

NUEVA COMPOSICIÓN MICOHERBICIDA PARA SUPRIMIR EL JACINTO DE AGUA

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención proporciona un nuevo herbicida aislado de *Setosphaeria monoceras*. Y además se refiere a una composición y un método para el control biológico de jacinto de agua. Las esporas aisladas, el filtrado de cultivo libre de células, los metabolitos crudos y fitotoxina purificada pura obtenidos del mismo, útiles para el control del agente de control biológico potencial para el jacinto de agua. La presente invención también describe composiciones herbicidas que comprenden aislados fúngicos formulados en un medio de crecimiento para mantener la viabilidad del producto cuando la composición de control biológico se aplica a la maleza. La presente invención también da a conocer procedimientos de cribado de aislados fúngicos para determinar si muestran actividad de biocontrol. La presente invención también da a conocer un estudio de todo el genoma para detectar aislados *Setosphaeria monoceras* que presentan actividad de biocontrol del jacinto de agua.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El jacinto de agua (*Eichhornia* sp.) es un género de maleza acuática nociva. El género incluye las especies *Eichhornia azurea*, *Eichhornia crassipes*, *Eichhornia diversifolia*, *Eichhornia paniculata*. En la India, más de 200.000 hectáreas de superficie de agua está infectado por las plantas de este género. Esto plantea serios problemas económicos, sociales y medioambientales en la India y en muchos países tropicales y subtropicales. Esto demuestra que la capacidad reproductiva, la adaptabilidad, los requerimientos nutricionales y resistencia a ambientes adversos hacen que sea imposible de erradicar, y difícil de controlar. El problema de la propagación del jacinto de agua en los cursos de agua y los bancos, lleva a aguas residuales mediante el aumento de la tasa de transpiración y son un gran rival para los peces y el plancton y luego cambian las cualidades naturales del agua como resultado de la descomposición de la planta y el consumo de oxígeno disuelto y de este modo la vida acuática. Es un macrófito acuático que flota libremente, reproduciendo tanto vegetativamente a través de rametos formados a partir de capullos axilares en los estolones como sexualmente a través de la producción de semillas.

Una variedad de métodos han tratado de frenar el crecimiento de la maleza. Los herbicidas se utilizan con más frecuencia, ya que proporcionan una herramienta de acción inmediata, aunque, son costosos y pueden tener efectos tóxicos si no se aplican de acuerdo a las instrucciones del fabricante. En la actualidad existe una gran preocupación sobre el uso de herbicidas químicos sintéticos, tales como el glifosato, para controlar maleza. En consecuencia, el uso de herbicidas químicos sintéticos ya está impedido o restringido en muchas áreas del mundo.

Debido a la capacidad reproductiva y el crecimiento rápido del jacinto de agua, ha sido necesario el uso de un conjunto de agentes de biocontrol para aumentar el estrés biótico con el fin de reducir el resurgimiento de la población. Entre los enemigos naturales de jacinto de agua, patógenos de plantas y sus metabolitos pueden ser útiles porque, a menudo son hospedero-específicos (sin riesgo para los cultivos, plantas nativas o animales), fáciles de propagar y difundir y auto-suficientes, reduciendo así la necesidad de aplicaciones repetidas. Sin embargo, como es el caso de otros bioplaguicidas, los herbicidas microbianos son inactivados en el medio ambiente por la exposición a la temperatura, baja humedad y radiación ultravioleta. De hecho, el principal problema de los bioplaguicidas es su producción a gran escala en una formulación que permita una aplicación exitosa en el campo. Entre los patógenos de plantas, los hongos son los patógenos de plantas naturales más importantes. Muchos hongos patógenos han sido citados en la literatura como potenciales agentes de biocontrol para el jacinto de agua. Entre ellos se encuentran *Cercosporapiaropi* (= *C. Rodmanii*), *Acremoniumzonatum*, *Alternariaeichhorniae*, *Myrotheciumrroidum*, *Rhizoctonia solani* y *Uredo eichhorniae*. *A. eichhorniae* y *C. piaropi*, han sido estudiados por su biología, potencial de biocontrol, la formulación de la especificidad del huésped y han sido probados en condiciones experimentales.

Sin embargo, no existe algún bioherbicida comercial para el jacinto de agua. El control biológico reduce el vigor de la maleza, junto con las condiciones ambientales, la fenología de la planta y el uso integrado de otras opciones de manejo. Por consiguiente, el uso de bioherbicidas como agentes de biocontrol está atrayendo una atención considerable. Los bioherbicidas son típicamente endémicos y se aplican inundativamente para controlar la vegetación no deseada. En particular, los micoherbicidas se bioherbicidas basados en patógenos de plantas fúngicas. El objetivo principal en el tratamiento de la maleza es reducir la competencia de la maleza con el fin de permitir que las plantas deseadas crezcan libremente. De acuerdo con ello, el control biológico de la maleza se ocupa de las

preocupaciones sobre los efectos de los productos químicos sobre la integridad del medio ambiente y la salud humana.

Objetivos de la presente invención:

En un primer aspecto, la presente invención proporciona una composición herbicida adecuada para controlar el jacinto de agua, la composición comprende un agente herbicida de un *Setosphaeria*sp, en particular, la cepa AGWH # 11. Esta cepa esta en depósito en la colección de patentes de la IMTECH bajo los términos del Tratado de Budapest y se le ha asignado el número de acceso MTCC 5974. También se encuentra depositado en NCIM con el número de acceso 1370. En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un método para controlar el crecimiento del jacinto de agua, que comprende poner en contacto las plantas de jacinto de agua con la composición de herbicida de acuerdo con la invención.

En aún un aspecto adicional, la invención se refiere al uso de una cepa *Setosphaeria* para producir un agente herbicida eficaz para controlar el crecimiento de plantas de jacinto de agua. La cepa utilizada es preferiblemente una cepa que tiene los rasgos característicos de la cepa *Setosphaeria* AGWH#11 como la depositada en IMTECH con el número de acceso MTCC 5974.

Es un objetivo adicional de la presente invención proporcionar que el análisis de la secuencia 18S rARN mostró 96% de similitud de nucleótidos de los hongos a *Setosphaeria monoceras*. (designado AGBIO AGWH#11/NCIM1370/ CMCM 5974) pero también indicó variación de nucleótidos de este hongo a partir de otros géneros conocidos de Bipolaris, Pleosporaceae, Cochiliobolus, Alternaria incluyendo una alternativa ambientalmente aceptable a los herbicidas químicos sintéticos para el control de hierbas, como el jacinto de agua.

Es otro objetivo de la presente invención proporcionar una composición herbicida para el control del jacinto de agua. Otros objetivos de la invención se refieren a un método para controlar el jacinto de agua.

Resumen de la presente invención:

En un primer aspecto, la presente invención proporciona una composición adecuada para controlar el jacinto de agua, la composición que comprende un agente herbicida de un *Setosphaeria monoceras*. El *Setosphaeria monoceras* preferiblemente es una cepa que tiene los rasgos característicos de *Setosphaeria monoceras* (MTCC 5974).

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un método para controlar el crecimiento del jacinto de agua, que comprende la etapa de inocular un área donde el jacinto de agua ha de ser controlado con una cantidad eficaz de una composición herbicida de acuerdo con la invención.

En todavía otro aspecto, la invención se refiere al uso de un *Setosphaeria monoceras* para controlar el crecimiento del jacinto de agua. La cepa utilizada es preferiblemente una cepa que tiene los rasgos característicos de *Setosphaeria monoceras* AGWH # 11 como la depositada en IMTECH y recibió el número de acceso MTCC 5974 y, finalmente, identificada como *Setosphaeria monoceras*.

En aún un aspecto adicional, la invención se refiere a un estudio genómico completo y un estudio molecular de *Setosphaeria monoceras*.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 ilustra la relación filogenética de los hongos con respecto a las especies seleccionadas de los otros géneros basado en genes 16S de ARN de acuerdo con la presente invención;

La Figura 2 ilustra un HPLC típico, perfil de elución en columna de fase reversa C18 de un agente herbicida (fitotoxina) de acuerdo con la presente invención;

La Figura 3. ilustra las características macroscópicas de la cepa de acuerdo con la presente invención;

La Figura 4 ilustra las características microscópicas de la cepa de acuerdo con la presente invención;

La Figura 5 y la Figura 6 ilustran la distribución del nivel de calidad base, extremo izquierdo (R1) y extremo derecho (R2) de la lectura del extremo emparejado para la muestra de acuerdo con la presente invención;

La Figura 7 y la Figura 8 ilustran la distribución composición base del extremo izquierdo y derecho de la secuencia de lectura del extremo emparejado para la muestra de hongos de acuerdo con la presente invención;

La Figura 9 y la Figura 10 ilustran la distribución de GC del extremo izquierdo y derecho de la secuencia de lectura del extremo emparejado para la muestra de hongos de acuerdo con la presente invención;

La Figura 11 ilustra la distribución de valores BLASTX E para la muestra de hongos de acuerdo con la presente invención;

La Figura 12 ilustra el resultado anotado de los 15 organismos principales que se encuentran en BLASTX para la muestra de hongos, de acuerdo con la presente invención;

La Figura 13 ilustra los 13 mejores términos en la categoría función biológica identificados utilizando la anotación de ontología Génica para la muestra de acuerdo con la presente invención;

La figura 14 ilustra los 13 mejores términos en la categoría de función molecular identificados utilizando la anotación de ontología Génica para la muestra de acuerdo con la presente invención;

La figura 15 ilustra los 13 mejores términos en la categoría componente celular identificados utilizando la anotación de ontología Génica para la muestra de acuerdo con la presente invención;

Tabla 1: Efecto de AGWH # 11 en el jacinto de agua

Tabla 2: Reducción de la biomasa del jacinto de agua

Tabla 3: Efectos de la AGWH # 11 en las hojas desprendidas de jacinto de agua

Tabla 4: Respuesta de los cultivos, familias similares y especies de hierbas de prueba para la susceptibilidad

Tabla 5: Hongos recolectados de jacinto de agua

Tabla 6: Patogenicidad de los hongos recolectados de jacinto de agua (pruebas aplicadas a hojas desprendidas de jacinto de agua)

Tabla 7: Cribado secundaria de las cepas aisladas

Tabla 8. Plantas utilizadas en la prueba de hospedero-especificidad, de los aislados AGWH#11

Tabla 9: Comparaciones de las secuencias de ADN que se realizaron entre AGWH#11 sp. aislado

Tabla 10: Desarrollo de los síntomas sobre el jacinto de agua debido a la infección con AGWH # 11 durante 20 días

Tabla 11: Bioensayo del compuesto de disolvente extraído de AGWH # 11

Tabla 12: Pruebas de compatibilidad de varias formulaciones de AGWH # 11 por bioensayo total de la planta

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA PRESENTE INVENCIÓN:

El objetivo principal de esta invención es proporcionar un nuevo herbicida eficaz contra el jacinto de agua. Otro objeto de la invención es proporcionar un herbicida que comprende filtrado de cultivo libre de células de *S. monoceras* MTCC 5974 con un aditivo o un portador. Se determinó la relación filogenética de las especies seleccionadas de los Generos *Setosphaeria monoceras*, basados en los genes 16S de ARN. Durante la encuesta a la Aldea AdaviRamanpalam, PenuballiMandal, Distrito Khammam, Andhra Pradesh, las nuevas especies de hongos *Setosphaeria monoceras* se aisló de jacintos de agua enfermos. Las lesiones extirpadas se esterilizaron superficialmente por inmersión en etanol al 70% durante 30 segundos y las lesiones extirpadas se enjuagaron en agua estéril, se colocaron en placas de Petri que contenían Agar de patata y dextrosa (APD), y se incubaron 20 cm bajo luces fluorescentes (12 horas periodo diurno) por 3 días. Las colonias de *Setosphaeria monoceras* se transfirieron a placas de APD frescas y posteriormente se transfirieron a tubos inclinados de APD para el almacenamiento. Los aislados fueron cultivados en medio de agar de patata y dextrosa y los cultivos madre de éstos se mantuvieron en el laboratorio y se les dio el número de laboratorio AGWH #11 y también se depositaron en el NCIM, Pune, India y se les dio el número de acceso NCIM 1370 y bajo el Tratado de Budapest IMTECH, Chandigarh, India, bajo el número de acceso MTCC 5974.

La invención se refiere en general a un nuevo aislado de *Setosphaeria monoceras* que exhibe especificidad de huésped hacia las hierbas de jacinto de agua. Las colonias en agar de patata y dextrosa son inicialmente de color blanco a marrón grisáceo y se vuelve de color verde oliva a negro grisáceo con una grisácea a medida que madura. El reverso también es de pigmentación oscura y de color oliva a negro. La colonia se vuelve madura en 5 días. La textura es aterciopelada a lanosa. Las hifas son septadas y marrones. Los conidióforos (4,5-6 micras de ancho) son de color marrón, simples o ramificados, geniculadas y simpodiales, doblándose en los puntos en los que cada conidio surge. Esta propiedad conduce a la apariencia de zigzag del conidióforo. Los conidios, que también se denominan poroconidia, son 3 a 6 unicelulares, de forma fusiforme a cilíndrica, de color marrón claro a oscuro y tienen patrón de crecimiento geniculado simpodial. El poroconidio (30-35 μm x 11 a 13,5 μm) es distoseptado y tiene escasamente una protuberancia, un hilo con pigmentación oscura. Esta cicatriz basal indica el punto de unión al conidióforo. Desde la celda terminal del conidio, tubos germinales pueden desarrollarse y alargarse en la dirección del eje longitudinal del conidio. El análisis de la secuencia 18S rRNA mostró 96% de similitud de nucleótidos de las especies de Hongos de *Setosphaerias* sino que también indica la variación de nucleótidos de este hongo de otro género conocido (Fig 1). La patogenicidad de *Setosphaeria monoceras*, como un bioherbicida ha sido probado. La cepa se ensayó para determinar la gama de huéspedes con un bioherbicida. Las plantas eran de 4 semanas de edad y fueron tratadas con el 1% de la formulación desarrollada.

En consecuencia, la presente invención proporciona una composición herbicida para el control de jacinto de agua, la composición que comprende un agente herbicida de un *Setosphaeria monoceras*. El *Setosphaeria monoceras* preferentemente es una cepa que tiene los rasgos característicos de *Setosphaeria monoceras* AGWH # 11. Un rasgo característico de esta cepa es su secuencia 18s rRNA. El análisis de secuencia mostró 96% de similitud de nucleótidos de AGWH # 11 a *Setosphaeria monoceras*, pero también se indica la variación de esta cepa de otras especies conocidas del género *Setosphaeria*. Adicionalmente, la AGWH # 11 tiene características sorprendentes en relación con la actividad herbicida, en particular contra el jacinto de agua. El *Setosphaeria monoceras* que tiene los rasgos característicos de *Setosphaeria monoceras* AGWH # 11 más preferiblemente es *Setosphaeria monoceras* AGWH # 11 depositados como MTCC 5974 o NCIM1370.

En una realización de la presente invención, el agente herbicida puede ser una hifa o un inóculo de esporas, como un inóculo término inóculo conidial. El término inóculo se refiere a un agente que comprende biomasa fúngica. El inóculo puede ser viable o no viable. Un inóculo no viable se puede obtener sometiendo un inóculo viable a un tratamiento de inactivación como se conoce en la técnica. El tratamiento térmico se puede utilizar adecuadamente para la inactivación de un inóculo. Una Hifa y/o (conidios) inóculos de esporas pueden ser obtenidas de fermentaciones sólidas o líquidas. Un inóculo de hifas se puede seleccionar como una suspensión de las hifas. Del mismo modo un (conidios) inóculo de esporas se puede seleccionar de una suspensión de esporas.

En una realización de la presente invención, el agente herbicida puede ser caldo de cultivo (caldo de fermentación). Dentro de la presente invención, el término caldo de cultivo se refiere al líquido en el que se cultivó el hongo. El caldo de cultivo puede ser utilizado tal como resulta de una fermentación líquida y puede contener biomasa de hongos tales como hifas y/o (conidio) esporas de biomasa. De acuerdo con ciertas realizaciones preferidas, el caldo de cultivo es purificado al menos parcialmente. El término "al menos parcialmente purificado" comprende purificación parcialmente. Los resultados de caldo de cultivo parcialmente purificados de realizar una serie de etapas de purificación que aumentan el contenido de ciertos compuestos del caldo de cultivo (mientras se quita otros). Un caldo de cultivo parcialmente purificado mantiene una mezcla de compuestos. Por ejemplo, caldos de cultivo parcialmente purificados pueden ser filtrado de cultivo libre de células (FCLC), por ejemplo obtenido mediante el filtrado de la biomasa fúngica con cualquier medio conocido como la microfiltración. Un caldo de cultivo parcialmente purificado puede además ser obtenido por (orgánica) extracción con disolvente de ciertos compuestos del caldo de cultivo o de un FCLC obtenido del mismo. De acuerdo con ciertas formas de realización el disolvente se selecciona a partir de hexano, acetato de etilo, cloroformo, metanol o mezclas de los mismos. El disolvente seleccionado comprende preferiblemente cloroformo y más preferiblemente es cloroformo. Cuando se utiliza cloroformo como disolvente se obtiene un agente herbicida potente como se detalla adicionalmente en los ejemplos. Por lo tanto, la invención se refiere a un agente herbicida obtenible por extracción con disolvente orgánico, en particular una extracción con cloroformo, un de FCLC *Setosphaeria monoceras* es usado. El disolvente cloroformo puede tener el perfil de elución presentado en la Figura 2 en un perfil HPLC C 18. El agente herbicida de acuerdo con la invención comprenderá un número de metabolitos

secundarios. "Un número de" dentro de la presente invención debe ser interpretado como que significa uno o más, tal como una pluralidad, por ejemplo 2 a 10 tal como, 3-9, 4-8, 5-7, o 6. Los metabolitos secundarios en el agente herbicida se pueden purificar adicionalmente. De acuerdo con ciertas realizaciones, los metabolitos secundarios se purifican hasta > 80% de pureza, tal como > 85%, > 90%, > 95%, > 99% hasta 99,9% de pureza.

Las composiciones y métodos de la invención incluyen la provisión de aplicación de filtrado de cultivo libre de células o sus metabolitos para producir un nuevo agente herbicida. Las composiciones herbicidas se pueden preparar como una formulación líquida suspendiendo el caldo, caldo parcialmente purificado, tal como caldo libre de células, crudo o metabolitos purificados en un vehículo agrícolamente aceptable para la aplicación a la maleza o la ubicación en la que está creciendo. Para las composiciones de la invención, cualquier vehículo agrícolamente aceptable puede ser utilizado si es líquido o sólido, siempre que se puede emplear en formulaciones agrícolas u hortícolas y preferiblemente son biológicamente inertes. Los vehículos líquidos aceptables en agricultura de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, agua, tensoactivos, aceites vegetales, y aceites minerales. En una realización preferida, el vehículo agrícolamente aceptable para una formulación de líquido es agua, y el agente herbicida comprende un caldo libre de células.

Las composiciones herbicidas se pueden preparar también como formulaciones granulares, formulaciones fluidas, o formulaciones de polvo humectables mediante la mezcla con un vehículo aceptable en agricultura, que se aplica luego a la maleza.

Los vehículos sólidos agrícolamente aceptables adecuados incluyen polvos minerales, tales como arcilla, talco, bentonita, carbonato de calcio, tierra de diatomeas y carbono blanco; harinas vegetales tales como harina de soja y almidón, y algunos polímeros, tales como alcohol de polivinilo y polialquilenglicol.

Según las realizaciones preferidas en la formulación un tensoactivo, tal como un Tween 80, Triton X, aceite de parafina y Tween 20 se combinan con un agente antibiótico. Como se muestra en la sección experimental da como resultado una combinación tal, que aumenta la actividad de control de jacinto de agua. De acuerdo con otras realizaciones preferidas en la formulación de un aceite mineral,

tal como aceite de parafina, se combina con un antibiótico (antimicrobiano). Como se muestra en la sección experimental tal combinación da como resultado un sorprendente aumento de la actividad de control de jacinto de agua. La estreptomicina, Ampilox, la azitromicina se puede seleccionar de estos antibióticos. Agentes de formulación generales se pueden añadir en una cantidad de desde 0,2 hasta 0,9% w/w, tal como desde 0,3 hasta 0,8%, 0,4 a 0,7%, 0,4 a 0,6%, tal como alrededor de 0,5% w/w para el agente herbicida. Los antimicrobianos pueden añadirse en una cantidad de 0.05-0.5% w / w, tales como 0,06 a 0,4%, desde 0,07 hasta 0,3%, 0,08-0,3%, 0,09-0,3%, 0,1-0,3%, tal como aproximadamente 0,2% w/w al agente herbicida.

Además, en otra realización de la presente invención, la presente composición comprende además una fuente de nutrientes para la cepa *Setosphaeria monoceras*. El nutriente puede ser seleccionado a partir de harinas vegetales tales como harina de soja y almidón y se añade en cantidades de 0,5% al medio de cultivo

Un aspecto adicional de la invención se refiere a un método de control de la maleza, en particular, jacinto de agua y especies relacionadas. El método comprende poner en contacto el Jacinto de agua con la composición de acuerdo con la invención, que contiene el agente herbicida. La composición de la invención puede ser aplicada a la maleza de jacinto de agua para ponerse en contacto mediante el rocío de una formulación líquida en las hierbas. La cantidad rociada es preferiblemente suficiente para recubrir sustancialmente las hojas de la maleza. Una aplicación puede ser suficiente para reducir el crecimiento corriente; sin embargo, aplicaciones repetidas pueden ser necesarias si el nuevo crecimiento de la planta se produce a partir de estructuras superficiales resistentes o de abajo. El método de la presente invención también se puede utilizar además de o en combinación con otras medidas de control.

Como tal, el método es para suprimir o prevenir el crecimiento de jacinto de agua y el método comprende la etapa de poner en contacto el jacinto de agua con una composición de la invención. Los detalles de las características técnicas de la composición de la invención se han discutido anteriormente. Como el experto en la materia comprenderá, la composición de la invención será inoculada en una cantidad suficiente para producir un efecto, en particular el control (reducción o inhibición) de crecimiento del jacinto de agua. Está dentro del ámbito del conocimiento y la habilidad del experto en la materia determinar las cantidades eficaces. De acuerdo con ciertas realizaciones, las cantidades eficaces pueden estar en el rango de 10 ml de caldo de cultivo libre de células formulado añadido a

1 litro de agua para su aplicación. Aproximadamente 1,0 a 1,5 litros por acre se aplica por el método de rocío y similares. El herbicida de la invención se puede formular mediante la suspensión de las esporas obtenidas en agua por cultivo en masa, pero el método de formulación no se limita a éste. En este método, la concentración de esporas es de apropiadamente 2×10^8 esporas/ml, pero no se limita a este intervalo. Al suspender esporas en agua, se pueden añadir adyuvantes tales como un surfactante y un esparcidor. La cepa *Setosphaeria monoceras* que es el principal agente puede ser una cepa fresca inmediatamente después de la fermentación. Alternativamente, una cepa alguna vez almacenada puede ser usada después de la renaturalización con agua o similares. Pueden ser utilizados como un método para almacenar, métodos bien conocidos para el almacenamiento de cepa tales como almacenamiento de ultra baja temperatura (-10°C), liofilización al vacío o similares.

En ciertas realizaciones de la presente invención, la inoculación se llevó a cabo en la etapa de post-emergente de maleza del jacinto de agua. De acuerdo con algunas realizaciones del método de la invención, la biomasa de jacinto de agua se puede reducir, por ejemplo, con medios mecánicos, tales como la eliminación mecánica de la biomasa del jacinto de agua.

Un aspecto adicional de la invención se refiere al uso de la cepa A *Setosphaeria monoceras*, preferiblemente una cepa que tiene los rasgos característicos de la cepa *Setosphaeria monoceras* AGWH#11 para la producción de un agente herbicida eficaz para controlar el crecimiento de jacinto de agua. Las características técnicas de la agente herbicida se han discutido anteriormente en relación a la discusión de la composición de la invención. Similar a lo que se discute para la composición de la invención, el agente herbicida se puede seleccionar a partir de un inóculo de hifas, un inóculo de esporas, preferiblemente un inóculo conidial, caldo de cultivo, preferiblemente al menos un caldo de cultivo parcialmente purificado, metabolitos secundarios.

Aun un aspecto adicional de la invención se refiere a un agente herbicida obtenible por un método que comprende la extracción con cloroformo del filtrado de cultivo libre de células (CFCF, por sus siglas en inglés) de un *Setosphaeria monoceras*. En el método se proporciona el CFCF, preferiblemente mediante el cultivo de la cepa seleccionada en un cultivo líquido y produciendo un CFCF del caldo de cultivo. Luego se lleva a cabo una extracción con cloroformo en dicho CFCF. La extracción de los metabolitos se completó. Un litro de caldo de cultivo se inoculó y

se incubó durante aproximadamente 14 días a 28°C. Se añadió cloroformo con volumen similar al fluido sobrenadante. Los metabolitos crudos se recuperaron vertiendo con cuidado la capa acuosa. Una extracción de fluido de cultivo sobrenadante con cloroformo produjo 9,5 g de metabolitos crudos. El *Setosphaeria monoceras* preferentemente es una cepa que tiene los rasgos característicos de *Setosphaeria monoceras* AGWH # 11.

Los siguientes ejemplos se dan a modo de ilustración de la de la presente invención y por lo tanto no se deben interpretar con el fin limitar el alcance de la presente invención.

Ejemplo 1

Encuesta, aislamiento y clasificación de hongos:

Varios lugares de Andhra Pradesh fueron inspeccionados para la recolección de partes infectadas de jacinto de agua (pecíolo y hojas). Las muestras fueron transportadas al laboratorio en bolsas de plástico limpias y almacenadas a 4°C hasta ser examinadas. Las partes de la planta almacenadas fueron lavadas con agua corriente para eliminar los residuos de la superficie, diseccionado en pequeños segmentos (aproximadamente 1 x 1 cm), y la superficie fue esterilizada por inmersión secuencial en etanol al 96% durante 30 segundos, hipoclorito al 14% durante 30 segundos y se enjuagaron en agua estéril por 1 min. Los segmentos de superficie esterilizada de pecíolos y hojas se colocaron en la placa de dextrosa y patata suplementado con 0,5 mg de estreptomicina. Las placas se incubaron durante 7 días a temperatura 25°C. Se obtuvieron los cultivos aislados y puros. La identificación de los diferentes géneros de hongos se basa en las características morfológicas de cada colonia microbiana en crecimiento. Los hongos que tienen características distintivas de saprófitos (es decir, rápido crecimiento y esporulación en placas PDA y aislados en los géneros *Penicillium*, *Aspergillus*, y *Trichoderma* fueron excluidos de la consideración adicional después de su aislamiento inicial. Se identificaron los aislados fúngicos necróticos retenidos. Los aislados fúngicos se almacenaron en el laboratorio. Los síntomas aparecieron inicialmente como pequeñas manchas necróticas y se desarrollaron en un tizón de la hoja que se extiende sobre la superficie de la hoja y el pecíolo. Los hongos que infectan (46 aislados de hongos filamentosos) fueron identificados como pertenecientes a 7 géneros conocidos (Tabla 7) sobre la base de sus características morfológicas y la disposición y estructura de sus conidios. Se encontró que el filtrado libre de células de un cultivo de 10 días del hongo candidato AGWH # 11 es igualmente activo como su suspensión de esporas en la

incitación a la necrosis del tejido de jacinto de agua. Esto indicaba que el hongo desarrolla metabolitos tóxicos en el caldo de cultivo que generalmente induce tal síndrome que resulta en la destrucción de los contenidos celulares y el colapso de las paredes celulares de jacinto de agua. La fitotoxina fue extraída de un filtrado de cultivo libre de células de AGWH # 11, que se cultiva en medio líquido. El filtrado libre de células se extrajo sucesivamente con disolvente hexano, acetato de etilo, cloroformo y metanol (Fig 1). Los compuestos fitotóxicos muestran más toxicidad en la fracción de cloroformo.

Tabla 1: Hongos recolectados de jacinto de agua

Patógenos	Síntomas	Número de acceso
<i>Setosphaeria monoceras</i> Total = 07	Mancha foliar	AGWH04 AGWH05 AGWH11 AGWH20 AGWH56 AGWH 58 AGWH61
<i>Alternariasp.</i> Total = 10	Mancha foliar	AGWH01 AGWH16 AGWH 59 AGWH60 AGWH69 AGWH70 AGWH 75 AGWH76 AGWH77 AGWH79

<i>Fusarium sp.</i> Total = 09	Mancha foliar	AGWH07 AGWH08 AGWH10 AGWH14 AGWH62 AGWH65 AGWH66 AGWH67 AGWH68
<i>Phoma sp.</i> Total = 05	Mancha foliar	AGWH02 AGWH03 AGWH06 AGWH63 AGWH64
<i>Curvularia sp.</i> Total = 03	Mancha foliar	AGWH12 AGWH15 AGWH18
<i>Pestalotiasp.</i> Total = 04	Mancha foliar	AGWH11 AGWH13 AGWH19 AGWH21=04
<i>Colletotrichumsp.</i> Total = 06	Mancha foliar	AGWH09 AGWH71 AGWH72 AGWH73

		AGWH74
		AGWH78

Ejemplo 2

Prueba de patogenicidad:

Durante los experimentos, el inóculo inicial de conidios fue tomado a partir de cultivos en placa de Petri en medio PDA, conservada a 4°C durante no más de 6 meses, y luego se sub-cultivaron a 25°C en medio de cultivo antes de su uso. Las plantas de jacinto de agua sanas fueron recogidas de las infestaciones naturales y se mantuvieron en el invernadero del laboratorio. En una detección preliminar, los patógenos fúngicos se probaron para determinar sus efectos sobre fragmentos de hojas cortadas de plantas de Jacinto de agua saludables. Cada fragmento se colocó en la superficie de una placa de petri que contiene papel de transferencia con agua. Las suspensiones de esporas (20 ml) se prepararon a partir de los aislados fúngicos (2 x 10 ml esporas con Tween 20), y se rociaron manualmente en un conjunto de fragmentos de hojas. Después de la inoculación, las placas de Petri se sellaron inmediatamente con papel Parafilm para evitar la pérdida de agua y se incubaron a 25 °C por un foto-período de 16- h durante 4 semanas.

Las plantas se clasificaron por síntomas de la enfermedad. El experimento se repitió tres veces. Fragmentos de hoja y plantas fueron clasificados por síntomas de la enfermedad incluyendo manchas foliares, lesiones en las hojas, y la muerte de la hoja, respectivamente. El impacto de los patógenos se determinó mediante la evaluación del tipo de daño (gravedad de la enfermedad, DS por sus siglas en inglés). La DS se determinó para cada hoja en una escala de 0 = sin efecto; 1 = hasta un 20% de área foliar necrótica; 2 = hasta que el 40% de área foliar necrótica; 3 = hasta 60% de área foliar necrótica; 4 = hasta un 80% de área foliar necrótica; 5 = hasta 100# de área foliar necrótica.

En la detección preliminar, los 44 aislados fúngicos se probaron in vitro en los fragmento de hoja de plantas de jacinto de agua. Todos los aislados fúngicos fueron capaces de infectar la planta y producir alguno síntoma de la enfermedad (Tabla 2). La enfermedad se inició como pequeñas manchas necróticas y se convirtió en un tizón de la hoja que tendía a extenderse sobre la hoja, sin embargo, sólo nueve patógenos produjeron síntomas más del 50% del área foliar

total al final del periodo de incubación de 4 semanas. Estos fueron: AGWH # 11 (*Setosphaeria monoceras*), AGWH20 (*Setosphaeria monoceras*), AGWH06 (*Phoma sp.*), AGWH15 (*Curvulariasp*), AGWH21 (*Pestalotia sp.*), AGWH 16 (*Alternaria sp.*), AGWH8 (*Fusarium sp.*) , AGWH10 (*Fusariumsp*), y AGWH9 (*Colletotrichum sp.*). Los valores de severidad de la enfermedad se calcularon durante el período de 4 semanas para los 46 aislamientos (Tabla 3). Los valores de DS al final del experimento para los nueve patógenos más perjudiciales fueron: 80-100% para *Setosphaeria monoceras* aislados AGWH11 y AGWH20 respectivamente, 60%-79% para *Alternaria sp.* aislados AGWH16, AGWH08, AGWH10 para aislados *Fusarium sp.*, AGWH06 para *Phoma sp.* AGWH09 para *Collectotrichum*, AGWH15 para *Curvularia* AGWH21 para *Pestalotia* respectivamente.

Tabla 2: Patogenicidad de los hongos recolectados de jacinto de agua (pruebas aplicadas a hojas desprendidas de jacinto de agua)

Patógenos	Síntomas	Número de acceso	Bioensayo de hojas desprendidas
<i>Setosphaeria monoceras</i> Total = 07	Mancha foliar	AGWH04	2
		AGWH05	2
		AGWH11	5
		AGWH20	4
		AGWH56	2
		AGWH 58	2
		AGWH61	2
<i>Alternariasp.</i> Total = 10	Mancha foliar	AGWH01	1
		AGWH16	3
		AGWH 59	2
		AGWH60	2
		AGWH69	2
		AGWH70	2

		AGWH 75	2
		AGWH76	2
		AGWH77	2
		AGWH79	2
<i>Fusarium sp.</i> Total = 09	Mancha foliar	AGWH07	2
		AGWH08	3
		AGWH10	4
		AGWH14	2
		AGWH62	2
		AGWH65	2
		AGWH66	2
		AGWH67	2
		AGWH68=09	2
<i>Phoma sp.</i> Total = 05	Mancha foliar	AGWH02	1
		AGWH03	1
		AGWH06	3
		AGWH63	2
		AGWH64=05	2
<i>Curvularia sp.</i> Total = 03	Mancha foliar	AGWH12	1
		AGWH15	4
		AGWH18=03	1
<i>Pestalotiasp.</i> Total = 04	Mancha foliar	AGWH11	2
		AGWH13	2
		AGWH19	1
		AGWH21=04	3

Colletotrichumsp. Total = 06	Mancha foliar	AGWH09	3
		AGWH71	2
		AGWH72	2
		AGWH73	2
		AGWH74	2
		AGWH78	2

Abreviatura clave para la clasificación de hojas desprendidas 0 = sin efecto; 1 = hasta un 20% de área foliar necrótica; 2 = hasta que el 40% de área foliar necrótica; 3 = hasta 60% de área foliar necrótica; 4 = hasta un 80% de área foliar necrótica; 5 = hasta 100# de área foliar necrótica. La cepa AGWH 06, 08, 09, 10, 11, 15, 16, 20 y 21 causaron más de 50% de LAD, fueron seleccionadas para el cribado secundario.

Ejemplo 3

Cribado secundario de cepa:

El segundo cribado se llevó a cabo usando los nueve aislados fúngicos que presentan la actividad herbicida más alta *in vitro*. Entre ellos, sólo los aislados AGWH # 11 (*Setosphaeria monoceras*) mostraron un DS de al menos 100% después de una incubación de 96 h (Tabla 3). El DS se varió de 40% a 47% para el aislado *Alternaria sp.* Aislados AGWH16, AGWH08, AGWH10 para aislados *Fusarium sp.*, AGWH06 para *Phoma sp.* AGWH09 para *Colletotrichum*, AGWH15 para *Curvularia* AGWH21.

Tabla 3: Cribado secundario de las cepas aisladas

NM	Aislados fúngicos	% gravedad de la enfermedad			
		24 hrs	48 hrs	72 hrs	96 hrs
1	AGWH06	1	2	2	2
2	AGWH 08	1	1	1	1

3	AGWH 09	1	2	2	2
4	AGWH 10	1	2	3	3
5	AGWH 11	1	3	5	5
6	AGWH15	1	2	2	2
7	AGWH16	1	2	2	3
8	AGWH20	1	2	2	2
9	AGWH21	1	2	3	3

Abreviatura clave para la clasificación de hojas desprendidas 0 = sin efecto; 1 = hasta un 20% de área foliar necrótico; 2 = hasta un 40% de área foliar necrótica; 3 = hasta 60% de área foliar necrótica; 4 = hasta un 80% de área foliar necrótica; 5 = hasta 100# de área foliar necrótica.

Los presentes resultados destacan a AGWH # 11 como un bioherbicida potencial para uso en el control de jacinto de agua.

Ejemplo 4

ENSAYOS DE ESPECIFICIDAD DEL HOSPEDANTE

También se probó la especificidad del hospedante de los hongos seleccionados en el invernadero. Las plantas no acuáticas fueron cultivadas en macetas llenas de tierra aséptica comercializada libre de cualquier hongo. El experimento se repitió tres veces. La inoculación de los ecotipos de jacinto de agua y las plantas de cultivo se llevó a cabo mediante el rocío de la suspensión que contenía 2×10^6 esporas/ml. Las plantas fueron monitoreadas para detectar síntomas de enfermedad. Esto nos llevó a probar los rangos de hospedante del aislado AGWH # 11. La tabla 4 y la figura 1 muestran los resultados obtenidos cuando la cepa fue entregada a cultivos de plantas y a la maleza. Cuatro semanas después de la aplicación de cualquiera de aislado, el jacinto de agua mostró lesiones en sus hojas, mientras que ninguna de las otras plantas mostró ningún signo de infección. En base a los resultados, no se espera que éstos aislados fúngicos afecten plantas económicamente importantes y por lo tanto se deben considerar como candidatos potenciales para el manejo de infecciones de jacinto de agua.

Tabla 4. Plantas utilizadas en la prueba de especificidad del hospedante de aislados AGWH#11 (+ significa muestra infección).

Plantas probadas	Fitotoxicidad
Chile	-
Tomate	-
Berenjena	-
Jacinto de agua	+
Césped	-

Ejemplo 5

CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS:

De acuerdo con el análisis morfológico, la cepa autóctona AGWH#11 (NCIM 1370) aislada de hoja de *Jacinto de agua* infectado es *Setosphaeria monoceras*. El AGWH # 11 (clasificación de la India como *Drechslerasp*) clasificó como *Setosphaeria monoceras* en Japón y Australia.

Características macroscópicas

Las colonias de *Setosphaeria monoceras*. crecen rápidamente, alcanzando un diámetro de 3 a 9 cm siguiendo incubación a 25°C du rante 7 días en agar de patata y dextrosa. La colonia se vuelve madura en 5 días. La textura es aterciopelada a lanosa. La superficie de la colonia es inicialmente de color blanco a marrón grisáceo y se vuelve de color verde oliva a negro con una periferia grisáceo elevada a medida que madura. El reverso también es de pigmentación oscura y color oliva a negro.

Características microscópicas

Las hifas son septadas y marrones. Los conidióforos son de color marrón, simples o ramificados, geniculadas y simpodiales, doblándose en los puntos en los que cada conidio surge. Esta propiedad conduce a la apariencia de zigzag del conidióforo. Los conidios, que también se llaman poroconidia, son 3 a 6 unicelulares, de forma fusiforme a cilíndrica, de color marrón claro a oscuro y tienen patrón de crecimiento geniculado simpodial.

Ejemplo 6

ANÁLISIS MOLECULAR

El presente estudio fue diseñado para proporcionar una posición taxonómica de la cepa aislada AGWH#11 a nivel de especie, mediante la comparación de secuencias de ADN.

Los espaciadores internos transcritos 1 y 2 [ITS-1 y 2] y Las regiones 5.8 S de la unidad de transcripción de ADN ribosomal nuclear [ADNr] se llevaron a cabo entre el aislado AGWH # 11 y las especies o aislados más cercanos de los que se disponía secuencias. La comparación del gen ITS rADN mostró que el aislado AGWH # 11 fue 99% idéntico a otras 2 cepas (Tabla 5). Con referencia al estudio, el aislado AGWH#11 mostró 96% de identidad con *Setosphaeria monoceras*. Similarmente, al gen ITSrADN, la secuencia del gen rADN 18S del aislado AGWH #11 mostró un 91% de identidad con 4 *Alternaria sp* diferentes. Similarmente, al gen ITSrADN, la secuencia del gen rADN 18S del aislado AGWH # 11 mostró un 93% de identidad con *Cochliobolus lunatus* y otro *Cochliobolus sp* que muestra 94% de similitud. Del mismo modo está mostrando identidad del 95% con *Bipolariseleucusines*.

Tabla 6: Comparaciones de las secuencias de ADN se realizaron entre el aislado AGWH # 11 sp.

Organismo	Acceso (s) del Banco de genes	% de identidad (pb)
<i>Setosphaeria monoceras</i>	DQ337380	96
<i>Bipolariseleusines</i>	DQ337382	95
<i>Pleosporaceaes</i> p	EF060604	99
<i>Pleosporaceaes</i> p	EF060407	99
<i>Cochlioboluslunatus</i>	DO337381	93
<i>Pleosporaceaes</i> p	EF060433	99
<i>Cochliobolus</i> sp.	FJ235087	94
<i>Alternariamultirostrata</i>	AM237287	91
<i>Alternariacichorii</i>	AM237286	91
<i>Alternariajesenskae</i>	AM237084	91
<i>Alternariapassiflorae</i>	AM237288	91

La comparación de secuencias de ADN y la descripción morfológica proporcionaron suficiente evidencia de *Setosphaeria monoceras*. El aislado AGWH # 11 pertenecía al género *Setosphaeria* y era lo suficientemente distinto de cualquier otro *Setosphaeria monoceras*ecies conocido. Un cultivo espécimen ha sido depositado en la NCIM bajo el número de acceso 1370 y 5974 MTCC depositado en IMTECH.

Ejemplo 7

Bioensayo del filtrado de cultivo libre de células AGWH # 11:

En la presente investigación, se encontró que el Género AGWH # 11 es fuerte en la incitación de la patogénesis de la planta. El filtrado del cultivo libre de células de AGWH#11 fue capaz de incitar el mismo síndrome como la suspensión de esporas. Se estudió el principio activo de CFCF por HPLC. El compuesto activo separado mostró necrosis de las hojas. Esta sustancia parece ser alguna promesa como un posible agente de control biológico para el jacinto de agua.

El método implica la inoculación de *Setosphaeria monoceras*, como un bioherbicida. *Setosphaeria* fue modificado en medio cultivo de agar de patata y sacarosa (PSB) a 28°C ± 1°C en matraces de un litro que contenía 250 ml de medio modificado. Los filtrados de cultivo se recogieron por paso sucesivo a través de papel de filtro Whatman No. 1. El filtrado del cultivo se puede combinar con un vehículo líquido, tal como aceite de parafina y tensioactivos no fitotóxicos tales como glicerol al 2%. Las hifas y/o conidios de los cultivos de *Setosphaeria monoceras* fueron eliminadas por tratamiento térmico y se mezclaron con benzoato de sodio 0,2% como microcida en el caldo de cultivo. La tasa de aplicación debe estar en el intervalo de aproximadamente 10 ml de la mezcla de producto en 1 litro de agua para la planta de jacinto de agua. El ataque de la bioherbicida en jacinto de agua se manifiesta por la aparición de lesiones marrones o áreas necróticas, seguido de marchitamiento y muerte de la planta. El resultado de esta prueba se representa en la Tabla 10.

Tabla 7: Desarrollo de síntomas en el jacinto de agua debido a la infección con AGWH # 11 durante 20 días

Días después de la infección	Descripción del síndrome
2	No hay síntomas apreciables
5	Manchas ampliadas de color amarillo
7	Manchas ampliadas de color amarillo intenso con márgenes de color marrón
10	Las zonas afectadas se vuelven necróticas y aparecen lesiones con manchas y o tizones foliares.
12 ^{avo}	El síndrome se extiende a los pecíolos y o estolones de la planta, algunas partes se secaron; defoliación parcial mientras que otras se secan.
20	Los individuos de maleza desaparecieron y los contenidos de casi todas las materas parecieron convertirse en un fluido de color marrón sucio u oscuro.

Ejemplo 8

Bioensayo con hojas desprendidas:

Se utilizaron hojas desprendidas de jacinto de agua para probar las actividades biológicas de filtrados libres de células, filtrado crudo y la toxina parcialmente purificada. Las hojas desprendidas se colocaron sobre papel filtro humedecido dentro de placas de Petri estériles de 9-cm de diámetro. Los inóculos de filtrados crudos, filtrados de células y filtrados libres de esporas, y la fitotoxina parcialmente purificada se aplicó a las hojas con micropipetas. Diez hojas se utilizaron para cada tratamiento. Las hojas de control recibieron agua destilada. Las placas se sellaron con papel parafilm y se incubaron a temperatura ambiente bajo condiciones de 12h de luz. Los efectos fitotóxicos en las hojas tratadas extirpados se evaluaron visualmente en busca de daños durante 5 días. El resultado de esta prueba se representa en la Tabla 3.

Tabla 8: Efectos de AGWH#11 en las hojas desprendidas de jacinto de agua

Fitotoxina	Concentración (µl/ml)	Fitotoxicidad
Filtrado libre de células	100	+
Filtrado crudo	10	+
Purificado por HPLC	0.2	+
Control	100	-

El daño fitotóxico se evaluó visualmente durante 5 días. - = Sin efectos fitotóxicos, + = efectos fitotóxicos.

Ejemplo 9

Bioensayo de metabolitos crudos de extractos de disolvente:

Se probaron hojas separadas del jacinto de agua con metabolitos de extracto del disolvente. Se detectaron compuestos fitotóxicos en la fracción de hexano y de acetato de etilo (Tabla 11). El cloroformo mostró el 100% de toxicidad.

Tabla 9: Bioensayo del compuesto extraído con disolvente de AGWH # 11

Artículos	Fitotoxicidad				
	Control	Extracto de metanol	Extracto de hexano	Extracto de cloroformo	Extracto de acetato de etilo
Hoja desprendida	0	+	++	++++	++

La actividad fitotóxica indexada fue en una escala

0 = 0 tratada con agua, sin lesión; + = 5% diam; ++ = 25%; +++ = 75% ++++ = 100%,

Muchos hongos patógenos de plantas necrotróficas que pertenecen a la clase de Dothideomycetes producen metabolitos fitotóxicos y péptidos que por lo general son necesarios para la patogenicidad. Las fitotoxinas que afectan a una amplia gama de especies de plantas son conocidas como toxinas no específicas del hospedante (non-HSTs por sus siglas en ingles), mientras que las HSTs afectan sólo a una especie particular de planta o más a menudo genotipos de esa especie. Para los patógenos que producen HSTs, la patogenicidad y la especificidad del hospedante están en gran medida definidas por la capacidad de producir la toxina, mientras que la susceptibilidad de las plantas depende de la presencia de la diana de la toxina. Las non-HSTs no son los principales determinantes de patogenicidad, pero contribuyen a la virulencia del patógeno producido. Los Dothideomycetes son notables para la producción de toxinas, particularmente HSTs porque son las únicas especies de hongos conocidos hasta ahora que los producen.

Ejemplo 10

Producción y purificación de fitotoxina y Cromatografía líquida de alta eficacia:

Se cultivó *Setosphaeria monoceras* a 280 °C ± 1°C en un matraz de un litro que contenía 250 ml de medio PSB modificado. El medio estéril se inoculó con 1 ml de una suspensión de esporas de hongo, se agitó suavemente, y se incubó como cultivos de pie durante 14 días. Los filtrados de cultivo se recogieron mediante el paso sucesivo a través de papel de filtro Whatman No. 1, y un filtro de membrana Sartorius (0,20 µm). El filtrado de cultivo que ha sido pasado a través del filtro de membrana de Sartorius. El filtrado de cultivo libre de células se extrajo con

cloroformo para obtener el extracto de solvente. Los filtrados estériles del extracto de cloroformo se almacenaron a 4°C dependiendo del ensayo o fraccionamiento. Se realizó Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) usando metanol: agua (gradiente 0-100% durante 30 minutos) como sistema disolvente en la columna de fase reversa C18. Un HPLC típico, perfil de elución de columna de fase reversa C18 de la toxina parcialmente purificada (Fig. 1).

La separación de diversos picos de metabolitos de AGWH # 11 y su caracterización química se caracterizan por el estudio de RMN y GC MS y se añadirá a los resultados.

Ejemplo 11

ESTUDIOS DE FORMULACIÓN:

La formulación se refiere al proceso de mezcla de metabolitos secundarios o microbios con vehículos inertes para alterar sus características físicas para mejorar su vida útil y el rendimiento en el campo. Formulación implica el uso de formulantes que incluyen: adyuvantes, surfactante, agentes humectantes, esparcidores y conservantes. El uso de formulantes para el control biológico es relativamente una aplicación tecnológica nueva que es bien conocida en la industria herbicida química. El adyuvante aumenta la eficacia de herbicidas de post emergencia mediante el aumento de la humectabilidad de la superficie objetivo, ya que reducen la tensión superficial. Se conocen también adyuvantes para mejorar la penetración. Con el fin de investigar la compatibilidad de la fitotoxina producida por el hongo de prueba, se probaron con diferentes formulantes. Por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue evaluar la compatibilidad de los diferentes formulantes como singletes y en combinaciones contra la maleza objetivo.

Para probar la compatibilidad de la toxina sintetizada por el patógeno se usaron siete agentes de formulación a saber, Tween-20, Tween -80, aceite de soja Ek Bond, aceite de mostaza, aceite de coco, aceite de cacahuete, glicerol. Se añadieron agentes de formulación @ 0,5% con respecto a la fitotoxina contenida CFCF con antimicrobiano 0,2% y la compatibilidad se determinó por bioensayo de toda la planta.

Con el fin de investigar la compatibilidad de las fitotoxinas producida por el hongo de prueba, se probaron diversos formulantes. Los datos representados en la Tabla 12, los estudios de daños fitotóxicos claramente muestran que el formulante más

compatible era aceite de parafina con conservante seguido de aceite de coco, Ek Bond, Tween-80, Tween-20 y glicerol. Teniendo como base los resultados obtenidos anteriormente, se puede concluir que los metabolitos secundarios de AGWH # 11 poseen un alto potencial herbicida con aceite de parafina y se pueden desarrollar como herbicidas potenciales para el manejo del jacinto de agua.

Tabla 10: Pruebas de compatibilidad de varias formulaciones de AGWH # 11 por bioensayo toda la planta

NM	adyuvante	Clasificación de la enfermedad fitotóxica de jacinto de Agua		
		3 días	5 días	10 días
1	Control a	0	0	0
2	Control b	0	0	0
3	Aceite de coco	2	2	2
4	Tween 20 + antimicrobiano	3	3	4
5	Aceite de parafina + antimicrobiano	4	5	5
6	Aceite de soja + antimicrobiano	2	2	2
7	Glicerol + antimicrobiano	2	2	2
8	Aceite de mostaza + antimicrobiano	2	2	2
9	EK bond + antimicrobiano	2	2	3
10	CFCF solo + antimicrobiano	2	2	2

Controlar a- medio de crecimiento no metabolizado Control b- agua destilada esterilizada; Cantidad de CFCF que contiene fitotoxina empleada = 10 mL / planta

Clasificación de la enfermedad de la planta (PDR, por sus siglas en inglés)

Hierba 1	60.5	51.5	42.5	41.5	29.5	22.5	19.5	18.0
Hierba 2	75.0	66.0	56.0	55.0	36.0	29.0	23.0	20.0
Hierba 3	60.0	50.0	49.0	47.0	33.0	26.0	21.0	17.0
Hierba 4	40.0	31.0	23.0	21.0	13.0	9.0	7.0	5.0
Hierba 5	100.0	90.0	87.0	82.0	60.0	42.0	40.0	31.0
Hierba 6	32.0	22.0	13.0	11.0	7.0	5.0	4.0	4.0

ESTUDIO DEL GENOMA COMPLETO

El ADN de *Setosphaeria monoceras* se extrajo por el protocolo Scigenom desarrollado y la biblioteca de secuenciación se preparó utilizando el kit de preparación de muestras de ADN de extremo emparejado de Illumina. La secuenciación se realizó utilizando un Analizador de Genoma Illumina. Lecturas menores de ensamblaje de novo usando piel y la calidad del ensamblado se mejoró mediante una tubería que incluía dos ensambladores alternos Edena y Minimus.

La cepa *Setosphaeria monoceras* AGWH#11 (NCIM 1370) fue secuenciada mediante un enfoque de secuencia bruta de todo el genoma utilizando el Analizador de Genoma Illumina. Se llevó a cabo el control de calidad Fastq, el ensamblaje de novo de estudio del genoma, la predicción de genes, la anotación ORF y la búsqueda Blastx.

El control de calidad Fastq y los resultados de filtrado se muestran en la Tabla 12

Tabla 12: Resumen de lectura en bruto

Muestra	AGWH 11
Número de lecturas del extremo emparejado	25,892,527
Número de bases (Gb)	5.17

GC%	52.83
Porcentaje de datos >=Q30	80

El control de calidad Fastq involucró la comprobación de parámetros de calidad de la secuencia obtenida del secuenciador. Se realizaron las distribuciones de puntuación de calidad de base, el contenido medio de base por lectura y la distribución de GC en las lecturas para un archivo Fastq de entrada. La distribución de puntuación de calidad de base, la calidad de los extremos izquierdo (R1) y derecho (R2) de la lectura del extremo emparejado de la muestra se muestra en las figuras 5, 6. El eje x representa el eje del ciclo de secuenciación y representa puntuaciones de calidad PHRED de las bases. Se observó que la calidad de base promedio estaba por encima de Q30 (probabilidad de error>= 0,001) para más de 80% de bases.

La distribución de la composición de base de extremo izquierdo y derecho de la lectura del extremo emparejado se muestra en las figuras 7 y 8. El eje x representa el ciclo de secuenciación y el eje y representa el porcentaje de nucleótidos. Hemos observado sesgo en la composición de base hacia el comienzo de las lecturas. El sesgo en la composición de secuencia se observa generalmente en los experimentos de NGS.

Se realizaron la distribución de GC de extremo izquierdo y derecho de la secuencia de lectura de extremo emparejado (Fig 9, 10). El eje x representa el contenido promedio de GC en la secuencia y el eje y representa el porcentaje total de lecturas. El contenido promedio de GC de las lecturas en la muestra seguía una distribución normal.

Los archivos Fastq fueron recortados antes de realizar el ensamblaje contigs de novo. Los científicos de Scigenom han recortado tres bases desde el principio y dos bases desde el extremo de las lecturas. El Resumen de las lecturas recortadas se proporcionan en la Tabla 13.

Tabla 13: Resumen de lectura recortada para muestras AGWH # 11

Muestra	AGWH#11
Número de lecturas del extremo emparejado	25,892,527
Número de bases (Gb)	4.92
Longitude leída	2x 95bp

Además, se filtraron las lecturas que estaban contenidas con el adaptador illumine. Kmer Genie se utilizó para predecir el valor de k óptimo y el tamaño del ensamblado. Los resultados KmerGenie se registran en la Tabla 14.

Tabla 14: Resultados KmerGenie

Muestra	AGWH#11
Mejor k predicho	63
Tamaño del ensamblado predicho	35, 117,793

Varios contigs ensamblados independientes se utilizan para integrar los contigs. Para AGWH # 11 el ensamblaje final tenía 150 contigs y el contig más largo fue de 1261505 pares de bases de longitud. Las estadísticas de ensamblaje se proporcionan en la Tabla 15.

Tabla 15: Estadísticas de ensamblaje para los contigs

Ensamblador	Min	Max	Promedio	N50	Contigs Totales	Suma de la longitud de todos los contigs
AS	198	1119830	23715.43	319829	1486	35241127
Edena	142	394286	45948.5	94664	746	34277582
SOAPdenovo	66	284116	3610.24	59318	9833	35499493
Velvet	125	191558	6111.9	42794	5745	35112848
MaSuRCa	300	227951	15356.7	5446	2295	35243629
CISA	3140	1261505	236557.7	510532	150	35483656

Para la predicción y anotación de genes, los ORFs predichos de los contigs para la muestra de hongos AGWH 11 utilizando el método de Augusto (Augustus method). En comparación con la predicción de genes para AGWH11, hemos utilizado datos formados a partir de Aspergillus nidulans y Neurospora crassa para predecir ORFs de forma independiente. Encontramos 13,950 ORFs únicos en la muestra AGWH # 11 de estas predicciones. Los ORFs predichos fueron anotados utilizando tubería de la casa Scigenom (CANoPIContig Annotator) para el ensamblaje de novo. Las etapas para la anotación de ORFs son la comparación

con la base de datos NCBI utilizando el programa BLASTX, anotación organismo, anotación de los genes y proteínas a los ORFs emparejados, anotación de ontología génica y la anotación de la vía.

Los ORFs predichos fueron comparados con la base de datos NCBI de proteína no redundante utilizando el programa BLASTX. Se conservaron emparejamientos con el valor $E \leq 1e-5$ y la puntuación de similitud $\geq 40\%$ para su posterior anotación. Se proporciona el resumen BLASTX en la Tabla 16. Para la muestra AGWH # 11 en general hemos encontrado que 13,602 (97,38%) de los ORFs predichos tienen al menos un hit en la base de datos NCBI.

Tabla 16: Resumen BLASTX y UniProt

Categorías	AGWH11
Número de ORFs	13,967
Número de ORFs con emparejamiento BLASTX significativo	13,400
Número de ORFs con anotación UniProt	13,380

La distribución del valor E de búsqueda BLASTX se proporciona en la figura 11. Alrededor de 91% de los ORFs encontrados utilizando BLASTX para la muestra tenían un nivel de confianza de al menos $1e-50$, lo que indica la conservación de alto valor proteico. 91% de los ORFs predichos encontrados utilizando BLASTX tenían similitud de más de 60% a nivel proteico con la proteína existente en la base de datos NCBI en la Muestra AGWH # 11.

Para la anotación del organismo el mejor hit del BLASTX de cada ORF fue estudiado y se extrajo el nombre del organismo. En la figura 12 se muestran los 15 organismos principales encontrados en la anotación.

La mayoría de los mejores hits de BLASTX pertenecen a *Setosphaeria Turica* para esta muestra.

Para el gen y proteína de anotación, la proteína predicha a partir de BLASTX fue anotado contra NCBI, vía UniProt y otras bases de datos. Entre el total de ORF hits de BLASTX, 13,380 ORFs fueron anotados utilizando la base de datos

UniProt. Se proporcionaron para los hits de BLASTX restantes, las anotaciones de proteína predicha por NCBI (Tabla 17).

Tabla 17: Estado de la anotación

Muestra	AGWH11
Número de ORFs con hits de BLASTX no significativos	365
Número de ORFs con hits de BLASTX significativos pero sin información de UniProt	20
Número de ORFs con hits de BLASTX significativos e información de UniProt	13,380

Cuando era posible, se extrajeron los términos de ontología de genes para los ORF. Se proporcionan en la Tabla 18 los términos diferentes de ontología de genes de número total identificados en procesos biológicos de función molecular y la categoría de componente celular.

Tabla 18: Términos de ontología génica identificados en cada categoría

Categoría	No de términos
Procesos bilógicos	643
Funciones moleculares	849
Componentes celulares	234

Los primeros 13 términos de cada categoría se mencionan en las figuras 13-15 con tres diferentes términos a saber: procesos biológicos, funciones moleculares y componentes celulares. El organismo AGWH#11, el número total de ontología génica han sido estudiados en diferentes categorías, respectivamente, que están mostrando 643 en procesos biológicos, 849 en funciones moleculares y 234 en componentes celulares.

Aunque la descripción anterior de la presente invención se ha mostrado y descrito con referencia a realizaciones y aplicaciones particulares de los mismos, se ha presentado con fines de ilustración y descripción y no pretende ser exhaustiva o limitar la invención a las realizaciones y aplicaciones particulares que se dan a conocer. Será evidente para los aquellos expertos en la técnica que varios

cambios, modificaciones, variaciones, o alteraciones de la invención como se describe en el presente documento puede realizarse, en términos de la dosificación, dilución, aplicación y diferentes formas de uso, ninguno de los cuales se aparta del espíritu o alcance de la presente invención. Las realizaciones y aplicaciones particulares se eligieron y describieron para proporcionar la mejor ilustración de los principios de la invención y su aplicación práctica para permitir de este modo que un experto en la técnica utilice la invención en varias realizaciones y con varias modificaciones que sean adecuadas para uso particular contemplado. Por consiguiente, todos estos cambios, modificaciones, variaciones y alteraciones deben considerarse como dentro del alcance de la presente invención según lo determinado por las reivindicaciones adjuntas cuando se interpretan de acuerdo con la amplitud a la que son justa, legal y equitativamente tituladas.