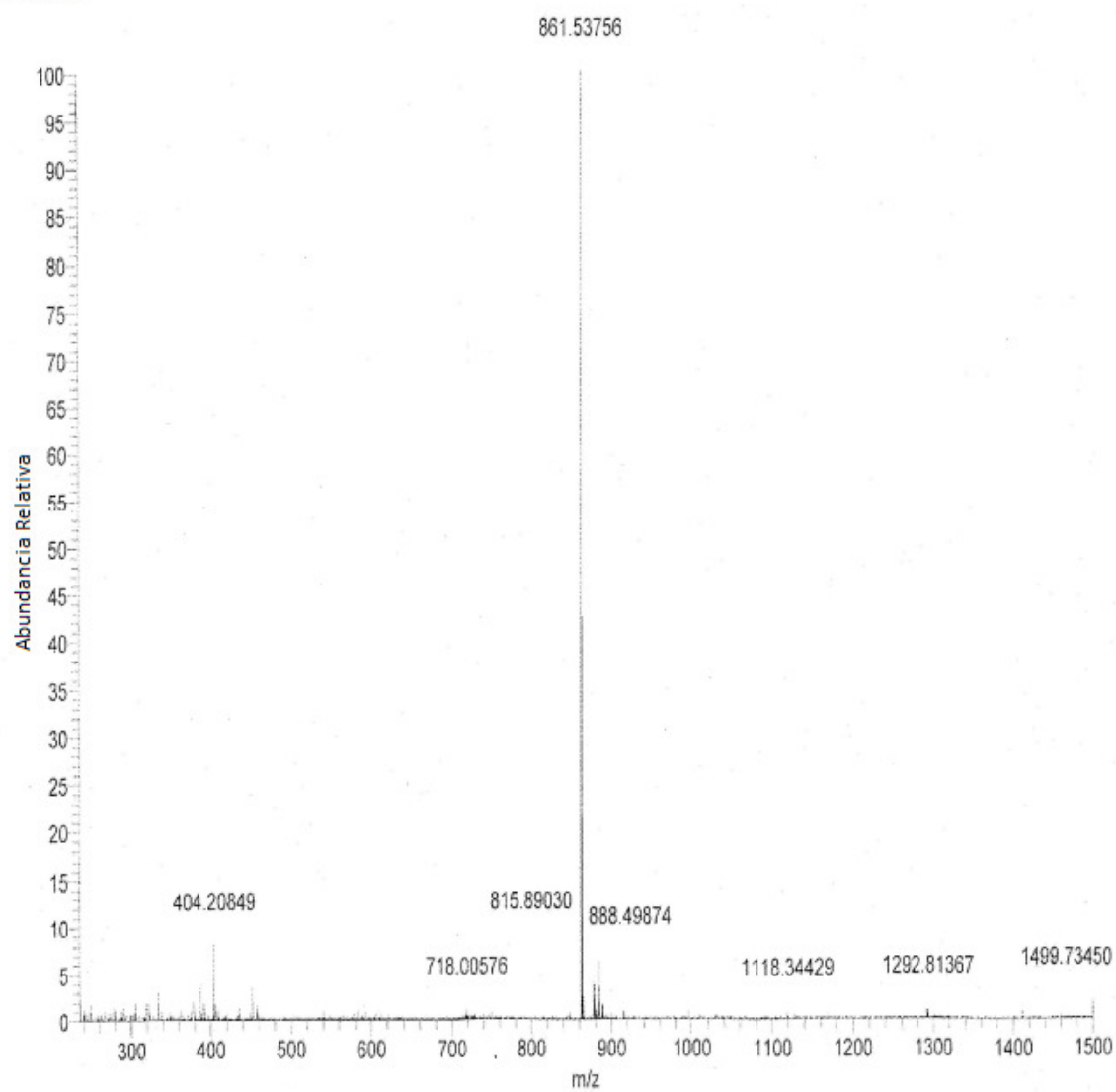
FIG. 3

FIG. 4

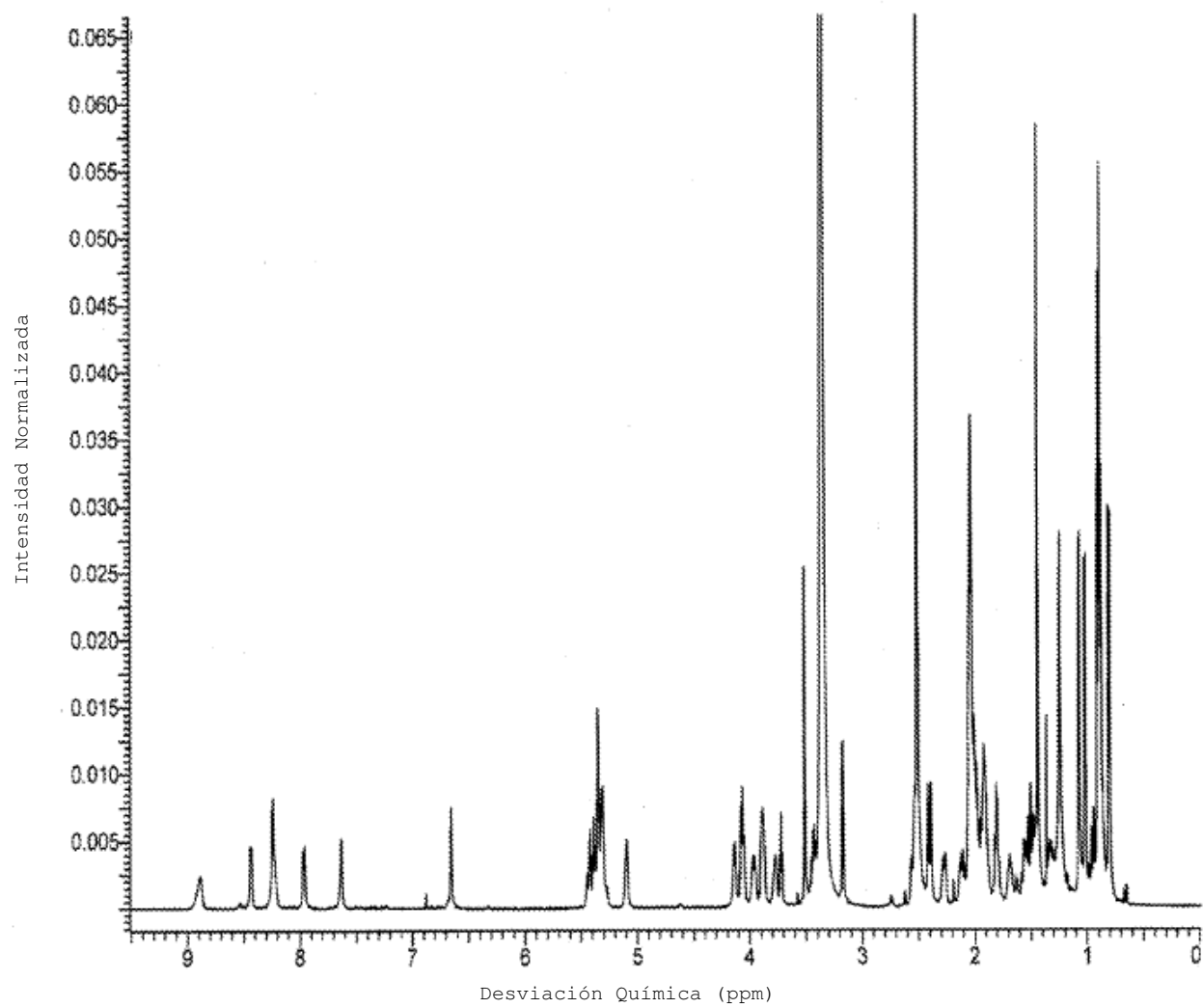


FIG. 5

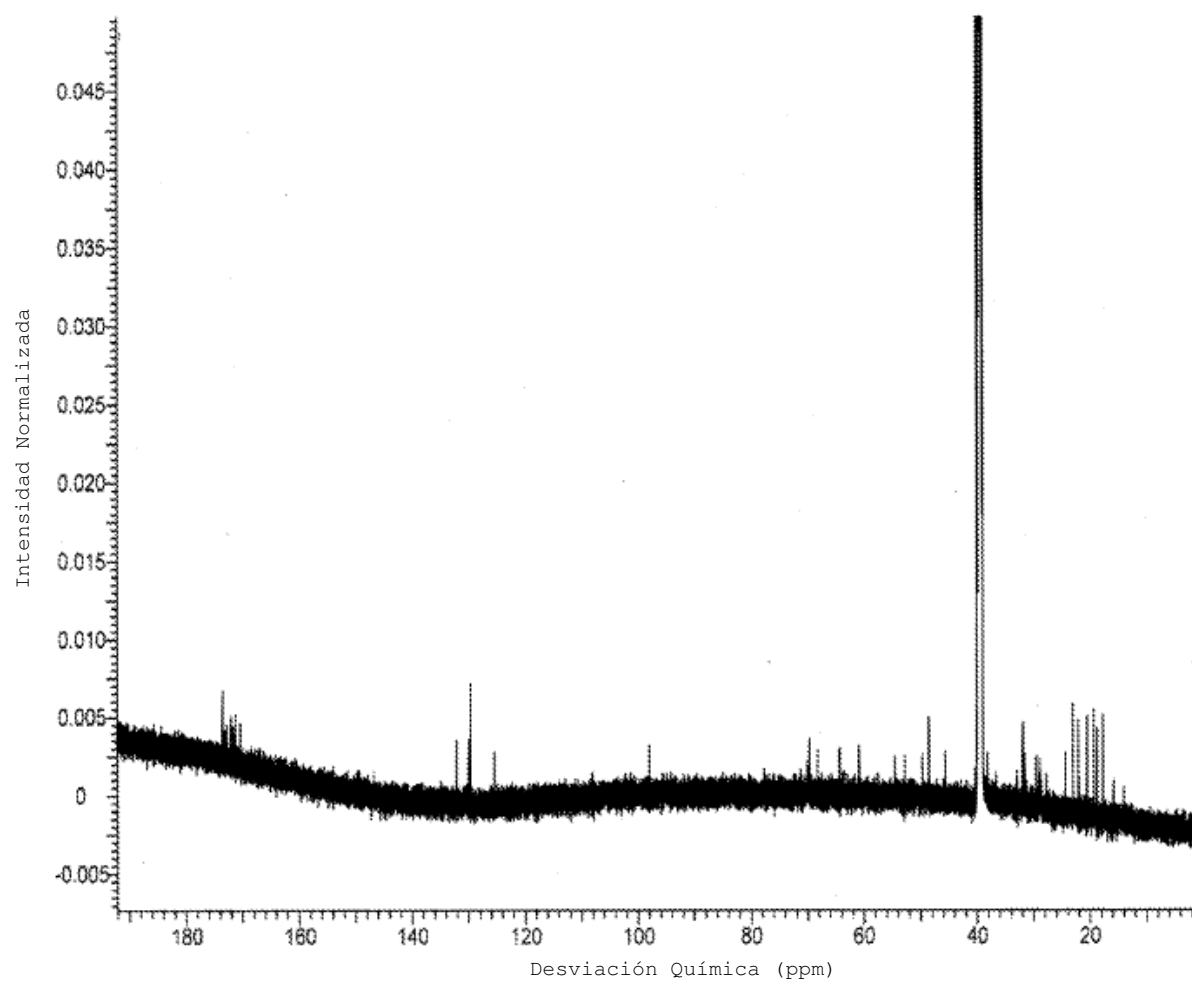


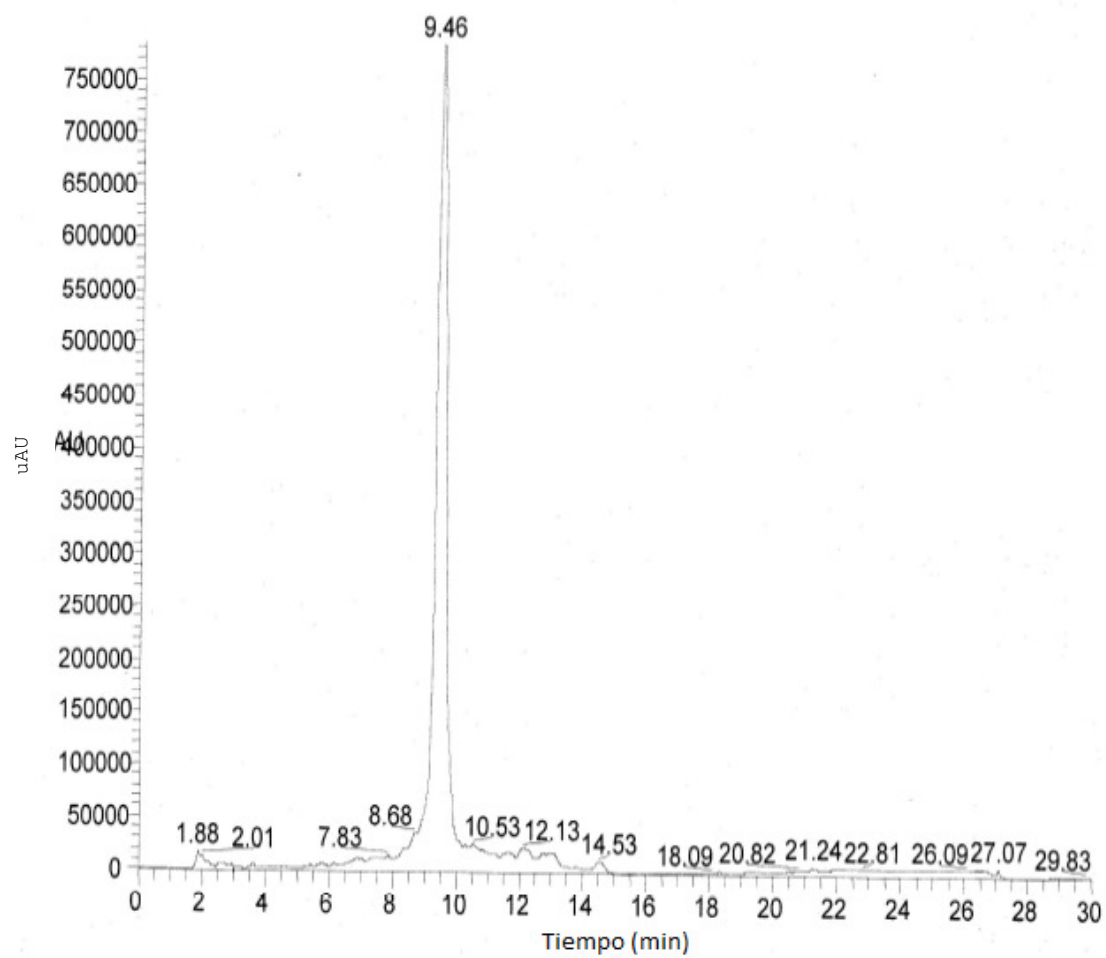
FIG. 6

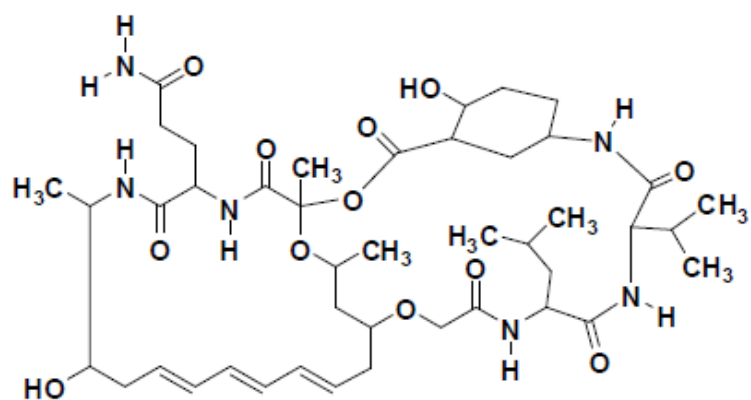
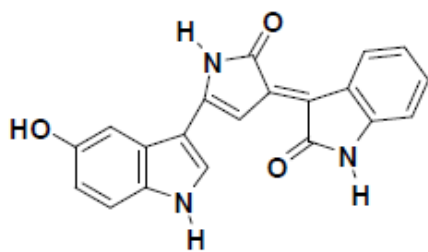
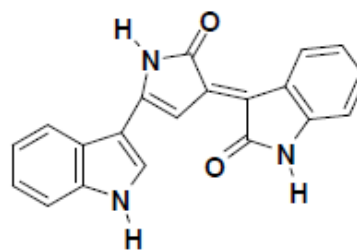
FIG. 7**Cromamida A (1)****Violaceína (2)****Desoxiviolaceína (3)**

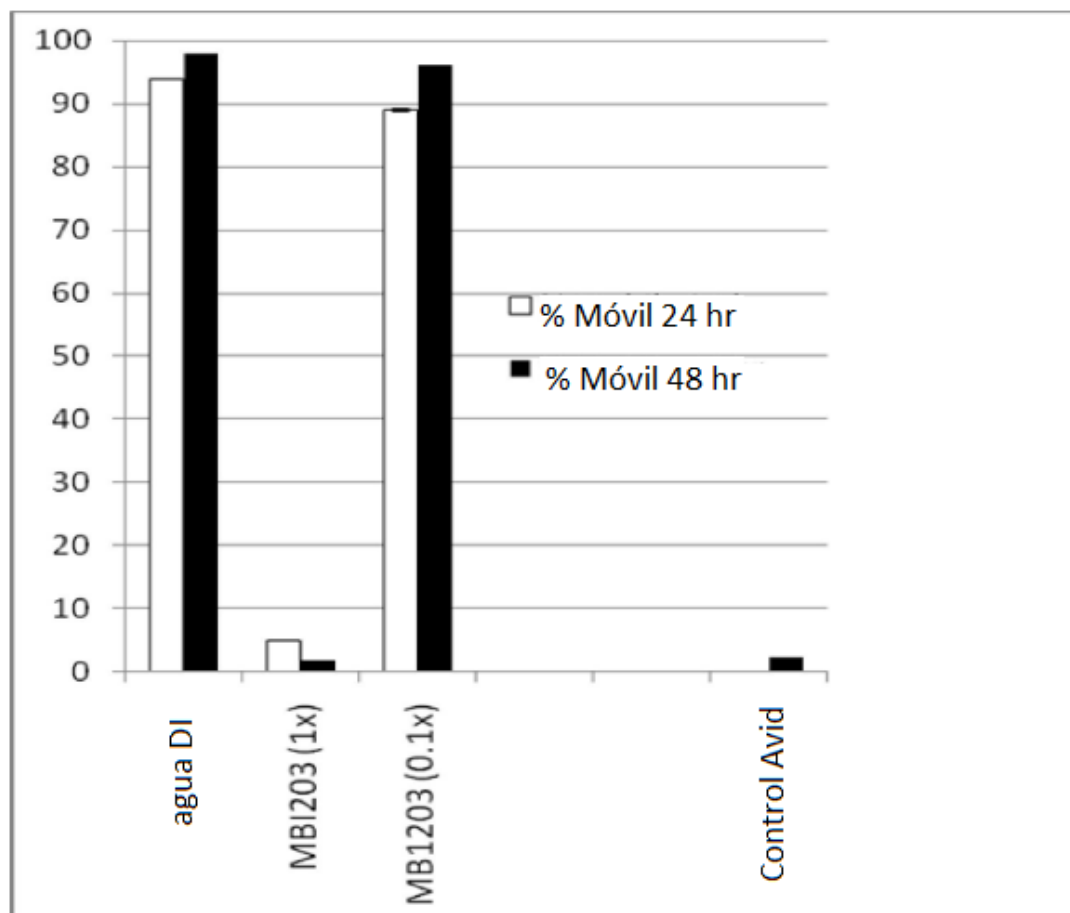
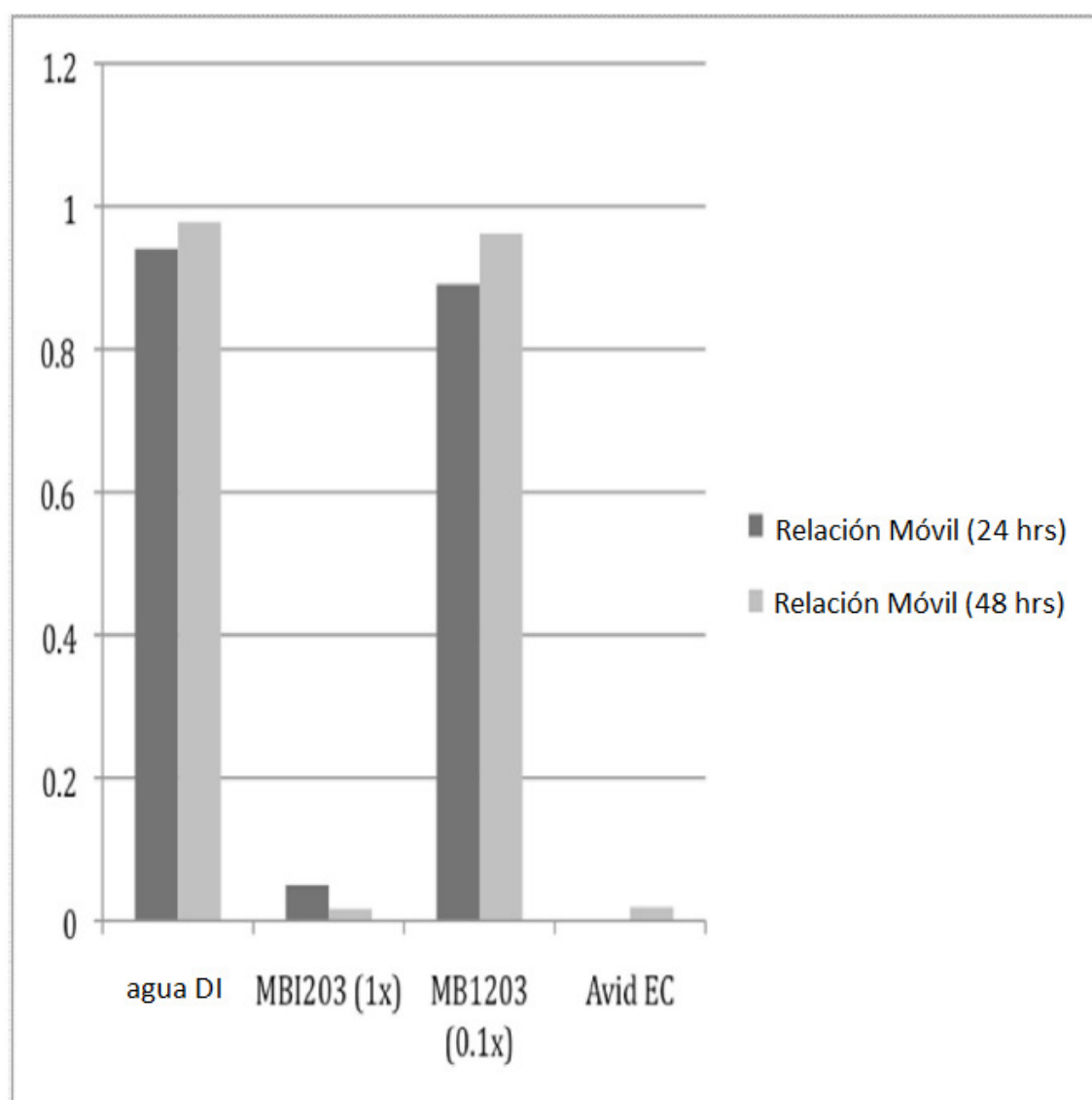
FIG. 8

FIG. 9



(51) International Patent Classification:

A01N 63/02 (2006.01) *C07K 7/64* (2006.01)
C07K 5/08 (2006.01) *A01P 7/00* (2006.01)
C07K 7/06 (2006.01)

(21) International Application Number:

PCT/US2011/057541

(22) International Filing Date:

24 October 2011 (24.10.2011)

(25) Filing Language:

English

(26) Publication Language:

English

(30) Priority Data:

61/406,569 25 October 2010 (25.10.2010) US

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

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): **ASOLKAR, Rat-
nakar** [IN/US]; 4005 Cowell Blvd., Davis, CA 95618
(US). **HUANG, Huazhang** [CN/US]; 2674 Briscoe Place,
Woodland, CA 95776 (US). **KOIVUNEN, Marja**
[FI/US]; PO Box 2277, Davis, CA 95617 (US). **MAR-
RONE, Pamela** [US/US]; 3333 Victoria Place, Davis, CA
95616 (US).

(74) Agent: **AGRIS, Cheryl H.**; The Law Offices of Cheryl H.
Agris, PC, PO Box 8495, Pelham, NY 10803 (US).

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

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

Declarations under Rule 4.17:

- as to applicant's entitlement to apply for and be granted a
patent (Rule 4.17(ii))
- as to the applicant's entitlement to claim the priority of the
earlier application (Rule 4.17(iii))

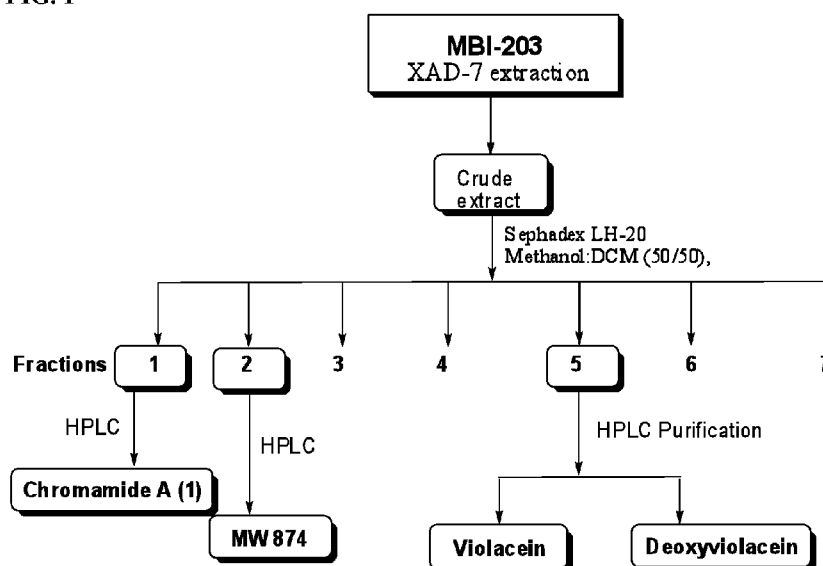
Published:

- with international search report (Art. 21(3))

[Continued on next page]

(54) Title: *CHROMOBACTERIUM* BIOACTIVE COMPOSITIONS AND METABOLITES

FIG. 1



(57) Abstract: Provided are bioactive compounds and metabolites derived from *Chromobacterium* species culture responsible for controlling pests, compositions containing these compounds, methods for obtaining these compounds and methods of using these compounds and compositions for controlling pests.



— *before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments (Rule 48.2(h))*

(88) Date of publication of the international search report:
16 August 2012

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2011/057541**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER****A01N 63/02(2006.01)i, C07K 5/08(2006.01)i, C07K 7/06(2006.01)i, C07K 7/64(2006.01)i, A01P 7/00(2006.01)i**

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A01N 63/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean utility models and applications for utility models

Japanese utility models and applications for utility models

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS(KIPO internal) & Keywords: chromobacterium, pesticidal, modulating, nematode

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y A	US 2007-0172463 A1 (MARTIN, P. A. W. et al.) 26 July 2007 See abstract; claims 4-11; paragraph [0062]	11 1-5, 7-10, 12-18
Y	Cronin, D. et al., Inhibition of egg hatch of the potato cyst nematode <i>Globodera rostochiensis</i> by chitinase-producing bacteria, European Journal of Plant Pathology, 1997, 103, pp. 433-440 See abstract; Materials and methods; and Results	11
A	Martin, P. A. M. et al., <i>Chromobacterium subtsugae</i> sp. nov., a betaproteobacterium toxic to Colorado potato beetle and other insect pests, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2007, volume 57, pp. 993-999 See abstract; Toxicity to insects; and Conclusions	1-5, 7-18
A	MARTIN, P.A.W. et al., Toxicity of <i>Chromobacterium subtsugae</i> to Southern Green Stink Bug (Heteroptera: Pentatomidae) and Corn Rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae). Journal of economic entomology, 2007, volume 100, number 3, pages 680-684 See abstract and Results	1-5, 7-18

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

25 JUNE 2012 (25.06.2012)

Date of mailing of the international search report

26 JUNE 2012 (26.06.2012)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
189 Cheongsu-ro, Seo-gu, Daejeon Metropolitan
City, 302-701, Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

KANG Young Jin

Telephone No. 82-42-481-8391



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2011/057541**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☒ Claims Nos.: 19
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/US2011/057541

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2007-0172463 A1	26.07.2007	US 2005-0074431 A1	07.04.2005
		US 7244607 B2	17.07.2007
		WO 2005-032250 A2	14.04.2005
		WO 2005-032250 A3	08.06.2006

COMPOSICIONES BIOACTIVAS DE *CHROMOBACTERIUM* Y METABOLITOS

CAMPO DE LA INVENCION

Se describen en la presente composiciones bioactivas y metabolitos derivados de *Chromobacterium* y particularmente cultivo de *Chromobacterium substugae* responsable de controlar plagas así como también sus métodos de uso para controlar plagas.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Los productos naturales son sustancias producidas por microbios, plantas y otros organismos. Los productos microbianos naturales ofrecen una fuente abundante de diversidad química, y existe una larga historia de utilización de productos naturales para propósitos farmacéuticos. Debido al énfasis en productos naturales para terapéuticos humanos, en donde más de 50% se derivan de productos naturales, solamente 11% de pesticidas se derivan de fuentes naturales. Sin embargo, pesticidas de productos naturales tienen un potencial para jugar un papel importante en el control de plagas en granjas tanto convencionales como orgánicas. Los metabolitos secundarios producidos por microbios (bacterias, actinomicetes y hongos), proporcionan nuevos compuestos químicos los cuales pueden ser usados ya sea solos o en combinación con compuestos conocidos para controlar efectivamente plagas de insectos y reducir el riesgo de desarrollo de resistencia. Existen varios ejemplos bien conocidos de productos naturales microbianos que son exitosos como insecticidas agrícolas (Thompson et al., 2000; Arena et al., 1995; Krieg et al. 1983).

El desarrollo de un pesticida microbiano inicia con el aislamiento de un microbio en un cultivo puro. Después procede con selección de espectro y eficacia usando ensayos a escala *in*

vitro, *in vivo* o pilotos en invernaderos y en el campo. Al mismo tiempo, los compuestos activos producidos por el microbio son aislados e identificados. Para la comercialización de un pesticida microbiano, el microbio tiene que ser económicamente producido por fermentación a una escala industrial y formulado con aditivos biocompatibles y aprobados para incrementar la eficacia y maximizar la facilidad de aplicación así como también la estabilidad de almacenaje bajo condiciones de campo.

Como los granjeros observan ampliar su arsenal insecticida y como nuevos productos microbianos se colocan en el mercado, existe un potencial para que ocurra una variedad de interacciones entre nuevos y viejos insecticidas. A menudo se han usado combinaciones de 2 o más insecticidas aplicados a un cultivo único simultáneamente o secuencialmente. Para atender estas preocupaciones, científicos han examinado la interacción de aceites, hongos y pesticidas químicos contra plagas e insectos benéficos usando métodos de alimentación y tópicos (véase, por ejemplo, Chalvet-Monfray, Sabatier et al. 1996; Meunier, Carubel et al. 1999; Hummelbrunner and Isman 2001; Wirth, Jiannino et al. 2004; Farenhorst, Knols et al. 2010; Shapiro-Ilan, Cottrell et al. 2011); sin embargo, no todas las interacciones se han estudiado aún.

Chromobacterium

La cepa Beta-Proteobacterium, *Chromobacterium subtsugae*, exhibe actividad pesticida contra una amplia variedad de insectos (Martin, Blackburn et al. 2004; Martin 2004; Martin, Gundersen-Rindal et al. 2007; Martin, Hirose et al. 2007; Martin, Shropshire et al. 2007). El modo de acción parece ser una combinación de actividad de toxina y anti-alimentaria, con

inhibición de alimentación observada a dosis subletales (Martin, Gundersen-Rindal et al. 2007). En particular, se ha encontrado que *Chromobacterium substugae* son efectivas contra el escarabajo colorado adulto de la papa (*Leptinotarse decemlineata*), gusano occidental de la raíz del maíz adulto (*Diabrotica virgifera*), gusano sureño de la raíz del maíz adulto y larval (*Diabrotica undecimpunctata*), escarabajo colmenar larval (*Aethina tumida*), polillas dorso de diamante larval (*Plutella xylostella*), palomilla de la papa dulce larval (*Bernisia tabaci*) y chinche verde del sur adulta (*Nezara viridula*).

Desde el hallazgo de *C. substugae* por Martin y sus colaboradores, al menos tres nuevas especies de *Chromobacteria* se han aislado y caracterizado; Young et al. (2008) asiló una nueva especie de *Chromobacterium*, *C. aquaticum*, de muestras agua de manantial en Taiwán, y Kampfer et al. (2009) aisló dos especies, *C. piscinae* y *C. pseudoviolaceum*, de muestras ambientales recolectadas en Malaysia.

Metabolitos secundarios del género *Chromobacterium*

De todas las especies conocidas de *Chromobacteria*, la más estudiada es *Chromobacterium violaceum*, y la información publicada en metabolitos secundarios producidos por *Chromobacteria* se basa en estudios en *Chromobacterium violaceum* solamente. Durán y Menck (2001) han publicado una revisión comprehensiva de las perspectivas farmacológicas e industriales de *Chromobacterium violaceum*, una saprófita Gram-negativa del suelo y agua. Se consideran normalmente no patogénicas a humanos, pero como un patógeno oportunista, han sido ocasionalmente el agente causativo para septicemia e infecciones fatales en humanos y animales. El *Chromobacterium violaceum* se conoce por producir

un pigmento púrpura, violaceína, el cual es una molécula bisindol generada por una fusión de las dos moléculas de L-triptofano en la presencia de oxígeno (Hoshino et al., 1987; Ryan and Drennan; 2009). La biosíntesis de violaceína es regulada por detección de quórum, un mecanismo común que regula varias otras trayectorias del metabolismo secundario en bacterias Gram-negativas (McClellan et al., 1997).

Otros metabolitos conocidos de *Chromobacterium violaceum* resumidos por Durán y Menck (2001) incluyen cianuro de hidrógeno, ferrioxamina E, glicopéptidos B-lactámicos SQ28,504 y SQ28,546, antibióticos tales como aerocianidina, aerocavina, 3,6-dihidroxi-indoxaceno, y monobactam SB-26.180, y un depsipéptido antitumoral FR901228. De conformidad con el artículo revisado por Durán y Menck (2001), el *Chromobacterium violaceum* también produce compuestos de azúcar inusual tales como polisacáridos extracelulares y lipopolisacáridos.

Nemátodos y Nematocidas

Los nemátodos son no segmentados, bilateralmente simétricos, invertebrados similares a gusanos que poseen una cavidad corporal y sistema digestivo completo pero carecen de sistemas respiratorio y circulatorio. Su pared corporal está compuesta de una cutícula de capas múltiples, una hipodermis con cuatro cordones longitudinales y musculatura interna (Chitwood, 2003). Sus contenidos corporales están principalmente ocupados por sistemas reproductivos y digestivos. La mayoría de nemátodos son de vida libre pero un número pequeño de especies son parásitos ubicuos de animales o plantas.

Los nemátodos del nudo de la raíz (*Meloidogyne* spp.) parasitizan un amplio intervalo de cultivos anuales y perenes,

impactando tanto en calidad como cantidad de rendimientos comerciales. Los nemátodos en este género son considerados los nemátodos parasíticos de plantas más importantes económicamente (Whitehead, 1998). Las pérdidas de cultivos anuales causadas por nemátodos parasíticos de las plantas se han estimado por exceder \$100 billones de dólares (Koenning et al. 1999), con más de la mitad causada por el género *Meloidogyne*. El inoculo en esta cepa viene de huevos que bajo condiciones favorables eclosionan para liberar larvas infectivas de segunda etapa (J2s), las cuales migran en el suelo hacia una raíz de planta hospedera. La infección ocurre a través de la penetración en la punta de la raíz, después de lo cual las larvas se mueven al tejido vascular en donde los nemátodos llegan a ser sedentarios, alimentándose directamente de células de plantas. La planta responde produciendo células gigantes que forman agallas (nudos de la raíz). A través de la vida reproductiva, las hembras permanecen incrustadas en el tejido de la planta, y solamente las masas de huevos sobresalen de la raíz.

Los medios más eficientes para controlar nemátodos del nudo de la raíz son vía nematicidas que inhiben ya sea el eclosionamiento del huevo, movilidad juvenil y/o infectividad de la planta. El desarrollo del control químico para nemátodos parasíticos de plantas es desafiante debido a ambas razones ambientales y fisiológicas: 1. Nemátodos muy fitoparasíticos viven en un área confinada en el suelo cerca de las raíces y por lo tanto, se dificulta el suministro de un nematicida químico. 2. La superficie externa de nemátodos es un objetivo bioquímico pobre, y es impermeable a muchas moléculas orgánicas (Chitwood, 2003). Sin embargo, el suministro de compuestos tóxicos por una

ruta oral es casi imposible debido a que la mayoría de las especies parasíticas de plantas ingieren material solamente después de que han penetrado e infectado las raíces de las plantas. Por lo tanto, los nematicidas han pretendido ser toxinas de amplio espectro con alta volatilidad o con otras propiedades químicas y físicas promoviendo su movilidad en el suelo.

Durante la década pasada, hidrocarburos halogenados (por ejemplo, dibromuro de etileno, bromuro de metilo) han sido los nematicidas más pesadamente usados alrededor del mundo. Debido a su alta toxicidad humana y efectos perjudiciales en la capa de ozono estratosférica, estos compuestos fueron prohibidos en el Protocolo de Montreal pero el uso de bromuro de metilo para el control de patógenos de plantas y nemátodos se extendió en los Estados Unidos debido a la carencia de productos de sustitución. Junto con organofosfatos, los carbamatos son los nematicidas no fumigantes más efectivos. Desafortunadamente, muchos carbamatos tales como aldicarb y oxamil también son altamente tóxicos. A partir de Agosto de 2010, el fabricante de aldicarb, Bayer, se ha comprometido a cancelar todos los registros de productos en papas y cítricos en los Estados Unidos, y el aldicarb será completamente desfasado a finales de Agosto de 2018. Recientemente, la abamectina - una mezcla de dos avermectinas producidas por un actinomiceto del suelo, *Streptomyces avermitilis* - ha sido registrada para uso nematicida (Faske and Starr, 2006). Syngenta comercializa este ingrediente activo como un tratamiento para semilla para algodón y vegetales bajo el nombre comercial Avicta®.

Varios patógenos de nemátodos/plantas antimicrobianos han sido reportados por ser activos contra nemátodos parasíticos

de plantas (Guerena, 2006). Estos agentes de control biológico incluyen las bacterias *Bacillus thuringiensis*, *Burkholderia cepacia*, *Pasteuria penetrans* y *P. usgae*. Pasteuria Biosciences ha lanzado *P. usgae* contra nemátodos picadores en césped en el sureste de los Estados Unidos. Los hongos nematocidas incluyen *Trichoderma harzianum*, *Hirsutella rhossiliensis*, *H. minnesotensis*, *Verticillium chlamydosporum*, *Arthrobotrys dactyloides*, y *Paecilomyces lilanicus* (comercializado como BioAct® y Melcon® por Prophyta). Otro hongo, *Myrothecium verrucaria* está disponible en una formulación comercial, DiTera®, por Valent Biosciences. Este es un hongo inactivo; por lo tanto la actividad es debido a los compuestos nematocidas. Otros bionematocidas comerciales incluyen Deny® y Blue Circle® (*B. cepacia*), Activate® (*Bacillus chitinosporus*) (Quarles, 2005) y un producto Israelí BioNem® (*Bacillus firmus*) (ahora comercializado por Bayer como un tratamiento para semillas Votivo®) (Terefe et al. 2009). Se ha supuesto que el efecto perjudicial de aislados microbianos en eclosionamiento de huevos de nemátodos, movilidad juvenil e infectividad puede ser atribuida a toxinas producidas por estos organismos (Hallman and Sikora, 1996; Marrone et al, 1998; Siddiqui and Mahmood, 1999; Saxena et al., 2000; Meyer and Roberts, 2002), la capacidad para parasitizar o aún atrapar nemátodos (Siddiqui and Mahmood, 1996; Kerry, 2001; Jaffee and Muldoon, 1995), la inducción de resistencia sistémica (Hasky-Gunther et al. 1998), el cambio del comportamiento del nemátodo (Sikora and Hoffman-Hergarter, 1993) o interferencia con el reconocimiento de la planta (Oostendorp and Sikora, 1990).

Nematocidas botánicos, tales como extractos de plantas y aceites esenciales, se pueden usar para controlar alimentos

(Kokalis-Burrelle and Rodriguez-Kabana, 2006). Chitwood ha resumido las opciones de usar compuestos derivados de plantas para el control de nemátodos en su reciente artículo revisado (Chitwood, 2002). Siddiqui y Alam (2001) demostraron que tierra para macetas modificada con partes de plantas del árbol de neem (*Azadirachta indica*) y árbol del paraíso (*Melia azadirah*) inhibe el desarrollo de nemátodos del nudo de la raíz de tomates. Sin embargo, productos de neem no están actualmente registrados en los Estados Unidos para uso contra nemátodos. Un nuevo producto botánico de Chile (Nema-Q®) a base de un extracto de árbol de *Quillaja saponaria* que contiene saponinas (derivados bidesmosídicos de ácido quillájico sustituido con un trisacárido en C-3 y un oligosacárido en C-28), ha sido recientemente registrado como un nematicida orgánico a través de la EPA de Estados Unidos y listado para granjas orgánicas por el Instituto de Revisión de Materiales Orgánicos (OMRI). Es comercializado por Monterey AgResources.

La rotación de cultivos a un cultivo no hospedero es a menudo adecuada por sí misma para prevenir a poblaciones de nemátodos de alcanzar niveles económicamente dañinos (Guerena 2006). Los aleloquímicos son compuestos producidos por plantas que afectan el comportamiento de organismos en el ambiente de la planta. Ejemplos de aleloquímicos nematocidas incluyen politienilos, glucisonolatos, alcaloides, lípidos, terpenoides, esteroides, triterpenoides y fenólicos (Kokalis-Burrelle and Rodriguez-Kabana, 2006; Chitwood, 2002). Cuando se cultivan como cultivos de cobertura, los compuestos bioactivos de plantas alelopáticas son exudados durante el periodo de crecimiento y/o liberados al suelo durante la descomposición de la biomasa. Los

cultivos de Brassica pueden ser usados para biofumigación -una estrategia para manejo de plagas con base en la liberación de volátiles biocidas durante la descomposición de tejido incorporado en el suelo (Kirkegaard and Sarwar, 1998). Sin embargo, estudios de Roubtsova et al (2007) en el efecto de la descomposición del tejido de brócoli en números de *M. incognita* indica que para el control apropiado, fue necesario en mezclado completo de tejido de planta con el volumen completo del suelo infectado con el nemátodo.

El futuro del control de nemátodos en suelos agrícolas depende de dos factores: desarrollo de cultivos resistentes a nemátodos y el descubrimiento y desarrollo de nuevos nematicidas menos tóxicos, de amplio espectro. El costo de investigación, desarrollo y registro de nuevos nematicidas químicos es extremadamente alto (>\$200 millones de dólares), los cuales limitan su desarrollo. De los 497 nuevos ingredientes activos registrados para uso como un pesticida desde 1967 hasta 1997, solamente siete se registraron como nematicidas (Aspelin and Grube, 1999). Además de los métodos químicos convencionales, el ARN de interferencia (RNAi) ha sido propuesto como un método para controlar nemátodos. El uso de silenciamiento de gen vía ARNi fue demostrado primero en *Caenorhabditis elegans* y casi recientemente también para nemátodos parasíticos de las plantas tales como *Meloidogyne* spp. (Bakhetia et al. 2005). La búsqueda para nuevas cepas microbianas para uso como fuentes para nematicidas biológicos es una meta importante para reducir el daño económico significativo causado por nemátodos parasíticos de plantas así como también para reducir el uso de compuestos tóxicos actualmente registrados para el control de nemátodos.

De conformidad con Sasser y Freckman (1987), las pérdidas de cultivos por nemátodos varían desde 8 hasta 20% en cultivos principales alrededor del mundo. Los nemátodos parasíticos de plantas pueden causar considerable daño al cultivo con pérdidas anuales estimadas en \$87 billones de dólares en todo el mundo (Dong and Zhang, 2006). Variedades de cultivos resistentes a nemátodos y nematicidas químicos son actualmente las opciones principales para el control de nemátodos. Fumigantes tales como bromuro de metilo son muy efectivos en controlar tanto enfermedades de plantas originadas por el suelo como nemátodos pero debido a la alta toxicidad de mamíferos, efectos de la capa de ozono y otros efectos residuales, el uso de bromuro de metilo ya ha sido prohibido en varios países y su completo retiro del mercado se planeó por acuerdo internacional (Oka et al., 2000). Alternativas químicas tales como yoduro de metilo, 1,3-Dicloropropeno, y colorpicrina también tienen problemas con la seguridad de los mamíferos y ambiental. Nematicidas no fúngicos químicos están siendo desfasados y prohibidos. Más recientemente, la EPA Estadounidense anunció que el aldicarb está siendo desfasado.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Proporcionados en la presente están nuevos usos y combinaciones y, en particular, composiciones que comprenden una cepa de *Chromobacterium* sp., particularmente una cepa de *Chromobacterium substugae* y más particularmente, una cepa de *Chromobacterium substugae* sp. nov. y aún más particularmente una cepa de *Chromobacterium substugae* sp. nov. que tiene las características de identificación de NRRL B-30655 descrito en la Patente Estadounidense No. 7,244,607.

De este modo proporcionado en la presente está un método para modular la infestación de nemátodos en una planta que comprende aplicar a una planta, y/o semillas de la misma y/o sustrato usado para hacer crecer la planta, una cantidad de un sobrenadante, filtrado y/o extracto y/o uno o más metabolitos del sobrenadante, filtrado y/o extracto de una cepa de *Chromobacterium* sp., particularmente una cepa de *Chromobacterium substugae* y más particularmente, una cepa de *Chromobacterium substugae* sp. nov. y aún más particularmente una cepa de *Chromobacterium substugae* sp. nov. que tiene las características de identificación de NRRL B-30655 descrito en la Patente Estadounidense No. 7,244,607 y opcionalmente otra sustancia nematocida en una cantidad efectiva para modular la infestación de nemátodos.

También proporcionada en la presente está una combinación pesticida sinérgica con al menos una plaga que comprende como componentes activos: (a) un sobrenadante, filtrado y/o extracto de una cepa de *Chromobacterium* sp., particularmente una cepa de *Chromobacterium substugae* y más particularmente, una cepa de *Chromobacterium substugae* sp. nov. y aún más particularmente una cepa de *Chromobacterium substugae* sp. nov. que tiene las características de identificación de NRRL B-30655 descrita en la Patente Estadounidense No. 7,244,607 y/o uno o más metabolito(s) del sobrenadante, filtrado y/o extracto de *Chromobacterium* sp., particularmente una cepa de *Chromobacterium substugae* y más particularmente, una cepa de *Chromobacterium substugae* sp. nov. y aún más particularmente una cepa de *Chromobacterium substugae* sp. nov. que tiene las características de identificación de NRRL B-30655 descrita en la Patente

Estadounidense No. 7,244,607 y (b) otra sustancia pesticida, en donde (a) y (b) están presentes en cantidades sinérgicas. La plaga, en una modalidad particular, puede ser una plaga de insecto, pero puede también incluir, pero no se limita a, un nemátodo, hongos de plantas, virus de plantas y bacterias de plantas y malezas. Además, la combinación puede ser una composición. La sustancia plaguicida puede ser (a) derivada de un microorganismo; (b) un producto natural y/o (c) un pesticida químico y en particular un insecticida químico.

En particular, la combinación puede comprender un sobrenadante, filtrado y/o extracto de *Chromobacterium* sp., particularmente una cepa de *Chromobacterium substugae* y más particularmente, una cepa de *Chromobacterium substugae* sp. nov. y aún más particularmente una cepa de *Chromobacterium substugae* sp. nov. que tiene las características de identificación de NRRL B-30655 descrita en la Patente Estadounidense No. 7,244,607, y una sustancia pesticida derivada de un microorganismo que incluye pero no se limita a *Bacillus* sp. (por ejemplo, *Bacillus thuringiensis* o *Bacillus thuringiensis kurstaki*) y spinosad. Alternativamente, la combinación puede comprender un sobrenadante, filtrado y/o extracto de una cepa de *Chromobacterium* sp., particularmente una cepa de *Chromobacterium substugae* y más particularmente, una cepa de *Chromobacterium substugae* sp. nov. y aún más particularmente una cepa de *Chromobacterium substugae* sp. nov. que tiene las características de identificación de NRRL B-30655 descrita en la Patente Estadounidense No. 7,244,607, y una sustancia pesticida derivada de un producto natural tal como piretrum. Alternativamente, la combinación puede comprender un sobrenadante, filtrado y/o

extracto de una cepa de *Chromobacterium* sp., particularmente una cepa de *Chromobacterium substugae* y más particularmente, una cepa de *Chromobacterium substugae* sp. nov. y aún más particularmente una cepa de *Chromobacterium substugae* sp. nov. que tiene las características de identificación de NRRL B-30655 descrita en la Patente Estadounidense No. 7,244,607, y una sustancia pesticida la cual es un pesticida químico, particularmente, un insecticida, donde el insecticida incluye pero no se limita a piretrinas, espirotetramet y organoclorinas.

En un aspecto relacionado, proporcionado en la presente está un método para modular sinérgicamente la infestación de al menos una plaga o especies de plagas en una planta que comprende aplicar a una planta y/o semillas de la misma y/o sustrato para hacer crecer la planta, las combinaciones expuestas anteriormente con una cantidad de la combinación efectiva para modular la infestación la plaga o especies de plagas. También proporcionados en la presente están compuestos aislados obtenibles o derivados de especies de *Chromobacterium*, más particularmente, *Chromobacterium substugae* y más particularmente, una cepa de *Chromobacterium substugae* sp. nov. y aún más particularmente una cepa de *Chromobacterium substugae* sp. nov. que tiene las características de identificación de NRRL B-30655 descrita en la Patente Estadounidense No. 7,244,607 o alternativamente, organismos capaces de producir estos compuestos que pueden ser usados para controlar varias plagas, y particularmente, plagas nematocidas.

En una modalidad, el compuesto puede ser un compuesto que (a) tiene actividad pesticida; (b) tiene un peso molecular de aproximadamente 840-900 como se determina por Cromatografía

Líquida/Espectroscopia de Masas (LC/MS) y (c) tiene una Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC) tiempo de retención de aproximadamente 7-12 minutos en una columna HPLC C-18 de fase inversa usando un sistema de solvente de gradiente agua:acetonitrilo (CH₃CN) (0-20 min; 90 - 0% CH₃CN acuoso, 20-24 min; 100% CH₃CN, 24-27 min; 0-90% CH₃CN acuoso, 27-30 min; 90% CH₃CN acuoso) a 0.5 mL/min velocidad de flujo y detección UV de 210 nm y (d) se obtiene opcionalmente de una cepa de *Chromobacterium sp.*, particularmente una cepa de *Chromobacterium substagae* y más particularmente, una cepa de *Chromobacterium substagae* sp. nov. y aún más particularmente una cepa de *Chromobacterium substagae* sp. nov. que tiene las características de identificación de NRRL B-30655 descrita en la Patente Estadounidense No. 7,244,607. El compuesto en una modalidad puede ser un péptido.

En una modalidad particular, el compuesto tiene 43 carbonos, siete metilos, diez carbonos de metileno, doce metinas, 6 metinas olefínicas, y ocho carbonos cuaternarios como se determina por ¹³C NMR.

En una modalidad específica, el compuesto "A": (a) es obtenible de una especie de *Chromobacterium sp.*, y más particularmente, una cepa de *Chromobacterium substagae* sp. nov. y aún más particularmente una cepa de *Chromobacterium substagae* sp. nov. que tiene las características de identificación de NRRL B-30655 descrita en la Patente Estadounidense No. 7,244,607; (b) es tóxico a una plaga; (c) tiene un peso molecular de aproximadamente 840-890 y más particularmente, 860 como se determina por Cromatografía Líquida/Espectroscopia de Masas (LC/MS); (d) tiene valores de ¹H NMR de δ 8.89, 8.44, 8.24, 8.23,

7.96, 7.63, 6.66, 5.42, 5.36, 5.31, 5.10, 4.13, 4.07, 4.05, 3.96, 3.95, 3.88, 3.77, 3.73, 3.51, 3.44, 3.17, 2.40, 2.27, 2.11, 2.08, 2.03, 2.01, 1.97, 1.95, 1.90, 1.81, 1.68, 1.63, 1.57, 1.53, 1.48, 1.43, 1.35, 1.24, 1.07, 1.02, 0.96, 0.89, 0.88, 0.87, 0.80 y tiene valores de ^{13}C NMR de δ 173.62, 172.92, 172.25, 172.17, 171.66, 171.28, 170.45, 132.13, 130.04, 129.98, 129.69, 129.69, 125.48, 98.05, 70.11, 69.75, 68.30, 68.25, 64.34, 60.94, 54.54, 52.82, 49.72, 48.57, 45.68, 40.38, 39.90, 38.18, 36.60, 31.98, 31.62, 31.58, 29.53, 28.83, 27.78, 24.41, 23.06, 22.09, 20.56, 19.31, 18.78, 17.66, 15.80 (e) tiene una Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC) tiempo de retención de aproximadamente 7-12 minutos, más específicamente aproximadamente 9 minutos y aún más específicamente aproximadamente 9.08 min en una columna HPLC C-18 de fase inversa (Phenomenex, Luna 5 μ C18(2) 100 A, 100 x 4.60 mm) usando agua:acetonitrilo (CH_3CN) con un sistema solvente de gradiente (0-20 min; 90-0% CH_3CN acuoso, 20-24 min; 100% CH_3CN , 24-27 min; 0-90% CH_3CN acuoso, 27-30 min; 90% CH_3CN acuoso) a 0.5 mL/min velocidad de flujo y detección UV de 210 nm. En particular, el espectro de ^{13}C NMR revela señales para 43 carbonos, para siete metilos, diez carbonos de metileno, doce metinas, 6 metinas olefínicas, ocho carbonos cuaternarios y/o el espectro de ^1H NMR exhibe características de un péptido típico, ilustrando cinco señales de NH de amida [δ_{H} : 8.89, 8.44, 8.23, 8.22, 7.96], una señal de NH_2 de amina [δ_{H} : 7.64, 6.65], seis protones α -amino [δ_{H} : 4.07, 4.06, 3.96, 3.95, 3.88, 3.72] y en el espectro de ^{13}C NMR, seis/siete resonancias de amida o éster [δ_{C} : 173.62, 172.92, 172.25, 172.17, 171.66, 171.28, 170.45].

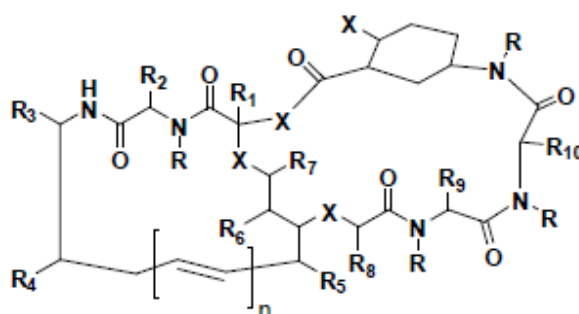
En otra modalidad específica, el compuesto "B" tiene

las siguientes características: (a) es obtenible de una cepa de *Chromobacterium sp.*, particularmente una cepa de *Chromobacterium substugae* y más particularmente, una cepa de *Chromobacterium substugae sp. nov.* y aún más particularmente una cepa de *Chromobacterium substugae sp. nov.* que tiene las características de identificación de NRRL B-30655 descrita en la Patente Estadounidense No. 7,244,607; (b) es tóxico a una plaga; (c) tiene un peso molecular de aproximadamente 850-900 y más particularmente, 874 como se determina por Cromatografía Líquida/Espectroscopia de Masas (LC/MS); (d) tiene una Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC) tiempo de retención de aproximadamente 7-12 minutos, más específicamente aproximadamente 9 minutos y aún más específicamente aproximadamente 9.54 min en una columna HPLC C-18 de fase inversa (Phenomenex, Luna 5 μ C18(2) 100 A, 100 x 4.60 mm) usando agua:acetonitrilo (CH₃CN) con un sistema solvente de gradiente (0-20 min; 90-0% CH₃CN acuoso, 20-24 min; 100% CH₃CN, 24-27 min; 0-90% CH₃CN acuoso, 27-30 min; 90% CH₃CN acuoso) a 0.5 mL/min velocidad de flujo y detección UV de 210 nm.

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

(A) un compuesto que tiene la estructura

##STR001##



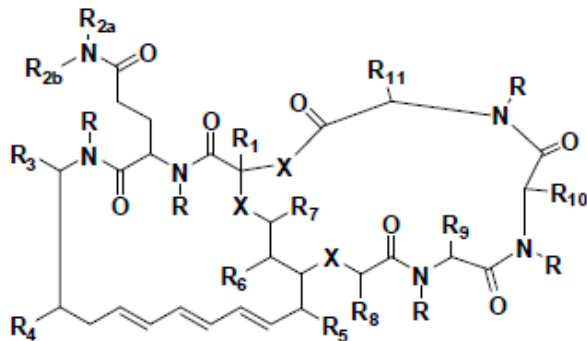
##STR001##

o una sal pesticídicamente aceptable o estereoisómeros

de la misma, en donde R es -H, alquilo de cadena inferior que contiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 porciones alquilo, porciones arilo o arilalquilo, alquilo inferior sustituido; X es O, NH, NR o S; n es 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9; R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, R₇, R₈, R₉, R₁₀, R₁₁ son cada uno independientemente H, son el mismo o diferente e independientemente una porción de cadena lateral de aminoácido o un derivado de cadena lateral de aminoácido, alquilo, alquilo sustituido, alquenoilo, alquenoilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterocíclico, heterocíclico sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, tioalquilo, tioalquilo sustituido, hidroxilo, halógeno, amino, amido, carboxilo, -C(O)H, acilo, oxiacilo, carbamato, sulfonilo, sulfonamida, o sulfurilo;

(B) un compuesto que tiene la estructura

##STR001a##

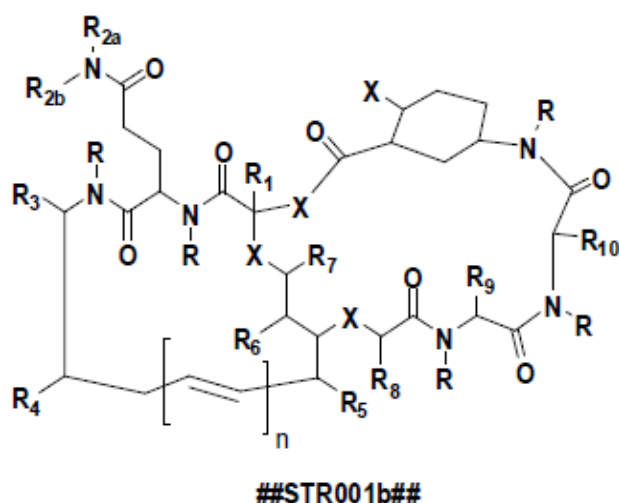


##STR001a##

en donde R es -H, alquilo de cadena inferior que contiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 porciones alquilo, porciones arilo o arilalquilo, alquilo inferior sustituido; X es O, NH, NR o S; R_{2a}, R_{2b} se seleccionan independientemente a partir del grupo que consiste de -H, alquilo, alquilo inferior, alquilo sustituido y alquilo inferior sustituido; R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, R₇, R₈, R₉, R₁₀, R₁₁ son cada uno independientemente H, son el

mismo o diferente e independientemente una porción de cadena lateral de aminoácido o un derivado de cadena lateral de aminoácido, alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterocíclico, heterocíclico sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, tioalquilo, tioalquilo sustituido, hidroxi, halógeno, amino, amido, carboxilo, $-C(O)H$, acilo, oxiacilo, carbamato, sulfonilo, sulfonamida, o sulfurilo.

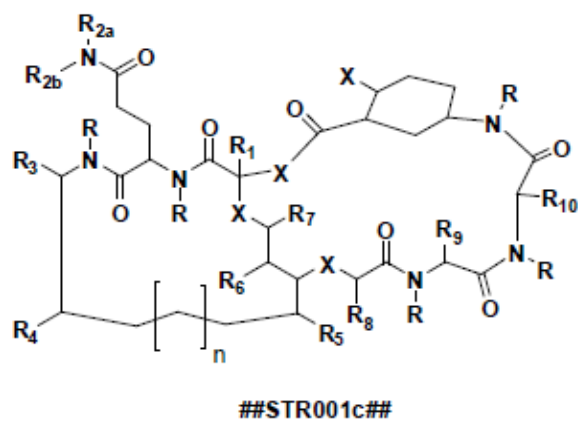
(C) un compuesto que tiene la estructura
##STR001b##



en donde R es -H, alquilo de cadena inferior que contiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 porciones alquilo, porción alquilo o arilalquilo, alquilo inferior sustituido; X es O, NH, NR o S; n es 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9;; R_{2a}, R_{2b} se seleccionan independientemente a partir del grupo que consiste de -H, alquilo, alquilo inferior, alquilo sustituido y alquilo inferior sustituido; R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, R₇, R₈, R₉, R₁₀, R₁₁ son cada uno independientemente H, son el mismo o diferente e independientemente una porción de cadena lateral de aminoácido o un derivado de cadena lateral de aminoácido, alquilo, alquilo

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

(D) un compuesto que tiene la estructura
##STR001c##



en donde R es -H, alquilo de cadena inferior, porción arilo o arilalquilo, alquilo inferior sustituido que contiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 porciones alquilo; X es O, NH, NR o S; n es 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9; R_{2a}, R_{2b} se seleccionan independientemente a partir del grupo que consiste de -H, alquilo, alquilo inferior, alquilo sustituido y alquilo inferior sustituido; R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, R₇, R₈, R₉, R₁₀, R₁₁ son cada uno independientemente H, son el mismo o diferente e independientemente una porción de cadena lateral de aminoácido o un derivado de cadena lateral de aminoácido, alquilo, alquilo sustituido, alqueniilo, alqueniilo sustituido, alquiniilo, alquiniilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo

determinar la actividad pesticida y (iii) concentrar fracciones de columna de (ii) para obtener compuesto aislado.

Además se proporcionan composiciones, particularmente composiciones pesticidas que comprenden los compuestos así como también otros compuestos obtenibles de una cepa de *Chromobacterium* sp., particularmente una cepa de *Chromobacterium substugae* y más particularmente, una cepa de *Chromobacterium substagae* sp. nov. y aún más particularmente una cepa de *Chromobacterium substagae* sp. nov. que tiene las características de identificación de NRRL B-30655 descrita en la Patente Estadounidense No. 7,244,607 con actividad pesticida. Estos otros compuestos pueden tener las siguientes características: (a) un peso molecular de aproximadamente 315-360 como se determina por Cromatografía Líquida/Espectroscopia de Masas (LC/MS); (b) una Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC) tiempo de retención de aproximadamente 8-15 minutos en una columna HPLC C-18 de fase inversa usando agua:acetonitrilo (CH₃CN) con un sistema solvente de gradiente (0-20 min; 90-0% CH₃CN acuoso, 20-24 min; 100% CH₃CN, 24-27 min; 0 - 90% CH₃CN acuoso, 27-30 min; 90% CH₃CN acuoso) a 0.5 mL/min velocidad de flujo y detección UV de 210 nm y se puede obtener mediante (A) cultivar una cepa de *Chromobacterium* sp., particularmente una cepa de *Chromobacterium substugae* y más particularmente, una cepa de *Chromobacterium substagae* sp. nov. y aún más particularmente una cepa de *Chromobacterium substagae* sp. nov. que tiene las características de identificación de NRRL B-30655 descrita en la Patente Estadounidense No. 7,244,607, en un medio de cultivo bajo condiciones suficientes para producir el compuesto para obtener una cepa de *Chromobacterium* sp., particularmente una cepa de *Chromobacterium substugae* y más

particularmente, una cepa de *Chromobacterium substagae* sp. nov. y aún más particularmente una cepa de *Chromobacterium substagae* sp. nov. que tiene las características de identificación de NRRL B-30655 descrita en la Patente Estadounidense No. 7,244,607 y (B) aislar el compuesto producido en (A) del caldo de células completo de (A).

En una modalidad particular, un compuesto usado en la composición expuesto anteriormente, el compuesto "C", tiene las siguientes características: (a) es obtenible de una cepa de *Chromobacterium* sp., particularmente una cepa de *Chromobacterium substagae* y más particularmente, una cepa de *Chromobacterium substagae* sp. nov. y aún más particularmente una cepa de *Chromobacterium substagae* sp. nov. que tiene las características de identificación de NRRL B-30655 descrita en la Patente Estadounidense No. 7,244,607; (b) es tóxico a plagas; (c) tiene un peso molecular de aproximadamente 325-360 y más particularmente, aproximadamente 343 como se determina por Cromatografía Líquida/Espectroscopia de Masas (LC/MS); (d) tiene una Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC) tiempo de retención de aproximadamente 8-14 minutos, más específicamente aproximadamente 10 minutos y aún más específicamente aproximadamente 10.88 min en una columna HPLC C-18 de fase inversa (Phenomenex, Luna 5 μ C18(2) 100 A, 100 x 4.60 mm) usando agua:acetonitrilo (CH₃CN) con un sistema solvente de gradiente (0-20 min; 90-0% CH₃CN acuoso, 20-24 min; 100% CH₃CN, 24-27 min; 0 - 90% CH₃CN acuoso, 27-30 min; 90% CH₃CN acuoso) a 0.5 mL/min velocidad de flujo y detección UV de 210 nm. En una modalidad particular, el compuesto "C" puede ser violaceína (2), un compuesto conocido aislado anteriormente de *Chromobacterium*

violaceum.

En otra modalidad, otro compuesto usado en la composición expuesta anteriormente, el compuesto "D", tiene las siguientes características: (a) es obtenible de especies de *Chromobacterium*; (b) es tóxico a una plaga; (c) tiene un peso molecular de aproximadamente 315-350 y más particularmente, aproximadamente 327 como se determina por Cromatografía Líquida/Espectroscopia de Masas (LC/MS); (d) tiene una Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC) tiempo de retención de aproximadamente 10-15 minutos, más específicamente aproximadamente 12 minutos y aún más específicamente aproximadamente 12.69 min en una columna HPLC C-18 de fase inversa (Phenomenex, Luna 5 μ C18(2) 100 A, 100 x 4.60 mm) usando agua:acetonitrilo (CH₃CN) con un sistema solvente de gradiente (0-20 min; 90-0% CH₃CN acuoso, 20-24 min; 100% CH₃CN, 24-27 min; 0 - 90% CH₃CN acuoso, 27-30 min; 90% CH₃CN acuoso) a 0.5 mL/min velocidad de flujo y detección UV de 210 nm. En una modalidad particular, el compuesto "D" puede ser caracterizado como desoxiviolaceína (3), un compuesto conocido aislado anteriormente de *Chromobacterium violaceum*.

Las composiciones además pueden comprender adicionalmente una segunda sustancia, en donde la segunda sustancia es un pesticida químico o biológico y/o al menos una de un portador, diluyente, tensoactivo o adyuvante.

También se proporciona un método para usar los compuestos (por ejemplo, los compuestos "A", "B", "C" y "D") y composiciones expuestas anteriormente para modular infestación de plagas, particularmente plagas de insectos no *Culicidae* (no mosquitos) y plagas nematocidas en una planta que comprende

aplicar a la planta una cantidad del compuesto o composiciones y opcionalmente un segundo pesticida químico o biológico efectivo para modular la infestación de plagas. Además se proporciona el uso de los compuestos expuestos anteriormente para formular una composición para modular la infestación de plagas en una planta.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La FIG. 1 es una representación esquemática del esquema de purificación para obtener los compuestos de la invención a partir del caldo de cultivo.

La FIG. 2 representa el cromatograma de ESI-LCMS para cromamida A (1).

La FIG.3 representa los datos de HRMS para cromamida A (1).

La FIG. 4 representa ^1H NMR para cromamida A (1) en $\text{DMSO}-d_6$ a 600 MHz.

La FIG. 5 representa ^{13}C NMR para cromamida A (1) en $\text{DMSO}-d_6$ a 600 MHz.

La FIG. 6 representa el cromatograma de HPLC para el compuesto B (PM 874).

La FIG. 7 representa estructuras químicas para cromamida A (1) violaceína (2) y desoxiviolaceína (3).

FIG. 8 Porcentaje de nemátodos móviles después del tratamiento con caldo esterilizado de *C. substugae* (1x - no diluido; 0.1x - diluido 10 veces) después de 24 horas.

FIG. 9 Porcentaje de nemátodos móviles después del tratamiento con caldo esterilizado de *C. substugae* (1x - no diluido; 0.1x - diluido 10 veces) después de 48 horas.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Mientras las composiciones y métodos hasta ahora son susceptibles a varias modificaciones y formas alternativas,

modalidades ejemplares serán en la presente descritas en detalle. Se debe entender, sin embargo, que no existe intención de limitar la invención a las formas particulares descritas, sino por el contrario, la intención es cubrir todas las modificaciones, equivalentes, y alternativas que caen dentro del espíritu y alcance de la invención como se define por las reivindicaciones adjuntas.

Donde se proporciona un intervalo de valores, se entiende que cada valor que interviene, a la décima unidad del límite inferior a menos que el contexto claramente lo dicte de otro modo, entre el límite superior e inferior de tal intervalo y cualquier otro valor declarado o que interviene en tal intervalo declarado, está incluido en la misma. Los intervalos más pequeños también están incluidos. Los límites superior e inferior de estos intervalos más pequeños también se incluyen en la misma, sometidos a cualquier límite específicamente excluido en el intervalo declarado.

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

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

Como se define en la presente, "derivada de" significa directamente aislado u obtenido de una fuente particular o alternativamente que tiene características de identificación de una sustancia u organismo aislado u obtenida de una fuente particular. En el caso de que la "fuente" sea un organismo, "derivada de" significa que puede ser aislada u obtenida del organismo mismo o medio usado para cultivar o reproducir el organismo.

Como se define en la presente, "caldo de cultivo completo" se refiere a un cultivo líquido que contiene tanto células como medio. Si la bacteria se hace crecer en una placa las células pueden ser recolectadas en agua u otro líquido, de cultivo completo.

El término "sobrenadante" se refiere al líquido que permanece cuando las células crecen en caldo o se recolectan en otro líquido de una placa de agar y se remueven por centrifugación, filtración, sedimentación u otros medios bien conocidos en la técnica.

Como se define en la presente, "filtrado" se refiere a un líquido de un caldo de cultivo completo que ha pasado a través de la membrana.

Como se define en la presente, "extracto" se refiere a una sustancia líquida removida de las células por un solvente (agua, detergente, amortiguador), y separada de las células por centrifugación, filtración u otro método.

Como se define en la presente, "metabolito" se refiere a un compuesto, sustancia o subproducto de una fermentación de un microorganismo o sobrenadante, filtrado, o extracto obtenido de un microorganismo que tiene actividad pesticida y

particularmente, insecticida. Como se define en la presente, un "compuesto aislado" está esencialmente libre de otros compuestos o sustancias, por ejemplo, al menos aproximadamente 20% puro, preferiblemente al menos aproximadamente 40% puro, más preferiblemente aproximadamente 60% puro, aún más preferiblemente aproximadamente 80% puro, muy preferiblemente aproximadamente 90% puro, y aún muy preferiblemente aproximadamente 95% puro, como se determina por métodos analíticos, que incluyen pero no se limitan a métodos cromatográficos, métodos electroforéticos.

Como se define en la presente, un "portador" es un material inerte, orgánico o inorgánico, con el cual el ingrediente activo se mezcla o fórmula para facilitar su aplicación a la planta u otro objeto a ser tratado, o su almacenaje, transporte y/o manipulación.

El término "modula" se usa para significar alterar la cantidad de infestación de plagas o velocidad de dispersión de infestación de plagas.

Como se define en la presente, el término "infestación de plagas" es la presencia de una plaga en una cantidad que causa un efecto perjudicial que incluye una enfermedad o infección en una población hospedera o emergencia de una maleza indeseada en un sistema de crecimiento.

Como se define en la presente, un "pesticida" es una sustancia derivada de un producto biológico o sustancia química que incrementa la mortalidad o inhibe la tasa de crecimiento de plagas de plantas e incluye pero no se limita a nematocidas, insecticidas, fungicidas de plantas, bactericidas de plantas y virucidas de plantas.

Como se define en la presente, el término "alquilo" se

refiere a un grupo hidrocarburo de cadena ramificada o recta monovalente que tiene de uno hasta aproximadamente 12 átomos de carbono, que incluyen metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, terc-butilo, n-hexilo, y similares.

Como se define en la presente, "alquilo sustituido" se refiere a grupos alquilo que portan además uno o más sustituyentes seleccionados de hidroxilo, alcoxi, mercapto, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, heterocíclico, heterocíclico sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, ariloxi, ariloxi sustituido, halógeno, ciano, nitro, amino, amido, $-\text{C}(\text{O})\text{H}$, acilo, oxiacilo, carboxilo, sulfonilo, sulfonamida, sulfurilo, y similares.

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

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

Como se define en la presente, "arilo" se refiere a grupos aromáticos que tienen en el intervalo de 6 hasta 14 átomos de carbono y "arilo sustituido" se refiere a grupos arilo que además portan uno o más sustituyentes como se expone anteriormente.

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

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

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

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

Como se define en la presente, "heterocíclico", se refiere a grupos cíclicos (es decir, que contienen anillos) grupos que contienen uno o más heteroátomos (por ejemplo, N, O, S, o similares) como parte de la estructura del anillo, y que tienen en el intervalo de 3 hasta 14 átomos de carbono y "heterocíclico sustituido" se refiere a grupos heterocíclicos que

además portan uno o más sustituyentes como se expone anteriormente.

MÉTODOS DE PRODUCCIÓN

Como se indica anteriormente, compuestos o metabolitos se pueden obtener, son obtenibles o derivados de un organismo que tienen las características de identificación de especies de *Chromobacterium*, más particularmente, de un organismo que tiene las características de identificación de una cepa de *Chromobacterium substugae*, más particularmente de una cepa de *Chromobacterium substugae* sp. nov. la cual puede tener las características de identificación de NRRL B-30655, o alternativamente de cualquier otro microorganismo. Los métodos comprenden cultivar estos organismos y obtener los compuestos y/o composiciones de la presente invención aislando estos compuestos del cultivo de estos organismos.

En particular, los organismos son cultivados en medio nutriente usando métodos conocidos en la técnica. Los organismos pueden ser cultivados por cultivación de matraz sacudido, fermentación a escala grande o escala menor (que incluye pero no se limita a fermentaciones continuas, de lote, alimentación por lotes o de estado sólido) en fermentadores industriales o laboratorio realizados en medio adecuado y bajo condiciones que permiten hacer crecer la célula. El cultivo puede tomar lugar en medio nutriente adecuado que comprende fuentes de carbono y nitrógeno y sales inorgánicas, usando procedimientos conocidos en la técnica. Los medios adecuados son disponibles y pueden ser disponibles de fuentes comerciales o preparados de conformidad con composiciones publicadas.

Después del cultivo, un sobrenadante, filtrado y/o

extracto de o derivado de *Chromobacterium* sp. Puede ser usado en la formulación de una composición pesticida.

Alternativamente, después del cultivo, los compuestos y/o metabolitos pueden ser extraídos del caldo de cultivo.

El extracto puede ser fraccionado por cromatografía. Las fracciones cromatográficas pueden ser sometidas a ensayo por actividad tóxica contra, por ejemplo, gusano medidor de la Col (*Trichoplusia ni*) o gusano soldado de la remolacha (*Spodoptera exigua*) usando métodos conocidos en la técnica. Este proceso puede ser repetido una o más veces usando los mismos o diferentes métodos cromatográficos.

Composiciones

Las composiciones pueden comprender caldos de cultivo completo, cultivos líquidos, o suspensiones de una cepa de una *Chromobacterium* sp., por ejemplo, una cepa que tiene las características de identificación de *Chromobacterium substugae* sp. Nov y más particularmente, que tiene las características de identificación de NRRL B-30655 (véase Patente Estadounidense No. 7,244,607), así como también sobrenadantes, filtrados o extractos obtenidos de una cepa de *Chromobacterium* sp., por ejemplo, una cepa que tiene las características de identificación de *Chromobacterium substugae* sp. Nov y más particularmente, que tiene las características de identificación de NRRL B-30655 (véase Patente Estadounidense No. 7,244,607), o el sobrenadante, filtrado y/o extracto o uno o más metabolitos o compuestos aislados derivados de una cepa de *Chromobacterium* sp. o combinaciones de los mencionados anteriormente los cuales en particular tienen actividad nematocida.

Las composiciones expuestas anteriormente pueden ser formuladas en cualquier manera. Ejemplos de formulación no limitante incluyen, pero no se limitan a, Concentrados emulsificables (EC), Polvos humectables (WP), líquidos solubles (SL), Aerosoles, soluciones concentradas de ultra-bajo volumen (ULV), polvos solubles (SP), Microencapsulación, Gránulos dispersados en agua, Fluibles (FL), Microemulsiones (ME), Nano-emulsiones (NE), etc. EN cualquier formulación descrita en la presente, el porcentaje del ingrediente activo está dentro de un intervalo de 0.01% hasta 99.99%.

Las composiciones pueden estar en la forma de un líquido, gel o sólido.

Se puede preparar una composición sólida suspendiendo un portador sólido en una solución de ingrediente(s) activo(s) y secar la suspensión bajo condiciones medias, tales como evaporación a temperatura ambiente o evaporación a vacío a 65°C o inferior.

Una composición puede comprender ingrediente(s) activo(s) encapsulados en gel. Tales materiales encapsulados en gel pueden ser preparados mezclando un agente que forma gel (por ejemplo, gelatina, celulosa o lignina) con un cultivo o suspensión de *Chromobacterium* viva o inactivada, o un filtrado libre de célula o fracción celular de un cultivo o suspensión de *Chromobacterium*, o un cultivo secado por congelamiento o atomización, célula, o fracción de célula en una solución de compuestos pesticidas usados en el método de la invención; e inducir la formación de gel del agente.

La composición puede comprender adicionalmente un tensoactivo a ser usado con el propósito de emulsificación,

dispersión, humectación, dispersión, integración, control de desintegración, estabilización de ingredientes activos y mejoramiento de fluidez o inhibición de roya. En una modalidad particular, el tensoactivo es un tensoactivo no iónico no fitotóxico el cual preferiblemente pertenece a la Lista 4B de EPA. En otra modalidad particular, el tensoactivo no iónico es monolaurato de polioxietileno (20). La concentración de tensoactivos puede variar entre 0.1-35% de la formulación total, el intervalo preferido es 5-25%. La elección de agentes emulsificantes y dispersantes, tales como agentes dispersantes y emulsificantes no iónicos, aniónicos, anfotéricos y catónicos, y la cantidad empleada se determina por la naturaleza de la composición y la capacidad del agente para facilitar la dispersión de las composiciones de la presente invención.

La composición expuesta anteriormente puede ser combinada con otros microorganismos y/o pesticidas (por ejemplo, nematocida, fungicida, insecticida). El microorganismo puede incluir pero no se limita a un agente derivado de *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Brevabacillus* sp., *Lecanicillium* sp., non-*Ampelomyces* sp., *Pseudozyma* sp., *Streptomyces* sp, *Burkholderia* sp, *Trichoderma* sp, *Gliocladium* sp. Alternativamente, el agente puede ser un aceite natural o producto de aceite que tiene actividad fungicida y/o insecticida (por ejemplo, aceite parafínico, aceite del árbol del té, aceite de zacate limón, aceite de clavo, aceite de canela, aceite de cítricos, aceite de romero, piretram). Además, el plaguicida puede ser un agente anti-fúngico de sitio único el cual puede incluir pero no se limita a bencimidazol, un inhibidor de desmetilación (DMI) (por ejemplo, imidazol, piperazina, pirimidina, triazol), morfolina,

hidroxipirimidina, anilinopirimidina, fosforotiolato, inhibidor externo de quinona, quinolina, dicarboximida, carboximida, fenilamida, anilinopirimidina, fenilpirrol, hidrocarburos aromáticos, ácido cinámico, hidroxianilida, antibiótico, polioxina, acilamina, ftalimida, benzenoide (xililalanina), un inhibidor de desmetilación seleccionado a partir del grupo que consiste de imidazol, piperazina, pirimidina y triazol (por ejemplo, bitertanol, miclobutanil, penconazol, propiconazol, triadimefon, bromuconazol, ciproconazol, diniconazol, fenbuconazol, hexaconazol, tebuconazol, tetraconazol), miclobutanil, una diamida antranílica (por ejemplo, clorantranilipol) y un inhibidor externo de quinona (por ejemplo, estrobilurina). La estrobilurina puede incluir pero no se limita a azoxiestrobina, kresoxim-metilo o trifloxiestrobina. En aún otra modalidad particular, el agente anti-fúngico es una quinona, por ejemplo, quinoxifen (4-fluorofenil éter de 5,7-dicloro-4-quinolilo). El agente anti-fúngico también puede ser derivado de un extracto de *Reynoutria*.

El fungicida también puede ser un fungicida químico no inorgánico de sitio múltiple, seleccionado a partir del grupo que consiste de cloronitrilo, quinoxalina, sulfamida, fosfonato, fosfita, ditiocarbamato, cloralquiltios, fenilpiridin-amina, oxima de ciano-acetamida.

La composición puede como se indica anteriormente, comprende además un insecticida. El insecticida puede incluir pero no se limita a avermectina, Bt (por ejemplo, *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*), aceite de neem, spinosads, *Burkholderia* sp. como se expone en el documento WO2011/106491, hongos entomopatógenicos tales como *Beauveria bassiana* e

insecticidas químicos que incluyen pero no se limita a compuestos de organocloro, compuestos de organofósforo, carbamatos, piretroides, piretrinas y neonicotinoides.

Como se indica anteriormente, la composición puede comprender además un nematocida. Este nematocida puede incluir, pero no se limita a, avermectina, productos microbianos tales como Bioma (*Bacillus firmus*), *Pasteuria* spp y productos orgánicos tales como saponinas.

Las composiciones pueden ser aplicadas usando métodos conocidos en la técnica. Específicamente, estas composiciones pueden ser aplicadas a plantas o partes de plantas. Las plantas se entiende por significar en el presente contexto a todas las plantas y poblaciones de plantas tal como se desean y plantas silvestres o cultivos de plantas indeseadas (que incluyen cultivos de plantas que se originan naturalmente). Los cultivos de plantas pueden ser plantas, las cuales se pueden obtener por reproducción vegetal convencional y métodos de optimización o por métodos de ingeniería genética y biotecnológica o por combinaciones de estos métodos, que incluyen las plantas transgénicas y que incluyen cultivares de plantas que se pueden proteger o no proteger por los derechos de los obtentores de plantas. Las partes de plantas se entiende significan todas las partes y órganos de plantas arriba y abajo del suelo, tal como brotes, hojas, flores y raíz, ejemplos de los cuales pueden ser mencionados son hojas, agujas, tallos, troncos, flores, cuerpos de frutos, frutos, semillas, raíces, tubérculos y rizomas. Las partes de plantas también incluyen material recolectado y material de propagación vegetativo y generativo, por ejemplo, esquejes, tubérculos, rizomas, retoños y semillas.

El tratamiento de plantas y partes de plantas con las composiciones expuestas anteriormente se puede llevar a cabo directamente o permitiendo a las composiciones actuar en sus ambientes, hábitat o espacios de almacenajes mediante, por ejemplo, inmersión, atomización, evaporación, inundación, dispersión, pintado o inyección. En el caso de que la composición se aplique a una semilla, la composición puede ser aplicada a la semilla como uno o más revestimientos previos a plantar la semilla usando uno o más revestimientos usando métodos conocidos en la técnica.

Usos

Las composiciones, cultivos, sobrenadantes, metabolitos y compuestos pesticidas expuestos anteriormente, pueden ser usados como pesticidas. En particular, las composiciones, cultivos, sobrenadantes, metabolitos y compuestos pesticidas como se expone anteriormente pueden ser usados como insecticidas y nematocidas, solos o en combinación con una o más sustancias pesticidas como se expone anteriormente.

Específicamente, los nemátodos que pueden ser controlados usando el método expuesto anteriormente incluyen pero no se limitan a nemátodos parasíticos tales como nemátodos del nudo de raíz, quistes, y lesión, que incluyen pero no se limitan a *Meloidogyne* sp. *Tylenchorhynchus* sp., *Hoplolaimus* sp., *Helicotylenchus* sp., *Pratylenchus* sp., *Heterodera* sp., *Globodera* sp., *Trichodorus* sp. *Paratrichodorus* sp., *Xiphinema* sp., y *Criconea* sp.; particularmente *Meloidogyne incognita* (nemátodos del nudo de la raíz), así como también *Globodera rostochiensis* y *globodera pailida* (nemátodos de quiste de papa); *Heterodera glycines* (nemátodo de quiste de soya); *Heterodera schachtii*

(nematodo de quiste de remolacha); y *Heterodera avenae* (nematodo de quiste de cereal).

Insectos fitopatogénicos controlados por el método expuesto anteriormente incluyen pero no se limitan a insectos de larvas no *Culicidae* del orden (a) *Lepidoptera*, por ejemplo, *Acleris* spp., *Adoxophyes* spp., *Aegeria* spp., *Agrotis* spp., *Alabama argillaceae*, *Amylois* spp., *Anticarsia gemmatalis*, *Archips* spp., *Argyrotaenia* spp., *Autographa* spp., *Busseola fusca*, *Cadra cautella*, *Carposina nipponensis*, *Chilo* spp., *Choristoneura* spp., *Clysia ambiguella*, *Cnaphalocrocis* spp., *Cnephasia* spp., *Cochylis* spp., *Coleophora* spp., *Crocidolomia binotalis*, *Cryptophlebia leucotreta*, *Cydia* spp., *Diatraea* spp., *Diparopsis castanea*, *Earias* spp., *Ephestia* spp., *Eucosma* spp., *Eupoecilia ambiguella*, *Euproctis* spp., *Euxoa* spp., *Grapholita* spp., *Hedya nubiferana*, *Heliothis* spp., *Hellula undalis*, *Hyphantria cunea*, *Keiferia lycopersicella*, *Leucoptera scitella*, *Lithocollethis* spp., *Lobesia botrana*, *Lymantria* spp., *Lyonetia* spp., *Malacosoma* spp., *Mamestra brassicae*, *Manduca sexta*, *Operophtera* spp., *Ostrinia nubilalis*, *Pammene* spp., *Pandemis* spp., *Panolis flammea*, *Pectinophora gossypiella*, *Phthorimaea operculella*, *Pieris rapae*, *Pieris* spp., *Plutella xylostella*, *Prays* spp., *Scirpophaga* spp., *Sesamia* spp., *Sparganothis* spp., *Spodoptera* spp., *Synanthedon* spp., *Thaumetopoea* spp., *Tortrix* spp., *Trichoplusia ni* y *Yponomeuta* spp.; (b) *Coleoptera*, por ejemplo, *Agriotes* spp., *Anthonomus* spp., *Atomaria linearis*, *Chaetocnema tibialis*, *Cosmopolites* spp., *Curculio* spp., *Dermestes* spp., *Diabrotica* spp., *Epilachna* spp., *Eremnus* spp., *Leptinotarsa decemlineata*, *Lissorhoptrus* spp., *Melolontha* spp., *Orycaephilus* spp., *Otiorhynchus* spp., *Phlyctinus* spp., *Popillia* spp., *Psylliodes* spp., *Rhizopertha* spp.,

Scarabeidae, *Sitophilus* spp., *Sitotroga* spp., *Tenebrio* spp.,
Tribolium spp. y *Trogoderma* spp.; (c) *Orthoptera*, por ejemplo,
Blatta spp., *Blattella* spp., *Gryllotalpa* spp., *Leucophaea*
maderae, *Locusta* spp., *Periplaneta* spp. y *Schistocerca* spp.; (d)
Isoptera, por ejemplo, *Reticulitermes* spp.; (e) *Psocoptera*, por
ejemplo, *Liposcelis* spp.; (f) *Anoplura*, por ejemplo, *Haematopinus*
spp., *Linognathus* spp., *Pediculus* spp., *Pemphigus* spp. y
Phylloxera spp.; (g) *Mallophaga*, por ejemplo, *Damalinea* spp. y
Trichodectes spp.; (h) *Thysanoptera*, por ejemplo, *Frankliniella*
spp., *Hercinotnrips* spp., *Taeniothrips* spp., *Thrips palmi*, *Thrips*
tabaci y *Scirtothrips aurantii*; (i) *Heteroptera*, por ejemplo,
Cimex spp., *Distantiella theobroma*, *Dysdercus* spp., *Euchistus*
spp., *Eurygaster* spp., *Leptocorisa* spp., *Nezara* spp., *Piesma*
spp., *Rhodnius* spp., *Sahlbergella singularis*, *Scotinophara* spp. y
Tniatoma spp.; (j) *Homoptera*, por ejemplo, *Aleurothrixus*
floccosus, *Aleyrodes brassicae*, *Aonidiella* spp., *Aphididae*, *Aphis*
spp., *Aspidiotus* spp., *Bemisia tabaci*, *Ceroplaster* spp.,
Chrysomphalus aonidium, *Chrysomphalus dictyospermi*, *Coccus*
hesperidum, *Empoasca* spp., *Eriosoma larigerum*, *Erythroneura* spp.,
Gascardia spp., *Laodelphax* spp., *Lecanium corni*, *Lepidosaphes*
spp., *Macrosiphus* spp., *Myzus* spp., *Nephotettix* spp., *Nilaparvata*
spp., *Paratoria* spp., *Pemphigus* spp., *Planococcus* spp.,
Pseudaulacaspis spp., *Pseudococcus* spp., *Psylla* spp., *Pulvinaria*
aethiopica, *Quadraspidiotus* spp., *Rhopalosiphum* spp., *Saissetia*
spp., *Scaphoideus* spp., *Schizaphis* spp., *Sitobion* spp.,
Trialeurodes vaporariorum, *Trioza erytreae* y *Unaspis citri*; (k)
Hymenoptera, por ejemplo, *Acromyrmex*, *Atta* spp., *Cephus* spp.,
Diprion spp., *Diprionidae*, *Gilpinia polytoma*, *Hoplocampa* spp.,
Lasius spp., *Monomorium pharaonis*, *Neodiprion* spp., *Solenopsis*

spp. y *Vespa* spp.; (l) *Diptera*, por ejemplo, *Aedes* spp., *Antherigona soccata*, *Bibio hortulanus*, *Calliphora erythrocephala*, *Ceratitis* spp., *Chrysomyia* spp., *Culex* spp., *Cuterebra* spp., *Dacus* spp., *Drosophila melanogaster*, *Fannia* spp., *Gastrophilus* spp., *Glossina* spp., *Hypoderma* spp., *Hyppobosca* spp., *Liriomyza* spp., *Lucilia* spp., *Melanagromyza* spp., *Musca* spp., *Oestrus* spp., *Orseolia* spp., *Oscinella frit*, *Pegomyia hyoscyami*, *Phorbia* spp., *Rhagoletis pomonella*, *Sciara* spp., *Stomoxys* spp., *Tabanus* spp., *Tannia* spp. y *Tipula* spp.; (m) *Siphonaptera*, por ejemplo, *Ceratophyllus* spp. und *Xenopsylla cheopis* y (n) del orden *Thysanura*, por ejemplo, *Lepisma saccharina*. Los ingredientes activos de conformidad con la invención pueden además ser usados para controlar escarabajos pulga de crucíferas (*Phyllotreta* spp.), larvas de la raíz (*Delia* spp.), picudo de la vaina de la col (*Ceutorhynchus* spp.) y áfidos en cultivos de semillas para aceite tales como canola (colza), semilla de mostaza, e híbridos de los mismos, y también arroz y maíz. En una modalidad particular, el insecto puede ser un miembro de *Spodoptera*, más particularmente, *Spodoptera exigua*, *Myzus persicae*, *Plutella xylostella* o *Euschistus* sp.

Se proporciona la aplicación de una cantidad de control pesticida efectiva de un sobrenadante, filtrado o extracto que contiene un metabolito pesticidamente activo, o compuesto aislado producido por la *Chromobacterium* sp. o aplicación de combinaciones de los anteriores. La cepa o sobrenadante o filtrado o extracto, metabolito y/o compuesto son aplicados, solos o en combinación con otra sustancia pesticida, en una cantidad pesticida o para control pesticida efectiva. Una cantidad efectiva se define como tales cantidades de células de

microorganismo, sobrenadante, filtrado o extracto, metabolito y/o compuesto solo o en combinación con otra sustancia pesticida que es suficiente para modular la infestación de plagas. La tasa efectiva puede ser afectada por especies de plagas presentes, estado de crecimiento de la plaga, densidad de población de la plaga, y factores ambientales tales como temperatura, velocidad del viento, lluvia, tiempo de día y temporada. La cantidad que estará dentro de un intervalo efectivo en un caso particular puede ser determinada por pruebas de campo o laboratorio.

EJEMPLOS

La composición y métodos mostrados anteriormente pueden además ser ilustrados en los siguientes Ejemplos no limitantes. Los ejemplos son ilustrativos de varias modalidades únicamente y no limita la invención reivindicada con respecto a los materiales, condiciones, proporciones en peso, parámetros de proceso y similares descritos en la presente.

Ejemplo 1: EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS A PARTIR DE *CHROMOBACTERIUM SUBSTUGAE*

Se usa el siguiente procedimiento para la purificación de compuestos extraídos del cultivo de *Chromobacterium substugae*:

El caldo de cultivo derivado de la fermentación de *C. substugae* 10 L en caldo L se extrajo con resina Amberlite XAD-7 (Asolkar et al., 2006) agitando la suspensión celular con resina a 225 rpm por dos horas a temperatura ambiente. La resina y la masa celular se recolectaron por filtración a través de estopilla y se lavaron con agua DI para remover las sales. La resina, masa celular y estopilla después se mojaron por 2 horas en acetona/metanol (50/50) después de lo cual la acetona/metanol se filtró y se secó bajo vacío usando evaporador rotatorio para dar

el extracto crudo. El extracto crudo después se fraccionó usando cromatografía de exclusión por tamaño Sephadex LH 20 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$; 50/50) para dar 7 fracciones (Fig. 1). Estas fracciones después se concentraron a sequedad usando evaporador rotatorio y los residuos secos resultantes se tamizaron para actividad biológica usando una alimentación de ensayo con Medidor de la col (*Trichoplusia ni*) o gusano soldado de betabel (*Spodoptera exigua*). Las fracciones activas después se sometieron a HPLC de fase inversa (Spectra System P4000 (Thermo Scientific) para dar compuestos puros, los cuales entonces se tamizaron en bioensayos mencionados anteriormente para localizar/identificar los compuestos activos. Para confirmar la identidad del compuesto, se registraron datos espectroscópicos adicionales tales como LC/MS y NMR.

Se obtuvo cromamida A (1) y el compuesto B de la fracción 1 y 2 respectivamente mientras se purificaron violaceína (2) & desoxiviolaceína (3) de la fracción 5, todos los cuales se obtuvieron de la cromatografía Sephadex LH 20. Las estructuras de estos compuestos se exponen en la FIG. 7.

Purificación de Compuestos

Se realizó la purificación de cromamida A (1) usando columna C-18 por HPLC (Phenomenex, Luna 10u C18(2) 100 A, 250 x 10), sistema de solvente de gradiente agua:acetonitrilo (0-10 min, CH_3CN acuoso al 80-75%; 10-45 min, CH_3CN acuoso al 75-60%; 45-55 min, CH_3CN acuoso al 60-50%; 55-65 min, CH_3CN acuoso al 50-100%; 65-70 min, CH_3CN al 100%; 55-70 min, CH_3CN acuoso al 0-80%) a una velocidad de flujo de 2.5 ml/min y detección UV de 210 nm. El compuesto activo de cromamida A (1) tiene un tiempo de retención de 23.19 min.

Se realizó la purificación del compuesto B de la invención usando columna C-18 de HPLC (Phenomenex, Luna 10u C18 (2) 100 A, 250 x 10), sistema de solvente de gradiente agua:acetonitrilo (0-10 min, CH₃CN acuoso al 80-75%; 10-54 min, CH₃CN acuoso al 75-60%; 45-55 min, CH₃CN acuoso al 60-50%; 55-65 min, CH₃CN acuoso al 50-100%; 65-70 min, CH₃CN al 100%; 55-70 min, CH₃CN acuoso al 0-80%) a velocidad de flujo de 2.5 ml/min y detección UV de 210 m, el compuesto activo B, tiempo de retención 26.39 min (véase, Fig 6).

Se realizaron la purificación de violaceína (2) y desoxiviolaceína (3) usando columna C-18 de HPLC (Phenomenex, Luna 10u C18(2) 100 A, 250 x 10), sistema de solvente de gradiente agua:acetonitrilo (0-10 min, CH₃CN acuoso al 70-60%; 10-40 min, CH₃CN acuoso al 60-20%; 40-60 min, CH₃CN acuoso al 20-0%; 60-65 min, CH₃CN al 100%; 65-75 min, CH₃CN acuoso al 0-70%) a velocidad de flujo 2.5 ml/min y detección UV de 210 nm, los compuestos activos violaceína (2), tienen un tiempo de retención de 7.86 min y desoxiviolaceína (3) con tiempo de retención de 12.45 min.

Análisis de Espectroscopia de Masa de los Compuestos

Se realizó en análisis de espectroscopia de masa de máximos activos en un instrumento de electrorrocío (ESI) LCQ Deca XP Plus de Thermo Finnigan usando formas de ionización tanto positivas como negativas en una forma de exploración completa (m/z 100-150 Da) en un Espectrómetro de Masa LCQ DECA XP^{plus} (Thermo Electron Corp., San Jose, CA). Instrumento de cromatografía líquida de alto termo desempeño (HPLC) equipado con detector Finnigan Surveyor PDA plus, automuestreador plus, bomba MS y una columna Luna C18 5 μ 100A, 4.6 x 100 mm (Phenomenex). El

sistema de solvente consistió de agua (solvente A) y acetonitrilo (solvente B). La fase móvil comenzó a 10% del solvente B y es linealmente incrementada a 100% del solvente B durante 20 minutos y después se mantuvo por 4 minutos, y finalmente regresó al 100% del solvente B durante 3 minutos y se mantuvo por 3 minutos. La velocidad de flujo es 0.5 ml/min. El volumen de inyección fue 10 µl y las muestras se mantuvieron a temperatura ambiente en un automuestreador. Los compuestos se analizaron por LC-MS utilizando la LC y cromatografía de fase inversa. Se realizó el análisis de espectroscopia de masa de los presentes compuestos bajo las siguientes condiciones: La velocidad de flujo del gas nitrógeno se fijó a 30 y 15 arb para la vaina y velocidad de flujo de gas aux/barrido. Se realizó la ionización por electrorrocío con voltaje de rocío fijado a 5000 V u voltaje capilar a 35.0 V. La temperatura capilar fue fijada a 400°C. Los datos se analizaron en software Xcalibur. La cromamida A (1) tiene una masa molecular de 860 en forma de ionización positiva (véase, Fig 2). El cromatograma LC-MS para otro compuesto activo B sugiere una masa molecular de 874 en forma de ionización positiva. Violaceína (2) y desoxiviolaceína (3) tienen las masas moleculares de 313 y 327 respectivamente en forma de ionización positiva.

Análisis de Espectroscopia NMR de Compuestos

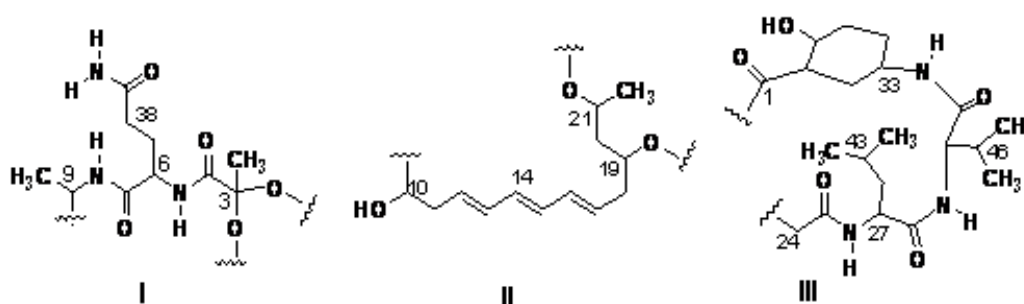
Se midieron los espectros NMR-NMR en un espectrómetro de campo del gradiente Bruker 600 MHz. La referencia se fijó en el tetrametilsilano estándar interno (TMS, 0.00 ppm). Se llevaron a cabo los análisis de aminoácido en un analizador de aminoácido Hitachi 8800.

Para elucidación de estructura, la cromamida A

purificada con peso molecular de 860 se analizó adicionalmente usando un instrumento de NMR 600 MHz, y tiene valores ^1H NMR δ a 8.89, 8.44, 8.24, 8.23, 7.96, 7.63, 6.66, 5.42, 5.36, 5.31, 5.10, 4.13, 4.07, 4.05, 3.96, 3.95, 3.88, 3.77, 3.73, 3.51, 3.44, 3.17, 2.40, 2.27, 2.11, 2.08, 2.03, 2.01, 1.97, 1.95, 1.90, 1.81, 1.68, 1.63, 1.57, 1.53, 1.48, 1.43, 1.35, 1.24, 1.07, 1.02, 0.96, 0.89, 0.88, 0.87, 0.80 (véase, Fig. 4) y tiene valores ^{13}C NMR de 173.62, 172.92, 172.25, 172.17, 171.66, 171.28, 170.45, 132.13, 130.04, 129.98, 129.69, 129.69, 125.48, 98.05, 70.11, 69.75, 68.30, 68.25, 64.34, 60.94, 54.54, 52.82, 49.72, 48.57, 45.68, 40.38, 39.90, 38.18, 36.60, 31.98, 31.62, 31.58, 29.53, 28.83, 27.78, 24.41, 23.06, 22.09, 20.56, 19.31, 18.78, 17.66, 15.80 (véase, Fig. 5). La cromamida A se aisló como un sólido blanco, la cual se analizó por la fórmula molecular $\text{C}_{43}\text{H}_{68}\text{N}_6\text{O}_{12}$ (13 grados de insaturación), por espectrometría de masa de alta resolución ESI (obs M^+ m/z 861.5376, calc M^+ m/z 861.5343). Los datos espectrales de ^1H NMR de cromamida A en DMSO- d_6 exhibió 68 señales de protón, en las cuales nueve protones [δ_{H} : 8.89, 8.44, 8.23, 8.22, 7.96, 7.64, 6.65, 5.10, 4.13], son asignados como ya sea NH u OH debido a la carencia de correlación de carbono en un análisis NMR de correlación heteronuclear (HMQC). El espectro ^{13}C NMR, mostró siete señales de carbonilo [δ_{C} : 173.62, 172.92, 172.25, 172.17, 171.66, 171.28, 170.45] y en el espectro ^1H NMR, se observaron seis características de señales de protones α -amino [δ_{H} : 4.07, 4.06, 3.96, 3.95, 3.88, 3.72] las cuales demostraron que la cromamida A es un péptido.

La interpretación de datos NMR 2D conduce a la asignación de tres unidades de aminoácido de las seis, una leucina (Leu), una valina (Val) y una glutamina (Gln). La

presencia de estos aminoácidos se confirmada por resultados de análisis de aminoácido, lo cual también mostró la presencia de los tres aminoácidos anteriores. Análisis adicionales de datos espectrales DEPT y NMR 2D (COSY, HSQC y HMBC) establecieron la presencia de tres sub-estructuras I, II y III como se muestra posteriormente.



Las conexiones de las tres su-estructuras en 1 se lograron por análisis NMR HMBC de rutina usando correlaciones entre el protón α -amino y/o el protón de amida secundaria y las resonancias de carbono de carbonilo y consideración de cambio químico. El enlace C-9 de la sub-estructura I a C-10 de la sub-estructura II fue establecido por correlaciones HMBC de CH₃-40 [δ_H : 1.00] y el protón α -amino de alanina [δ_H : 3.42] al carbono C-10 [δ_C : 70.11]. Esto fue además conformado por las tres correlaciones de HMBC unidas de hidroxilo a [δ_H : 5.10] hasta C-9 a [δ_C : 49.78]. El metileno a [δ_H : 3.50] de la sub-estructura III mostró una correlación de HMBC unida a C-19 [δ_C : 68.31] la cual se conectó a la sub-estructura I y II. El carbono cuaternario a C-3 [δ_C : 98.09] se conectó a C-21 [δ_C : 64.40] a través de una correlación débil de H-21 [δ_H : 3.95] junto con sus valores de cambio químico para formar un sistema de anillo. Por último, el enlace de cierre del anillo se aseguró por una correlación HMBC de tres enlaces a partir de H₃-36 [δ_H : 1.43] hasta C-1 [δ_C : 172.17], el cual mostró la estructura plana de cromamida A (1) a

ser asignada.

El compuesto B con un peso molecular de 874 exhibió datos NMR y UV similares que sugieren que este compuesto B también pertenece a la clase del péptido.

La estructura para violaceína (2) y desoxiviolaceína (3) se asignó por comparación de los datos de estos compuestos con aquellos publicados en la literatura. Las estructuras de cromamida A, violaceína y desoxiviolaceína se muestran en la Fig. 7.

Ejemplo 2: Análisis de aminoácido de cromamida A

Se hidrolizó cromamida A (0.05 mg) usando hidrólisis de fase líquida (HCl 6N, Fenol al 1%, 110°C, 24 horas, a vacío). Después del enfriamiento, la mezcla de reacción se secó y el producto hidrolizado se disolvió en amortiguador de dilución Norleu a un volumen de 1.0 ml. Se cargó 50 µl de la muestra en la columna de intercambio iónico para análisis.

Para estándares y calibración, se usó una solución estándar de aminoácido para hidrolizar la proteína en el Hitachi 8800 a base de Na (Sigma, A-9906) para determinar factores de respuesta, y así calibrar el analizador Hitachi 8800 para todos los aminoácidos. Cada inyección contiene NorLeucina como un estándar interno para permitir la corrección de los resultados para variaciones en volumen de muestra y variables de cromatografía. El sistema utiliza amortiguadores Na de Pickering, HCl grado Sequanal de Pierce (hidrólisis), una columna de Intercambio Iónico Transgenómica y un método optimizado desarrollado por Molecular Structure Facility (MSF), se reportaron UC Davis y el aminoácido individual presente en la muestra. Los aminoácidos presentes en la muestra (cromamida A) se encontraron ser Glx (Glutamina/Ácido glutámico), leu (leucina) y Val (Valina).

Ejemplo 3: Confirmación de toxicidad en Medidor de la col (*Trichoplusia ni*)

Se confirmó la toxicidad del compuesto de interés en la fracción 1 (F1) en un ensayo *in vitro* usando larvas de medidor de la col 1^{er} estadio como un objeto de prueba.

Se distribuyeron doscientos microlitros de alimento para medidor de la col comercial en cada cavidad de una micro-placa de 96 cavidades. Después que el alimento se ha solidificado, se pipeteo 100 µl de solución que contiene 50 µL de extracto (que corresponde a cuatro máximos individuales encontrados en la fracción 1; H1-H4), 350 µl de EtOH y 600 µl de agua DI estéril en cada cavidad, después de lo cual la placa se secó usando un ventilador portátil. La cantidad de extracto en cada cavidad fue 10 microgramos. Cada tratamiento se replicó ocho veces, y se usó una mezcla de etanol puro y agua como un control negativo.

Se colocó un insecto de prueba (larva en 1^{er} estadio de medidor de la col) en cada cavidad, y la placa se cubrió con un sello adhesivo. El sello se perforó para aireación, y la placa sellada se incubó a 26°C por cuatro días.

Los resultados presentados en la Tabla 1 posterior muestran buena actividad (>60% de mortalidad) con un compuesto en máximo H1. Este máximo particular corresponde con la cromamida A (1) (Fig. 1).

Tabla 1: Mortalidad de Medidor de la Col (%) a 10 ug/cavidad

F1 H1	66.7
F1 H2	11.1
F1 H3	33.3
F1 H4	11.1

Ejemplo 4 - Determinación de LC₅₀ para violaceína para Medidor de

la col (*Trichoplusia ni*)

Se usó el sistema de ensayo de placa de 96 cavidades descrito en el ejemplo previo para determinar la concentración de violaceína pura necesaria para eliminar el 50% de larvas de medidor de la col de 1^{er} estadio. Los valores de mortalidad registrados después de 4 días de incubación a 26°C se presentan en la Tabla 2 posterior. En base a los datos, la violaceína es un potente insecticida con un valor LC50 estimado de 7×10^{-6} microgramos por cavidad para larvas de medidor de la col en un ensayo de dieta de cubierta *in vitro*.

Tabla 2. Efecto de Violaceína en Mortalidad de Medidor de la Col

Violaceína ug/cavidad	% de mortalidad al Día 4
10	100
1	100
0.1	100
0.01	100
0.001	100
0.0001	100
0.00001	71.4
0.000001	14.2
1E-07	0

EJEMPLO 5 - Actividad nematocida de caldo de *Chromobacterium substugae* (MBI-203) en Nemátodos de Nudo de Raíz Juveniles

Para valorar el efecto de *C. substugae* esterilizado por filtro en la mortalidad (y subsecuente recuperación) de nemátodos de nudo de raíz juveniles (J2) (*Meloidogyne incognita* VW6), se condujo la siguiente prueba en placas de cultivo celular de plástico de 24 cavidades:

Se agregó una alícuota de 300 ul de cada solución de

prueba (ya sea 1x o 0.1x de caldo esterilizado con filtro) en cavidades apropiadas después de lo cual, se agregaron quince nemátodos dispersados en 10 ul de agua DI en cada cavidad, la placa se cerró con una tapa, y se incubó a 25°C por 24 horas. Se usaron agua y Avid (avermectina) a 20,000x de dilución como controles negativo y positivo, respectivamente. Se verificó el efecto de cada compuesto en la movilidad del nemátodo después de 24 horas sondeando cada nemátodo con una aguja, y la relación de nemátodos inmóviles en cada tratamiento se registró en una libreta usando una escala de %. Para valorar la recuperación de movilidad en cada tratamiento, se removi6 un volumen de 200 ul de cada cavidad, y la solución restante en cada cavidad se diluyó agregando 2 ml de agua DI. Las placas nuevamente se incubaron por 24 horas como se describe anteriormente, después de lo cual se realizó la segunda evaluación de movilidad (48 horas).

Los resultados presentados en las Figs. 8 y 9 mostraron que el caldo esterilizado con filtro sin diluir puede inmovilizar los nemátodos de nudo de raíz juveniles de vida libre. Este efecto dura al menos por 48 horas, lo cual sugiere que el caldo de *C. substugae* tiene actividad nematicida.

Ejemplo 6: Efecto de caldo de *Chromobacterium substugae* (MBI-203) en Agallamiento de Raíces del Pepino

Se probó MBI-203 por su actividad intrínseca contra el nemátodo de nudo de la raíz *Meloidogyne* sp. en dos pruebas mini riego.

Materiales y Métodos

Se probó específicamente MBI-203 en un ensayo de invernadero conducido en ollas de 45 ml. Se sembraron semillas de pepino cv. Toshka directamente en las ollas rellenas con un

suelo franco arenoso. Diez días más tarde las ollas son cada una tratada con 5 ml de una suspensión. En lo sucesivo, las ollas se inoculan con 3000 huevos de *M. incognita*. Se prepararon cuatro replicas para cada tratamiento y relación. El ensayo se recolectó catorce días después de la aplicación e inoculación del ensayo. Se valoró el agallamiento de raíz de conformidad con el índice de agalla de Zeck (Zeck, 1971). Las condiciones específicas se muestran posteriormente en la Tabla 3.

Se midió la fitotoxicidad como una reducción del crecimiento del pepino emergido sembrado en comparación al control.

Tabla 3

	MBI-203
	Fostiazato (Estándar, EC 150)
Especies de prueba	<i>Meloidogyne sp.</i> aplicado a 3000 huevos por olla de mini riego (en 2 ml)
Vegetal de prueba	<i>Cucumis sativus</i> (pepino cv. Toschka)
Formulación de prueba	MBI-203 = 96% de formulación líquida
Concentraciones de prueba para MBI-203	Prueba Mini-riego #1: 100, 50 ml/L Prueba Mini-riego #2: 50, 25, 12.5, 6, 3, 1.5 ml/L
Aplicación de prueba	Aplicación de Riego

Resultados

Prueba Mini Riego no. 1

La actividad de los tratamientos es muy alta y se observó una reducción de al menos 100% cuando se aplicó a una concentración de 50 ml/L (MBI-203). Se observó menos fitotoxicidad para MBI-203. El fostiazato se desempeño como el ordinario (100% de control a 20 ppm).

Prueba Mini Riego no. 2

MBI-203 mostró fitotoxicidad en las mayores concentraciones de 50 y 25 ml/L y las mediciones pueden no ser hechos a estas proporciones.

A una concentración de 12.5 ml/L el control de nemátodo fue sobre 95% el cual disminuyó a 33% a 3 ml/L. A una relación de 1.5 ml/L no se registró actividad.

El fostiazato se desempeñó como el ordinario (100% de control a 20 ppm).

Ejemplo 8: Estudios Sinérgicos con caldo de *Chromobacterium substugae* (MBI-203)

Se realizaron pruebas sinérgicas por tratamiento de alimento artificial en placas de 96 cavidades y alimentando con alimento tratado a larvas neonatas. Se pipetearon 100 uL del tratamiento en múltiples cavidades de cada placa. Se probaron MBI-203 solo (caldo celular completo concentrado a 7.6% en peso de célula seco), el insecticida comercial solo y la combinación de los 2, usando concentraciones LC_{50} predeterminadas o fracciones de las mismas. El alimento se secó con ventilador para remover el exceso de humedad. Se transfirieron Gusanos Soldado del Betabel, *Spodoptera exigua*, o Medidores de la Col, *Trichoplusia ni*, a cada cavidad de la placa de cavidades múltiples. Las placas infestadas se cubrieron con sellador adhesivo para placa y se pinchó un agujero pequeño en el sellador sobre cada cavidad para permitir la aireación. Las placas se almacenaron en una incubadora a 26°C, ciclo de luz 16 horas/oscuridad 8 horas durante 3 días. Al tercero y cuarto día después de la infestación, se registró la mortalidad.

La determinación de una interacción sinérgica, antagonística o aditiva se determinó usando los métodos de (Colby

1967). Debido a la variación en los bioensayos, se determinó que las proporciones entre 0 y 0.9 pueden ser consideradas como antagonísticas, las proporciones 0.9-1.1 pueden ser aditivas y las proporciones por arriba de 1.1 pueden ser consideradas relaciones sinérgicas.

Se probó la sinergia de MBI-203 con insecticidas contra Medidores de la Col. Se probaron Clorantranilipol (comercializado como Coragen®, Dupont), *Bacillus thuringiensis* var. *Kurstaki* (Dipel®, Valent Biosciences), Spinosad (comercializado como Entrust®, Dow Agro Sciences), Spirotetramet (comercializado como Movento®, Bayer Crop Science) y Piretrum/piretrinas (comercializado como Pyganic®, Arbico Organics) con MBI-203. Como se notó anteriormente, excepto en donde se indica, se usaron las concentraciones de LC₅₀ de MBI-203 e insecticidas. Los resultados se muestran en la Tabla 4. Todas, pero Bt var. *kurstaki* y 1 ejemplo de la concentración LC₅₀ mostraron sinergismo.

Tabla 4: MBI-203+Insecticida: Efecto en Medidores de la Col

Producto	% de eliminación de MBI-203 solo	% de eliminación del Producto solo	% de eliminación del combo calculado	% de eliminación del combo actual	Relación	Relación definida ^a
Clorantranilipol	21	3	23.4	33.3	1.42	sin
Bt var. <i>kurstaki</i>	61.7	89.6	96	100	1.04	Agregado
Spinosad	41.5	54.3	72.99	100.00	1.37	sin
Spirotetramet	87.9	23.8	86.34	89.87	1.04	Agregado
Spirotetramet (0.5X LC ₅₀); MBI-203 (0.3X LC ₅₀)	90.6	41.5	91.90	94.94	1.03	Agregado
Piretrum	19.7	2.8	21.93	55.37	2.53	sin

^asin = sinérgico; ad = aditivo
 Se probó la sinergia de MBI-203 con insecticidas contra el Gusano Soldado de Betabel (BAW). Se probaron Clorantranilipol

(comercializado como Coragen®, Dupont), *Bacillus thuringiensis* var. *Kurstaki* (Dipel®, Valent Biosciences), Spinosad (comercializado como Entrust®, Dow Agro Sciences), Spirotetramet (comercializado como Movento®, Bayer Crop Science) y Piretrum/piretrinas (comercializado como Pyganic®, Arbico Organics) con MBI-203. Como se notó anteriormente, excepto en donde se indica, se usaron las concentraciones de LC₅₀ de MBI-203 e insecticidas. Los resultados se muestran en la Tabla 5. MBI-203 y Clorantranilipol interactuaron aditivamente mientras *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* y Spinosad mostraron control sinérgico de BAW con MBI-203. Las combinaciones de Piretrum con MBI-203 son atagónicas. Las combinaciones de spirotetramet y MBI203 son principalmente antagonísticas contra Gusano Soldado de Betabel.

Tabla 5. MBI-203+Insecticida: Efecto en Gusano Soldado de Betabel

Producto	% de eliminación de MBI-203 solo	% de eliminación del producto solo	% de eliminación de combo calculado	% de eliminación de combo actual	Relación	Relación definida ^a
Clorantranilipol	11.6	9.1	19.69	19.9	1.01	agregado
Bt var. kurstaki	24.5	19.8	39.4	68.3	1.73	sin
Spinosad	23.8	68.7	83.33	100	1.2	sin
Spirotetramet	0	21.6	36.10	27.60	0.76	antag
Spirotetramet (0.53X LC ₅₀); MBI-203 (0.7X LC ₅₀)	0	42.9	38.55	41.67	1.08	agregado
Spirotetramet	21.4	53.3	60.57	53.70	0.89	antag
Spirotetramet (1.4X LC ₅₀); MBI-203 (1.2X LC ₅₀)	10	77.5	78.22	41.23	0.53	antag
Piretram	14.4	74.5	78.17	12.16	0.16	antag
Pretram	70.7	11.1	73.97	27.78	0.38	antag

^asin = sinérgico; ad = aditivo; antag = antagonístico

A pesar que esta invención se ha descrito con referencia a modalidades específicas, los detalles de la misma no se deben construir como limitantes, como es obvio que uno puede usar varios equivalentes, cambios y modificaciones y estarán dentro del alcance de la presente invención.

Se citan varias referencias a través de esta especificación, cada una de las cuales se incorpora en la presente para referencia en su totalidad.

Referencias

Asolkar, R. N., Jensen, P. R., Kauffman, C. A., Fenical, W. 2006. Daryamides A-C, Weakly Cytotoxic Polyketides from a Marine-Derived Actinomycete of the Genus *Streptomyces* strain CNQ-085 *J. Nat. Prod.* 69:1756-1759.

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

Balibar, C.J. and C.T. Welsh (2006). "In Vitro Biosynthesis of Violacein from L-Tryptophan by the Enzymes VioA-E from *Chromobacterium violaceum*." Biochemistry **45**: 15444-15457.

Chalvet-Monfray, K., P. Sabatier, et al. (1996). "Synergy between deltamethrin and prochloraz in bees: Modeling approach." Environmental Toxicology and Chemistry **15**(4): 525-534.

Chitwood, D. J. (2003). Nematicides. Encyclopedia of Agrochemicals , vol 3. J. R. Plimmer. New York, John Wiley & Sons. **3**: 1104-1115.

Colby, S. R. (1967). "Calculating Synergistic and

Antagonistic Responses of Herbicide Combinations." Weeds **15**(1): 20-22.

Durán, N., G. Z. Justo, et al. (2007). "Minireview. Violacein: properties and biological activities." Biotechnol. Appl. Biochem. **48**: 127-133.

Durán, N. and C. F. M. Menck (2001). "*Chromobacterium violaceum*: a review of pharmacological and industrial perspectives." Crit. Rev. Microbiol. **27**: 201-222.

Farenhorst, M., B. G. J. Knols, et al. (2010). "Synergy in Efficacy of Fungal Entomopathogens and Permethrin against West African Insecticide-Resistant *Anopheles gambiae* Mosquitoes." PLoS ONE **5**(8): e12081.

Hoshino, T., T. Takano, et al. (1987). "Biosynthesis of violacein: origins of the hydrogen, nitrogen and oxygen atoms in the 2-pyrrolidone nucleus." Agric. Biol. Chem. **51**: 2733-2741.

Hummelbrunner, L. A. and M. B. Isman (2001). "Acute, Sublethal, Antifeedant, and Synergistic Effects of Monoterpenoid Essential Oil Compounds on the Tobacco Cutworm, *Spodoptera litura* (Lep., Noctuidae)." Journal of Agricultural and Food Chemistry **49**(2): 715-720.

Hungria, M., S. Astolfi-Filho, et al. (2005). "Genetic characterization of *Chromobacterium* isolates from black water environments in the Brazilian Amazon." Lett. Appl. Microbiol. **41**: 17-23.

Krieg, A., A. M. Huger, et al. (1983). "*Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*: Ein neuer, gegenüber Larven von Coleopteren wirksamer Pathotyp." Z. Angew. Entomol. **96**: 500-508.

Kämpfer, P., H.-J. Busse, et al. (2009). "*Chromobacterium piscinae* sp. nov. and *Chromobacterium*

pseudoviolaceum sp. nov., from environmental samples." Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **59**: 2486-2490.

Martin, P. A. W., D. Gundersen-Rindal, et al. (2007a). "*Chromobacterium substugae* sp. nov., a betaproteobacterium toxic to Colorado potato beetle and other insect pests." Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **57**: 993-999.

Martin, P.A., A.D.S. Shropshire, et al., (2007b). "*Chromobacterium substugae* sp. nov for control of insect pests" U.S. Patent No. 7244607 B2.

Martin, P.A.W., Hirose, E., and Aldrich, J.R. 2007c. "Toxicity of *Chromobacterium substugae* to southern green stink bug (Heteroptera:Pentatomidae) and corn rootworm (Coleoptera:Chrysomelidae)". J. Econ. Entomol. 100: 680-684.

Martin, P. A. W. (2004). "A freeze-dried diet to test pathogens of Colorado potato beetle." Biological Control **29**(1): 109-114.

McClellan, K. H., M. K. Winson, et al. (1997). "Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of N-acyl homoserine lactones" Microbiology **143**: 3703-3711.

Meunier, L., P. Carubel, et al. (1999). Insecticidal combinations including an insecticide from the family chloronicotinyl family and an insecticide having pyrazole, pyrrole, or phenylimidazole group. U. States. United States, Rhone-Poulenc Agrochimie: 6.

Pederson, M. and H. S. Woldum. Synergistic Combination of Glutamate-and-Gaba-Gated Chloride Against Pesticide and at Least One Vitamin E, Niacin, or Derivatives Thereof, US 2009/0111579, published April 30 2009..

Puritch, G. and G. Salloum. Environmentally Safe Insecticide, US 5047424, issued September 10, 1991..

Shapiro-Ilan, D. I., T. E. Cottrell, et al. (2011). "Effects of combining microbial and chemical insecticides on mortality of the Pecan Weevil (Coleoptera: Curculionidae)." J Econ Entomol **104**(1): 14-20

Ryan, K. S. and C. L. Drennan (2009). "Divergent pathways in the biosynthesis of bisindole natural products." Chemistry&Biology **16**: 351-364.

Shapiro-Ilan, D. I., T. E. Cottrell, et al. (2011). "Effects of combining microbial and chemical insecticides on mortality of the Pecan Weevil (Coleoptera: Curculionidae)." J Econ Entomol **104**(1): 14-20.

Thompson, G. D., R. Dutton, et al. (2000). "Spinosad - a case study: an example from a natural products discovery programme." Pest Management Science **56**: 696-702.

Whitehead, A. G. (1998). Plant nematode control. Wallingford, UK, CAB International.

Wirth, M. C., J. A. Jiannino, et al. (2004). "Synergy between Toxins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and *Bacillus sphaericus*." Journal of Medical Entomology **41**: 935-941.

Young, C.-C., A. B. Arun, et al. (2008). "*Chromobacterium aquaticum* sp. nov., isolated from spring water samples." Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **58**: 877-880.

Zeck W.M. (1971) Ein Bonitierungsschema zur Felddauswertung von Wurzelgallenbefall. Pflanzenschutznachrichten Bayer 24,1: 144-147.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto **caracterizado** porque (a) tiene actividad pesticida; (b) tiene un peso molecular de aproximadamente 840-900 como se determina por Cromatografía Líquida/Espectroscopia de Masas (LC/MS) y (c) tiene una Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC) tiempo de retención de aproximadamente 7-12 minutos en una columna HPLC C-18 de fase inversa usando un sistema de solvente de gradiente agua:acetonitrilo (CH₃CN) (0-20 min; 90 - 0% CH₃CN acuoso, 20-24 min; 100% CH₃CN, 24-27 min; 0 - 90% CH₃CN acuoso, 27-30 min; 90% CH₃CN acuoso) a 0.5 mL/min velocidad de flujo y detección UV de 210 nm y (d) se obtiene opcionalmente de especies de *Chromobacterium*.

2. El compuesto de conformidad con la reivindicación 1, **caracterizado** porque el compuesto tiene 43 carbonos, siete metilos, diez carbonos de metileno, doce metinas, 6 metinas olefínicas, ocho carbonos cuaternarios como se determina por ¹³C NMR.

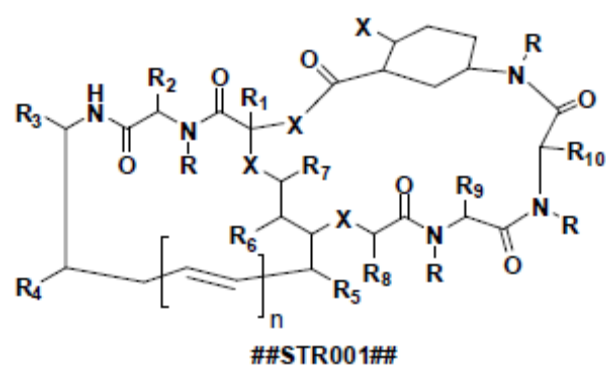
3. El compuesto de conformidad con la reivindicación 1, **caracterizado** porque el compuesto (i) tiene un peso molecular de aproximadamente 840-890 como se determina por Cromatografía Líquida/Espectroscopia de Masas (LC/MS); (ii) tiene valores de ¹H NMR de aproximadamente δ 8.89, 8.44, 8.24, 8.23, 7.96, 7.63, 6.66, 5.42, 5.36, 5.31, 5.10, 4.13, 4.07, 4.05, 3.96, 3.95, 3.88, 3.77, 3.73, 3.51, 3.44, 3.17, 2.40, 2.27, 2.11, 2.08, 2.03, 2.01, 1.97, 1.95, 1.90, 1.81, 1.68, 1.63, 1.57, 1.53, 1.48, 1.43, 1.35, 1.24, 1.07, 1.02, 0.96, 0.89, 0.88, 0.87, 0.80 y (iii) tiene valores de ¹³C NMR de aproximadamente δ 173.62, 172.92, 172.25,

172.17, 171.66, 171.28, 170.45, 132.13, 130.04, 129.98, 129.69, 129.69, 125.48, 98.05, 70.11, 69.75, 68.30, 68.25, 64.34, 60.94, 54.54, 52.82, 49.72, 48.57, 45.68, 40.38, 39.90, 38.18, 36.60, 31.98, 31.62, 31.58, 29.53, 28.83, 27.78, 24.41, 23.06, 22.09, 20.56, 19.31, 18.78, 17.66, 15.80.

4. El compuesto de conformidad con la reivindicación 1, **caracterizado** porque el compuesto se selecciona a partir del grupo que consiste de

(A) un compuesto que tiene la estructura

##STR001##

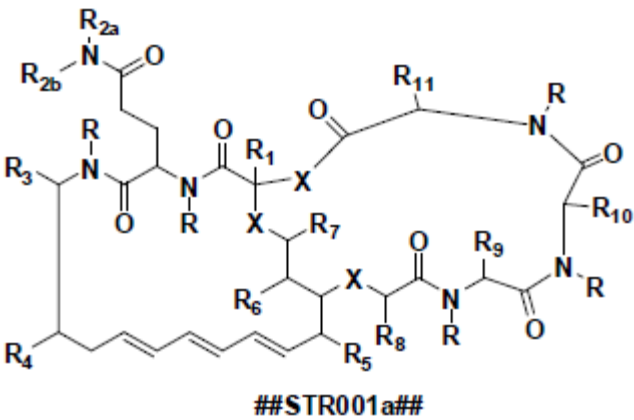


o una sal pesticídicamente aceptable o estereoisómeros de la misma, en donde R es -H, alquilo de cadena inferior que contiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 porciones alquilo, porciones arilo o arilalquilo, alquilo inferior sustituido; n es 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9; X es O, NH, NR o S; R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7, R8, R9, R10 son cada uno independientemente H, son el mismo o diferente e independientemente una porción de cadena lateral de aminoácido o un derivado de cadena lateral de aminoácido, alquilo, alquilo sustituido, alquenoilo, alquenoilo sustituido, alquiniilo, alquiniilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterocíclico, heterocíclico sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, tioalquilo, tioalquilo sustituido, hidroxilo, halógeno,

amino, amido, carboxilo, -C(O)H, acilo, oxiacilo, carbamato, sulfonilo, sulfonamida, o sulfurilo;

(B) un compuesto que tiene la estructura

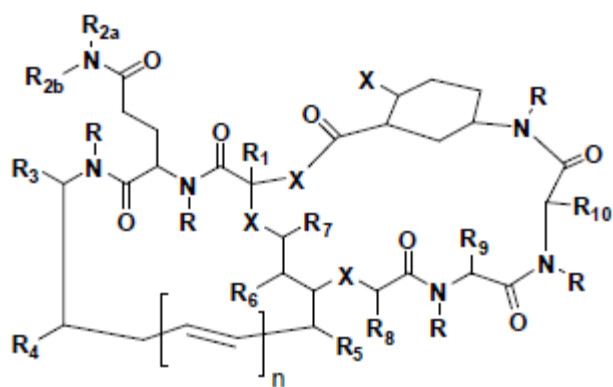
##STR001a##



en donde R es -H, alquilo de cadena inferior que contiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 porciones alquilo , porciones arilo o arilalquilo, alquilo inferior sustituido; X es O, NH, NR o S; R2a, R2b se seleccionan independientemente a partir del grupo que consiste de -H, alquilo, alquilo inferior, alquilo sustituido y alquilo inferior sustituido; R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, R₇, R₈, R₉, R₁₀, R₁₁ son cada uno independientemente H, son el mismo o diferente e independientemente una porción de cadena lateral de aminoácido o un derivado de cadena lateral de aminoácido, alquilo, alquilo sustituido, alqueno, alqueno sustituido, alquino, alquino sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterocíclico, heterocíclico sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, tioalquilo, tioalquilo sustituido, hidroxilo, halógeno, amino, amido, carboxilo, -C(O)H, acilo, oxiacilo, carbamato, sulfonilo, sulfonamida, o sulfurilo;

(C) un compuesto que tiene la estructura

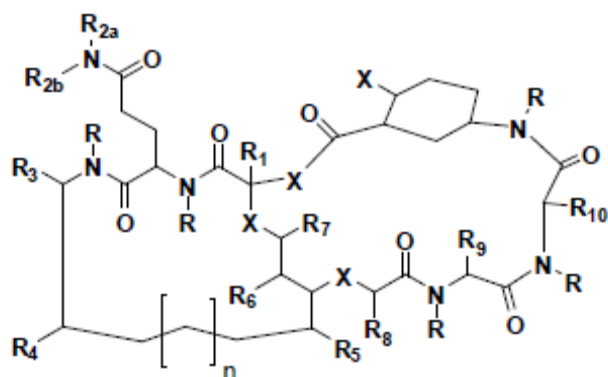
##STR001b##



##STR001b##

en donde R es -H, alquilo de cadena inferior, porción arilo o arilalquilo, alquilo inferior sustituido; X es O, NH, NR o S; n es 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9; R_{2a}, R_{2b} se seleccionan independientemente a partir del grupo que consiste de -H, alquilo, alquilo inferior, alquilo sustituido y alquilo inferior sustituido; R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, R₇, R₈, R₉, R₁₀, R₁₁ son cada uno independientemente H, son el mismo o diferente e independientemente una porción de cadena lateral de aminoácido o un derivado de cadena lateral de aminoácido, alquilo, alquilo sustituido, alquenoilo, alquenoilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterocíclico, heterocíclico sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, tioalquilo, tioalquilo sustituido, hidroxilo, halógeno, amino, amido, carboxilo, -C(O)H, acilo, oxiacilo, carbamato, sulfonilo, sulfonamida, o sulfurilo;

(D) un compuesto que tiene la estructura ##STR001c##



##STR001c##

en donde R es -H, alquilo de cadena inferior, porción arilo o arilalquilo, alquilo inferior sustituido que contiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 porciones alquilo; X es O, NH, NR o S; n es 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9; R_{2a}, R_{2b} se seleccionan independientemente a partir del grupo que consiste de -H, alquilo, alquilo inferior, alquilo sustituido y alquilo inferior sustituido; R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, R₇, R₈, R₉, R₁₀, R₁₁ son cada uno independientemente H, son el mismo o diferente e independientemente una porción de cadena lateral de aminoácido o un derivado de cadena lateral de aminoácido, alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterocíclico, heterocíclico sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, tioalquilo, tioalquilo sustituido, hidroxilo, halógeno, amino, amido, carboxilo, -C(O)H, acilo, oxiacilo, carbamato, sulfonilo, sulfonamida, o sulfurilo.

5. Una composición **caracterizada** porque comprende (A) al menos uno de (i) el compuesto de la reivindicación 1; (ii) un compuesto que tiene las siguientes características: (a) tiene propiedades pesticidas; (b) tiene un peso molecular de aproximadamente 315-360 como se determina por Cromatografía Líquida/Espectroscopia de Masas (LC/MS); (c) tiene un tiempo de retención de Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC) de aproximadamente 8-15 minutos en una columna de HPLC C-18 de fase inversa usando agua:acetonitrilo (CH₃CN) con un sistema de solvente gradiente (0-20 min; 90-0% de CH₃CN acuoso, 20-24 min; 100% de CH₃CN, 24-27 min; 0-90% de CH₃CN acuoso, 27-30 min; 90% de CH₃CN acuoso) a velocidad de flujo de 0.5 mL/min y detección

UV de 210 nm que comprende y (d) es opcionalmente obtenible de especies de *Chromobacterium* y (B) al menos uno de (i) una segunda sustancia, donde la segunda sustancia es un pesticida biológico o químico y (ii) al menos uno de un portador, diluyente, tensoactivo o adyuvante.

6. Un método para obtener un compuesto seleccionado del grupo que consiste de (i) el compuesto de conformidad con la reivindicación 1 y (ii) un compuesto que tiene las siguientes características: (a) tiene propiedades pesticidas; (b) tiene un peso molecular de aproximadamente 315-360 como se determina por Cromatografía Líquida/Espectroscopia de Masas (LC/MS); (c) tiene un tiempo de retención de Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC) de aproximadamente 8-15 minutos en una columna de HPLC C-18 de fase inversa usando agua:acetonitrilo (CH_3CN) con un sistema de solvente gradiente (0-20 min; 90-0% de CH_3CN acuoso, 20-24 min; 100% de CH_3CN , 24-27 min; 0-90% de CH_3CN acuoso, 27-30 min; 90% de CH_3CN acuoso) a velocidad de flujo de 0.5 mL/min y detección UV de 210 nm que comprende:

(A) cultivar una cepa de *Chromobacterium* en un caldo celular completo bajo condiciones suficientes para producir el compuesto;

(B) aislar el compuesto producido en (A) a partir del caldo celular completo.

7. El compuesto de conformidad con la reivindicación 7, **caracterizado** porque el compuesto producido en la etapa (A) es aislado mediante (a) aplicar el caldo celular completo en al menos uno de una columna de intercambio iónico, una columna de exclusión de tamaño o una columna de HPLC de fase inversa para obtener las fracciones de la columna; (b) someter a ensayo las

fracciones de la columna para actividad pesticida y (c) concentrar las fracciones de la columna de (b) para obtener el compuesto aislado.

8. Un método para modular la infestación de plagas en una planta **caracterizado** porque comprende aplicar a la planta y/o semillas e la misma y/o sustrato usado para hacer crecer la planta, una cantidad de (A) al menos uno de (i) el compuesto de conformidad con las reivindicaciones 1 y (ii) un compuesto que tiene las siguientes características: (a) tiene propiedades pesticidas; (b) tiene un peso molecular de aproximadamente 315-360 como se determina por Cromatografía Líquida/Espectroscopia de Masas (LC/MS) y (c) tiene una Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC) tiempo de retención de aproximadamente 8-15 minutos en una columna HPLC C-18 de fase inversa usando agua:acetonitrilo (CH_3CN) con un sistema solvente de gradiente (0-20 min; 90 - 0% CH_3CN acuoso, 20-24 min; 100% CH_3CN , 24-27 min; 0 - 90% CH_3CN acuoso, 27-30 min; 90% CH_3CN acuoso) a 0.5 mL/min velocidad de flujo y detección UV de 210 nm y (d) se obtiene opcionalmente de especies de *Chromobacterium* y (B) opcionalmente otra sustancia pesticida efectiva para modular la infestación de plagas.

9. El método de conformidad con la reivindicación 8, **caracterizado** porque el compuesto usado en el método (I) tiene al menos uno de: (a) un peso molecular de aproximadamente 343 como se determina por Cromatografía Líquida/Espectroscopia de Masas (LC/MS) y (b) una retención de HPLC de aproximadamente 10 minutos en la columna de HPLC de fase inversa C-18 o (II) tiene al menos uno de: (a) un peso molecular de aproximadamente 327 como se determina por Cromatografía Líquida/Espectroscopia de Masas

(LC/MS) y (b) una retención de HPLC de aproximadamente 12 minutos en la columna de HPLC de fase inversa C-18.

10. El método de conformidad con la reivindicación 8, **caracterizado** porque el compuesto se selecciona a partir del grupo que consiste de cromamida A, violaceína y desoxiviolaceína.

11. Un método para modular la infestación de nemátodos en una planta **caracterizado** porque comprende aplicar a la planta y/o semillas de la misma y/o sustrato usado para hacer crecer la planta una cantidad de un sobrenadante, filtrado y/o extracto y/o uno o más metabolitos del sobrenadante, filtrado y/o extracto de una cepa de *Chromobacterium sp.* y opcionalmente otra sustancia nematocida en una cantidad efectiva para modular la infestación de nemátodos.

12. Una combinación pesticida sinérgica con al menos una plaga **caracterizada** porque comprende como componentes activos: (a) un sobrenadante, filtrado y/o extracto de *Chromobacterium sp.* y (b) otra sustancia pesticida, en donde (a) y (b) están presentes en cantidades sinérgicas.

13. La combinación de conformidad con la reivindicación 12, **caracterizada** porque la plaga es una plaga de nemátodo.

14. La combinación de conformidad con la reivindicación 12, **caracterizada** porque la sustancia pesticida es (a) derivada de un microorganismo; (b) un producto natural o (b) un compuesto químico.

15. La combinación de conformidad con la reivindicación 12, **caracterizada** porque la sustancia pesticida es derivada de un microorganismo y se selecciona a partir del grupo que consiste de *Bacillus sp.* y spinosad.

16. La combinación de conformidad con la reivindicación

12, **caracterizada** porque la sustancia pesticida es un insecticida químico seleccionado a partir del grupo que consiste de piretrinas, espirotetramet y una diamida antranílica.

17. La combinación de conformidad con la reivindicación 12, **caracterizada** porque la combinación es una composición.

18. Un método para modular sinérgicamente la infestación de al menos una cepa de plaga en una planta, **caracterizado** porque comprende aplicar a la planta y/o semillas de la misma y/o sustrato usado para hacer crecer la planta una cantidad de una combinación de conformidad con la reivindicación 13 efectiva para modular sinérgicamente la infestación de al menos una plaga en una planta.

19. Uso de un compuesto seleccionado del grupo que consiste de (i) el compuesto de las reivindicaciones 1-4; (ii) un compuesto que tiene las siguientes características: (a) tiene propiedades pesticidas; (b) tiene un peso molecular de aproximadamente 315-360 como se determina por Cromatografía Líquida/Espectroscopia de Masas (LC/MS); (c) tiene una Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC) tiempo de retención de aproximadamente 8-15 minutos en una columna HPLC C-18 de fase inversa usando agua:acetonitrilo (CH_3CN) con un sistema solvente de gradiente (0-20 min; 90 - 0% CH_3CN acuoso, 20-24 min; 100% CH_3CN , 24-27 min; 0 - 90% CH_3CN acuoso, 27-30 min; 90% CH_3CN acuoso) a 0.5 mL/min velocidad de flujo y detección UV de 210 nm que comprende y (d) se obtiene opcionalmente de especies de *Chromobacterium* para formular una composición para modular la infestación de plagas en una planta.

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a compuestos bioactivos y metabolitos derivados de cultivos de especies de *Chromobacterium* responsables de controlar plagas, composiciones que contienen estos compuestos, métodos para obtener estos compuestos y métodos para usar estos compuestos y composiciones para controlar plagas.

PATENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

PCT

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT AND THE WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY, OR THE DECLARATION

(PCT Rule 44.1)

To:
AGRIS CHERYL H.
THE LAW OFFICES OF CHERYL H. AGRIS, PH.D. PC PO
BOX 8495 PELHAM NY 10803 USA

RECEIVED

JUL - 6 2012

CHERYL H. AGRIS Ph. D.
ATTORNEY AT LAW

Date of mailing
(day/month/year) 26 JUNE 2012 (26.06.2012)

Applicant's or agent's file reference
MOI-42017-PCT

FOR FURTHER ACTION See paragraphs 1 and 4 below

International application No.
PCT/US2011/057541

International filing date
(day/month/year)
24 OCTOBER 2011 (24.10.2011)

Applicant

MARRONE BIO INNOVATIONS, INC. et al

1. ☒ The applicant is hereby notified that the international search report and the written opinion of the International Searching Authority have been established and are transmitted herewith.
Filing of amendments and statement under Article 19:
 The applicant is entitled, if he so wishes, to amend the claims of the international application (see Rule 46):
When? The time limit for filing such amendments is normally two months from the date of transmittal of the international search report.
Where? Directly to the International Bureau of WIPO, 34 chemin des Colombettes
 1211 Geneva 20, Switzerland, Facsimile No.: +41 22 338 82 70
For more detailed instructions, see PCT Applicant's Guide, International Phase, paragraphs 9.004 . 9.011.
2. ☐ The applicant is hereby notified that no international search report will be established and that the declaration under Article 17(2)(a) to that effect and the written opinion of the International Searching Authority are transmitted herewith.
3. ☐ **With regard to any protest** against payment of (an) additional fee(s) under Rule 40.2, the applicant is notified that:
☐ the protest together with the decision thereon has been transmitted to the International Bureau together with any request to forward the texts of both the protest and the decision thereon to the designated Offices.
☐ no decision has been made yet on the protest; the applicant will be notified as soon as a decision is made.

4. Reminders

The applicant may submit comments on an informal basis on the written opinion of the International Searching Authority to the International Bureau. The International Bureau will send a copy of such comments to all designated Offices unless an international preliminary examination report has been or is to be established. Following the expiration of 30 months from the priority date, these comments will also be made available to the public.

Shortly after the expiration of **18 months** from the priority date, the international application will be published by the International Bureau. If the applicant wishes to avoid or postpone publication, a notice of withdrawal of the international application, or of the priority claim, must reach the International Bureau before the completion of the technical preparations for international publication (Rules 90bis.1 and 90bis.3).

Within **19 months** from the priority date, but only in respect of some designated Offices, a demand for international preliminary examination must be filed if the applicant wishes to postpone the entry into the national phase **until 30 months** from the priority date (in some Offices even later); otherwise, the applicant must, **within 20 months** from the priority date, perform the prescribed acts for entry into the national phase before those designated Offices.
 In respect of other designated Offices, the time limit of **30 months** (or later) will apply even if no demand is filed within 19 months.

For details about the applicable time limits, Office by Office, see www.wipo.int/pct/en/texts/time_limits.html and the PCT Applicant's Guide, National Chapters.

Name and mailing address of the ISA/KR
 Korean Intellectual Property Office
 189 Cheongsu-ro, Seo-gu, Daejeon Metropolitan
 City, 302-701, Republic of Korea
 Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

COMMISSIONER

Telephone No. 82-42-481-8755



* Attention

Copies of the documents cited in the international search report can be searched in the following Korean Intellectual Property Office English website for three months from the date of mailing of the international search report.

<http://www.kipo.go.kr/en/> => PCT Services => PCT Services

ID : PCT international application number

PW : **ZDZUVNTC**

Inquiries related to PCT International Search Report or Written Opinion prepared by KIPO as an International Searching Authority can be answered not only by KIPO but also through IPKC (Intellectual Property Korea Center), located in Vienna, VA, which functions as a PCT Help Desk for PCT applicants.

Homepage: <http://www.ipkcenter.com>

Email: ipkc@ipkcenter.com

Phone: +1 703 388 1066

Fax: +1 703 388 1084

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference MOI-42017-PCT	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/US2011/057541	International filing date (<i>day/month/year</i>) 24 OCTOBER 2011 (24.10.2011)	(Earliest) Priority Date (<i>day/month/year</i>) 25 OCTOBER 2010 (25.10.2010)
Applicant MARRONE BIO INNOVATIONS, INC. et al		

This International search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 4 sheets.

☐ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. **Basis of the report**

a. With regard to the **language**, the international search was carried out on the basis of:

☒ the international application in the language in which it was filed

☐ a translation of the international application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))

b. ☐ This international search report has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6bis(a)).

c. ☐ With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, see Box No. I.

2. ☒ **Certain claims were found unsearchable** (See Box No. II)

3. ☐ **Unity of invention is lacking** (See Box No. III)

4. With regard to the **title**,

☒ the text is approved as submitted by the applicant.

☐ the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the **abstract**,

☒ the text is approved as submitted by the applicant.

☐ the text has been established, according to Rule 38.2, by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority.

6. With regard to the drawings,

a. the figure of the **drawings** to be published with the abstract is Figure No. 1

☒ as suggested by the applicant.

☐ as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure.

☐ as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention.

b. ☐ none of the figure is to be published with the abstract.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2011/057541**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☒ Claims Nos.: 19
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER*A01N 63/02(2006.01)i, C07K 5/08(2006.01)i, C07K 7/06(2006.01)i, C07K 7/64(2006.01)i, A01P 7/00(2006.01)i*

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A01N 63/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean utility models and applications for utility models

Japanese utility models and applications for utility models

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS(KIPO internal) & Keywords: chromobacterium, pesticidal, modulating, nematode

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y A	US 2007-0172463 A1 (MARTIN, P. A. W. et al.) 26 July 2007 See abstract; claims 4-11; paragraph [0062]	11 1-5,7-10,12-18
Y	Cronin, D. et al., Inhibition of egg hatch of the potato cyst nematode <i>Globodera rostochiensis</i> by chitinase-producing bacteria, European Journal of Plant Pathology, 1997, 103, pp. 433-440 See abstract; Materials and methods; and Results	11
A	Martin, P. A. M. et al., Chromobacterium subtsugae sp. nov., a betaproteobacterium toxic to Colorado potato beetle and other insect pests, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2007, volume 57, pp. 993-999 See abstract; Toxicity to insects; and Conclusions	1-5,7-18
A	MARTIN, P.A.W. et al., Toxicity of Chromobacterium subtsugae to Southern Green Stink Bug (Heteroptera: Pentatomidae) and Corn Rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae). Journal of economic entomology, 2007, volume 100, number 3, pages 680-684 See abstract and Results	1-5,7-18



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

25 JUNE 2012 (25.06.2012)

Date of mailing of the international search report

26 JUNE 2012 (26.06.2012)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
189 Cheongsu-ro, Seo-gu, Daejeon Metropolitan
City, 302-701, Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

KANG Young Jin

Telephone No. 82-42-481-8391



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/US2011/057541Patent document
cited in search reportPublication
datePatent family
member(s)Publication
date

US 2007-0172463 A1

26.07.2007

US 2005-0074431 A1

07.04.2005

US 7244607 B2

17.07.2007

WO 2005-032250 A2

14.04.2005

WO 2005-032250 A3

08.06.2006

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

To:

AGRIS CHERYL H.

THE LAW OFFICES OF CHERYL H. AGRIS, PHD.PC PO
BOX 8495 PELHAM NY 10803 USA

PCT

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

(PCT Rule 43bis.1)

Date of mailing
(day/month/year) **26 JUNE 2012 (26.06.2012)**

Applicant's or agent's file reference
MOI-42017-PCT

FOR FURTHER ACTION

See paragraph 2 below

International application No.

PCT/US2011/057541

International filing date (day/month/year)

24 OCTOBER 2011 (24.10.2011)

Priority date(day/month/year)

25 OCTOBER 2010 (25.10.2010)

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC

A01N 63/02(2006.01)i, C07K 5/08(2006.01)i, C07K 7/06(2006.01)i, C07K 7/64(2006.01)i, A01P 7/00(2006.01)i

Applicant

MARRONE BIO INNOVATIONS, INC. et al

1. This opinion contains indications relating to the following items:

- ☒ Box No. I Basis of the opinion
- ☐ Box No. II Priority
- ☒ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- ☐ Box No. IV Lack of unity of invention
- ☒ Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- ☐ Box No. VI Certain documents cited
- ☒ Box No. VII Certain defects in the international application
- ☒ Box No. VIII Certain observations on the international application

2. **FURTHER ACTION**

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA") except that this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 66.1bis(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of 3 months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA/220.

Name and mailing address of the ISA/KR
Korean Intellectual Property Office
189 Cheongsu-ro, Seo-gu, Daejeon
Metropolitan City, 302-701,
Republic of Korea
Facsimile No. 82-42-472-7140

Date of completion of this opinion

25 JUNE 2012 (25.06.2012)

Authorized officer

KANG Young Jin

Telephone No.82-42-481-8391



**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.

PCT/US2011/057541

Box No. I Basis of this opinion

1. With regard to the **language**, this opinion has been established on the basis of :
 - ☒ the international application in the language in which it was filed
 - ☐ a translation of the international application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))
2. ☐ This opinion has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43*bis*.1(a))
3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, this opinion has been established on the basis of:
 - a. a sequence listing filed or furnished
 - ☐ on paper
 - ☐ in electronic form
 - b. time of filing or furnishing
 - ☐ contained in the international application as filed.
 - ☐ filed together with the international application in electronic form.
 - ☐ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search.
4. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
5. Additional comments:

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.

PCT/US2011/057541

Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

☐ the entire international application

☒ claims Nos. 19

because:

☐ the said international application, or the said claims Nos. _____
relate to the following subject matter which does not require an international search (*specify*):

☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. _____
are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

☐ the claims, or said claims Nos. _____ are so inadequately supported
by the description that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

☒ no international search report has been established for said claims Nos. 19

☐ a meaningful opinion could not be formed without the sequence listing; the applicant did not, within the prescribed time limit:

☐ furnish a sequence listing on paper complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.

☐ furnish a sequence listing in electronic form complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.

☐ pay the required late furnishing fee for the furnishing of a sequence listing in response to an invitation under Rule 13ter.1(a) or (b).

☐ See Supplemental Box for further details.

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.

PCT/US2011/057541

Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-5,7-18	YES
	Claims	NONE	NO
Inventive step (IS)	Claims	1-5,7-10,12-18	YES
	Claims	11	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-5,7-18	YES
	Claims	NONE	NO

2. Citations and explanations :

Reference is made to the following documents:

D1: US 2007-0172463 A1 (MARTIN, P. A. W. et al.) 26 July 2007

D2: European Journal of Plant Pathology, 1997, 103, pp. 433-440

D3: International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2007, volume 57, pp. 993-999

1. Novelty and Inventive Step

1.1 Claims 1-5, 7-10

The subject matters of claims 1, 5, 7(the first claim 7 & the second claim 7) and 8 differ from these prior art documents in that a compound has pesticidal activity, a molecular weight of 840-900, and an HPLC retention time of 7-12 minutes on a reversed phase C-18 HPLC column using a water:acetonitrile gradient solvent system. And it is not obvious to a person skilled in the art by the documents, taken alone or in combination. Therefore, claims 1, 5, 7(the first claim 7 & the second claim 7) and 8 meet the requirements of PCT Article 33(2) and (3) with respect to novelty and inventive step.

Claims 2-4 and 9, 10 are dependent on claim 1 or 8 and therefore meet the requirements of PCT Article 33(2) and (3).

1.2 Claim 11

D1, which is considered to be the closest prior art to the subject matter of claim 11, discloses a method of controlling insects comprising applying in an area where an insect is to be controlled an effective insect control amount of *Chromobacterium subtsugae* species, an insecticidally-active metabolite obtained from *Chromobacterium subtsugae* species or a supernatant, filtrate or extract obtained from *Chromobacterium subtsugae* species. The subject matter of claim 11 differs from D1 in that the *Chromobacterium* species are useful for modulating nematode infestation in a plant. However, it is well known that the *Chromobacterium* sp. has a bioactivity for the defence of potato crops from potato cyst nematodes in D2 (see abstract, strain UP1, and results). Accordingly, claim 11 would have been obvious over D1 in view of D2. Therefore, claim 11 lacks an inventive step under PCT Article 33(3).

Continued on Supplemental Box

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.

PCT/US2011/057541

Box No. VII Certain defects in the international application

The following defects in the form or contents of the international application have been noted:

Claims of this application are not numbered consecutively in Arabic numbers, since claim 6 is found missing (PCT Rule 6.1(b)).

Claims of this application are not numbered consecutively in Arabic numbers, since claim 7 is found twice (PCT Rule 6.1(b)).

Claim 19 does not comply with PCT Rule 6.4(a) because the multiple dependent claim doesn't refer to other claims in the alternative way.

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.

PCT/US2011/057541

Box No. VIII Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

The term 'The method according to claim 7' used in the second claim 7 is unclear and leaves the reader in doubt as to the meaning of the technical feature to which it refers, thereby rendering the definition of the subject matter of the said claim unclear (PCT Article 6).

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.

PCT/US2011/057541

Supplemental Box

In case the space in any of the preceding boxes is not sufficient.

Continuation of:

Box V

1.3 Claims 12-18

The subject matter of claims 12 and 18 differs from these prior art documents(D1-D3) in that a pesticidal combination of a strain of *Chromobacterium* sp. and another pesticidal substance has a synergistic effect to at least one pest. And it is not obvious to a person skilled in the art by the documents, taken alone or in combination. Therefore, claims 12 & 18 meet the requirements of PCT Article 33(2) and (3) with respect to novelty and inventive step.

Claims 13-17 are dependent on claim 12 and therefore meet the requirements of PCT Article 33(2) and (3).

2. Industrial Applicability

The subject matter of claims 1-5, 7-18 is considered to be industrially applicable under PCT Article 33(4).

**TRATADO DE COOPERACIÓN INTERNACIONAL
EN MATERIA DE PATENTES**

PCT

Informe de Búsqueda Internacional

(Artículo PCT 18, así como reglas PCT 43 y 44)

Referencia del solicitante o del agente <i>MOI-42017-PCT</i>	PROCEDER Ver notificación formulario PCT/ISA/220, así como, en tanto corresponda, el punto 5.abajo	
Solicitud Internacional N°: <i>PCT/US 2011/057541</i>	Fecha de presentación Internacional (día/mes/año) <i>24 de octubre de 2011 (24.10.2011)</i>	Fecha de prioridad (la más antigua) (día/mes/año) <i>25 de octubre de 2010 (25.10.2010)</i>
Solicitante <i>MARRONE BIO INNOVATIONS, INC. et al</i>		

Este Informe de Búsqueda Internacional fue elaborado por el Organismo de Búsqueda Internacional y, de acuerdo con el artículo 18, es enviado al solicitante. Se envía una copia a la Oficina Internacional.

Este informe de búsqueda Internacional comprende, en total, 4 hojas.

☐ Además se adjunta una copia de cada uno de los documentos del estado de la técnica mencionados en este informe

1. Fundamentos del Informe

a. Con respecto al idioma, la búsqueda internacional fue llevada a cabo sobre la base de:

- ☒ la solicitud internacional en el idioma en que fue presentada
☐ una traducción de la solicitud internacional al _____, que es el idioma de una traducción suministrada a los fines de la búsqueda internacional (reglas 12.3(a) y 23.1 (b)).

b. ☐ Este informe de búsqueda internacional ha sido confeccionado teniendo en consideración la **rectificación de un error obvio**, autorizada por o notificada a este organismo según la regla 91 (regla 43.6bis(b))

c. ☐ Con respecto a los **nucleótidos y/o aminoácidos** revelados en la solicitud internacional, ver campo N° 1

2. ☒ **Determinadas reivindicaciones no eran investigables** (ver campo II).

3. ☐ **La invención carece de unidad** (ver campo III).

4. Con respecto al **título**,

- ☒ se aprueba el texto presentado por el solicitante.
☐ el texto fue establecido por el organismo como sigue:

5. Con respecto al **resumen**,

- ☒ se aprueba el texto presentado por el solicitante.
☐ el texto fue establecido por el organismo, de acuerdo con la regla 38.2 b), en la versión indicada en el campo IV. El solicitante puede presentar una posición ante el organismo durante el transcurso de un mes a partir de la fecha de envío de este Informe de Búsqueda Internacional.

6. Con respecto a las **ilustraciones**

a. Con el resumen se debe publicar la siguiente figura de Las **ilustraciones**: figura N° -1-.

- ☒ sugerida por el solicitante.
☐ seleccionada por el organismo, dado que el mismo solicitante no sugiere ninguna figura.
☐ seleccionada por el organismo, dado que esta figura caracteriza mejor la invención.

b. ☐ con el resumen no se publica ninguna de las ilustraciones

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional N°:

PCT/US 2011/057541

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD A01N 63/02(2006.01), C07K 5/08(2006.01), C07K 7/06(2006.01), C07K 7/64(2006.01), A01P 7/00(2006.01) Según la clasificación internacional de patentes (IPC) o las clasificaciones nacional e IPC		
B. ÁMBITOS INVESTIGADOS Documentación mínima investigada (Sistema de clasificación y símbolos de clasificación) A01N 63/02		
Publicaciones investigadas pero no pertenecientes al material mínimo investigado, en tanto pertenezcan al ámbito investigado Modelos de utilidad y solicitudes de modelos de utilidad coreanos Modelos de utilidad y solicitudes de modelos de utilidad japoneses		
Base de datos electrónica consultada durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y expresiones de búsqueda eventualmente empleadas) eKOMPASS(KIPO Internal) y keywords chromobacterium, pesticidal, modulating, nematode		
C. ANTECEDENTES CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría	Denominación de la publicación, así como, de ser apropiado, indicación de los pasajes relevantes	Relevante para reivindicación N°:
Y A	US 2007-0172463 A1 (MARTIN P. A. W. et al.) 26 de julio de 2007 (2007-07-26) ver resumen; reivindicaciones 4-11; párrafo [0062] -----	11 1-5, 7-10, 12-18
Y	Cronin D et al., Inhibition of egg hatch of the potato cyst nematode Globodera rostochiensis by chitinase-producing bacteria, European Journal of Plant Pathology, 1997, 103, pp. 433-440 ver resumen; materiales y métodos; y resultados -----	11
A	Martin P. A. M. et al., Chromobacterium subtsugae sp. nov., a betaproteobacterium toxic to Colorado potato beetle and other insect pests International Journal of systematic and Evolutionary Microbiology, 2077, vol. 57pp. 993-999 ver resumen; Toxicity to insects; y conclusiones -----	1-5, 7-18
A	Martin P. A. W. et al., Toxicity of Chromobacterium subtsugae to Southern Green Stink Bug (Heteroptera: Pentatomidae) and Corn Rootworm (coleoptera: Chrysomelidae) Journal of Economic Entomology, 2007, vol. 100, nr. 3, pp. 680-684, ver resumen y resultados -----	1-5, 7-18
☐ Otras publicaciones están listadas en la continuación del campo C ☒ Ver familia de patentes en el anexo		
Categorías particulares indicadas en publicaciones “A” publicación que define el estado general de la técnica pero no considerada como particularmente importante “B” documento anterior pero publicado recién o después de la de la fecha de presentación internacional “L” publicación adecuada para hacer aparecer como dudosa una reivindicación de prioridad, o mediante la cual debe ser considerada la fecha de divulgación de otra publicación mencionada en el informe de búsqueda o que es indicada por otra razón particular (como realizada) “O” publicación que se refiere a una revelación oral, a una utilización, a una exposición o a otras disposiciones “P” publicación realizada antes de la fecha de presentación internacional pero luego de la fecha de prioridad reivindicada “T” publicaciones posteriores a las difundidas en la fecha de presentación internacional o de la fecha de prioridad y que no colisionan con la solicitud, sino que solo están indicadas para mayor entendimiento del principio fundamental de la invención o de la teoría sobre la cual se basa “X” publicación de particular importancia: la invención reivindicada no puede ser considerada, solo como consecuencia de esta publicación, como novedosa o apoyarse en una actividad inventiva “Y” publicación de particular importancia: la invención reivindicada no puede ser considerada como apoyada en una actividad inventiva cuando puede ser relacionada con una o varias otras publicaciones de esta categoría y tal relación es notoria para un especialista “&” publicación que es miembro de la misma familia		
Fecha de finalización de la búsqueda internacional 25 de junio de 2012 (25.06.2012)		Fecha de envío del Informe de Búsqueda Internacional 26 de junio de 2012 (26.06.2012)
Nombre y Dirección Postal del ISA/KR Korean Intellectual Property Office Government Complex – Daejeon 189 Cheongsu-Ro Seo-gu, Daejeon 302-701, República de Corea FAX: 82 42 472 7140		Funcionario Apoderado Kang Young Jin Teléfono N°: +82 42 481 8391

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Referencia Internacional

*PCT/US 2011/057541***Campo II: Observaciones acerca de porque determinadas reivindicaciones no eran investigables (continuación del ítem 2 de la hoja 1)**

Este Informe de Búsqueda Internacional no fue realizado con respecto a algunas reivindicaciones, según el artículo 17(2)(a), por las siguientes razones:

1. ☐ Reivindicaciones N°:
porque se refieren a objetos que no requieren ser investigados por este Organismo, a saber:

2. ☐ Reivindicaciones N°:
porque se refieren a partes de la Solicitud Internacional que no cumplen con los requisitos prescriptos en una extensión que no permite llevar a cabo una búsqueda internacional, específicamente:

3. ☒ Reivindicaciones N°: **19**
porque son reivindicaciones dependientes y no están desarrolladas en acordanza con la segunda y la tercera frase de la regla 6.4(a).

Campo III: Observaciones por falta de uniformidad de la invención (continuación del ítem 3 de la hoja 1)

Este Organismo de Búsqueda Internacional encontró invenciones múltiples en esta solicitud internacional, a saber:

1. ☐ Como todas las tasas adicionales requeridas fueron abonadas en término por el solicitante, este Informe de Búsqueda Internacional cubre todas las reivindicaciones investigables.

2. ☐ Como todas las reivindicaciones investigables pueden ser investigadas sin un esfuerzo que justifique una tasa adicional, este Organismo no solicita ningún pago o tasa adicional.

3. ☐ Como solo algunas de las tasas adicionales fueron abonadas en término por el solicitante, este Informe de Búsqueda Internacional cubre solo aquellas reivindicaciones para los cuales fueron abonadas las tasas, específicamente, las reivindicaciones N°:

4. ☐ Ninguna de las tasas adicionales requeridas fue abonada en término por el solicitante. En consecuencia, este Informe de Búsqueda Internacional está restringido a la invención mencionada inicialmente en las reivindicaciones; la misma está cubierta por las reivindicaciones N°:

Observaciones sobre protestas

- ☐ Las tasas adicionales de búsqueda fueron acompañadas por la protesta del solicitante y, de corresponder, por la tasa de protesta
- ☐ Las tasas adicionales de búsqueda fueron acompañadas por la protesta del solicitante, pero la tasa de protesta aplicable no fue pagada en el plazo especificado en la intimación
- ☐ Las tasas adicionales no fueron acompañadas por ninguna protesta.

Información de miembros de la familia de patentes

PCT/US 2011/057541

US	20070172463	A1	26-07-2007	US	2005-0074431	A1	07-04-2005
				US	7244607	B2	17-07-2007
				WO	2005-032250	A2	14-04-2005
				WO	2005-032250	A3	08-06-2006

CAPÍTULO REIVINDICATORIO MODIFICADO
(Solicitud Divisional)

1. Un método para aislar Chromamide A, caracterizado porque comprende las etapas de:

cultivar *Chromobacterium substugae* (NRRL B-30655) en un caldo L agitando dicho *Chromobacterium substugae* a 225 rpm durante dos horas a temperatura ambiente para formar un caldo de células enteras;

extraer dicho caldo de células enteras usando una resina;

filtrar dicho extracto;

lavar dicho extracto con agua;

mojar dicho extracto con acetona / metanol durante dos horas;

fraccionar dicho extracto lavado utilizando HPLC;

aislar dicho Chromamide A.

2. Un método para inhibir el crecimiento de *M. incognita*, caracterizado porque comprende las etapas de:

cultivar *Chromobacterium substugae* (NRRL B-30655) en caldo L agitando dicho *Chromobacterium substugae* a 225 rpm durante dos horas a temperatura ambiente para formar un caldo de células enteras;

aplicar 1,5, 3, 6, 12,5, 25, o 50 ml/L de dicho caldo de células enteras a una planta o a un substrato de una planta; y

contar el número de *M. incognita* muertos.
