

**COMPOSICIONES DE *BACILLUS THURINGIENSIS* RTI545 Y MÉTODOS PARA
USAR PARA BENEFICIAR EL CRECIMIENTO DE PLANTAS Y EL CONTROL DE
PLAGAS DE PLANTAS**

REFERENCIA CRUZADA CON SOLICITUD RELACIONADA

Esta solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisoria de los Estados Unidos número 62/404.275, presentada el 5 de octubre de 2016, cuya divulgación se incorpora de este modo en la presente por referencia en su totalidad.

CAMPO TÉCNICO

El objeto divulgado en la presente se refiere a composiciones que comprenden una cepa bacteriana aislada de *Bacillus thuringiensis* para aplicar a semillas y raíces de plantas y al suelo que rodea las plantas para beneficiar el crecimiento de plantas y controlar las plagas de plantas.

ANTECEDENTES

Es sabido que en el suelo se hallan presentes varios microorganismos que tienen efectos beneficiosos sobre el crecimiento y salud de las plantas, viven en asociación con plantas específicamente en la zona de las raíces (bacterias asociadas con rizosferas) o residen como endófitos dentro de la planta. Las propiedades beneficiosas promotoras del crecimiento de las plantas comprenden la fijación del nitrógeno, quelación del hierro, solubilización de los fosfatos, inhibición de los microorganismos no beneficiosos, resistencia o exclusión de plagas, ISR (Induced

Systemic Resistance, Resistencia Sistémica inducida), SAR (Systemic Acquired Resistance, Resistencia Sistémica Adquirida), descomposición del material de la planta en el suelo de manera de incrementar el material orgánico útil del suelo, y la síntesis de fitohormonas tales como el IAA (ácido indolacético) y el 2,3-butanodiol que estimula el crecimiento de las plantas, su desarrollo y sus respuestas a los estreses ambientales tales como la sequía. Además, estos microorganismos pueden interferir en la respuesta del estrés de etileno de una planta, por el hecho de descomponer la molécula precursora, el 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC), con lo que se estimula el crecimiento de la planta y se ralentiza la maduración de sus frutos. Estos microorganismos beneficiosos pueden mejorar la calidad del suelo, el crecimiento de las plantas, su rendimiento, y la calidad de las cosechas. Varios microorganismos presentan una actividad biológica que los hace útiles en el control de las enfermedades de las plantas. Dichos bioplaguicidas (organismos vivos y los compuestos naturalmente producidos por estos organismos) se consideran en general más seguros y más biodegradables que los fertilizantes y plaguicidas sintéticos.

Por ejemplo, es sabido que las bacterias beneficiosas asociadas a las plantas, tanto rizosféricas como endófitas, proveen una multitud de beneficios a las plantas huésped que abarcan desde una resistencia a las enfermedades y a las plagas de insectos como también una tolerancia al estrés ambiental que incluyen el estrés por frío, salinidad y sequía. Dado que las plantas con bacterias inoculadas promotoras del crecimiento de las plantas incorporan más agua y nutrientes de los suelos, por ejemplo, debido a un sistema radicular mejor desarrollado, las plantas crecen de una manera más saludable y son menos sensibles a los estreses bióticos y abióticos. Como tales, las composiciones microbianas de la presente invención pueden

aplicarse solas o en combinación con los materiales actualmente utilizados en la administración de los cultivos tales como los fertilizantes herbicidas y plaguicidas químicos, para maximizar la productividad de las plantas de cultivo. Los efectos promotores del crecimiento de las plantas pueden traducirse en plantas de un crecimiento más rápido y en un incremento por arriba de la biomasa básica, propiedad ésta que puede aplicarse para mejorar el vigor temprano. Uno de los beneficios de un mejor vigor temprano es que las plantas son más competitivas y compiten con éxito contra las malezas, superándolas, lo que de manera directa reduce los costos para la administración de las malezas por el hecho de minimizar la mano de obra y la aplicación de herbicidas. Los efectos promotores del crecimiento de las plantas también pueden traducirse en un desarrollo de las raíces, lo que incluye raíces más profundas y más anchas con raíces más finas que intervienen en la incorporación de agua y nutrientes. Esta propiedad permite una mejor utilización de los recursos agrícolas, y una reducción en el agua utilizada para satisfacer las necesidades de irrigación y/o la aplicación de fertilizantes. Los cambios en el desarrollo de las raíces, y en la arquitectura de las raíces, influyen sobre las interacciones de la planta con otros microorganismos transportados por el suelo, lo que incluye hongos y bacterias beneficiosos que ayudan a la planta a incorporar nutrientes, lo que incluye la fijación del nitrógeno y la solubilización de los fosfatos. Estos microbios beneficiosos también compiten contra los agentes patógenos de las plantas, de manera de incrementar la salud general de las plantas y de disminuir la necesidad de fungicidas y pesticidas químicos. Un sistema de raíces más desarrolladas también permite mayores rendimientos cuando están presentes las plagas.

Los agentes fitopatógenos fúngicos, que incluyen sin limitación *Botrytis* spp. (por ejemplo, *Botrytis cinerea*), *Fusarium* spp. (por ejemplo, *F. oxysporum* y *F.*

graminearum), *Rhizoctonia* spp. (por ejemplo, *R. solani*), *Magnaporthe* spp., *Mycosphaerella* spp., *Puccinia* spp. (por ejemplo, *P. recondita*), *Phytophthora* spp. y *Phakopsora* spp. (por ejemplo, *P. pachyrhizi*), son un tipo de plagas de plantas que pueden ocasionar severas pérdidas económicas en las actividades agrícolas y hortícolas. Pueden utilizarse agentes químicos para controlar los agentes fitopatógenos fúngicos, pero la utilización de agentes químicos adolece de desventajas tales como su elevado costo, emergencia de cepas resistentes de plagas, e impactos ambientales potencialmente indeseables. Además, dichos tratamientos químicos pueden influir de manera adversa sobre las bacterias, hongos, y artrópodos beneficiosos, además de la plaga de la planta contra la cual están orientados los tratamientos. Un segundo tipo de plagas de las plantas son los agentes bacterianos, que incluyen sin limitación: *Erwinia* spp. (tal como *Erwinia chrysanthemi*), *Pantoea* spp. (tal como *P. citrea*), *Xanthomonas* (por ejemplo, *Xanthomonas campestris*), *Pseudomonas* spp. (tal como *P. syringae*) y *Ralstonia* spp. (tal como *R. solanacearum*) que son causa de severas pérdidas económicas en las actividades agrícolas y hortícolas. De manera similar a los hongos fitopatógenos, la utilización de agentes químicos para tratar estos agentes patógenos bacterianos adolece de desventajas. Los virus y los organismos similares al virus comprenden un tercer tipo de agentes causantes de enfermedades de las plantas difíciles de controlar, pero frente a los que los microorganismos bacterianos pueden proveer una resistencia en las plantas por medio de ISR (induced systemic resistance, resistencia sistémica inducida). Por lo tanto, los microorganismos que pueden aplicarse como biofertilizantes y/o bioplaguicidas para controlar los hongos, virus y bacterias patógenos son deseables y son objeto de una fuerte demanda para mejorar la sustentabilidad agrícola. Un tipo final de agente patógeno en las plantas incluye los nematodos e insectos causantes

de enfermedades en las plantas, y que pueden ser causa de severos daños en las plantas y ocasionar su pérdida y reducciones en el rendimiento.

Determinados miembros de la especie *Bacillus* han sido catalogados como cepas aptas para control biológico, y algunos de ellos han sido aplicados en productos comerciales (Joseph W. Kloepper, *et al.*, 2004, *Phytopathology* Vol. 94, N.º 11, 1259–1266). Por ejemplo, las cepas actualmente utilizadas en productos comerciales para el control biológico incluyen: *Bacillus pumilus* cepa QST2808, utilizado como ingrediente activo en SONATA y BALLAD–PLUS, producidos por BAYER CROP SCIENCE; *Bacillus pumilus* cepa GB34, utilizado como ingrediente activo en YIELDSHIELD, producido por BAYER CROP SCIENCE; *Bacillus subtilis* cepa QST713, utilizado como el ingrediente activo de SERENADE, producido por BAYER CROP SCIENCE; *Bacillus subtilis* cepa GBO3, utilizado como el ingrediente activo en KODIAK y SYSTEM3, producido por HELENA CHEMICAL COMPANY. Diversas cepas de *Bacillus thuringiensis* y de *Bacillus firmus* han sido utilizadas como agentes de control biológico contra nematodos e insectos, y estas cepas sirven como la base de numerosos productos de control biológico disponibles en el comercio, lo que incluye DIPEL que comprende *Bacillus thuringiensis* subsp. cepa *kurstaki*, producido por VALENT BIOSCIENCES CORPORATION y NORTICA y PONCHO–VOTIVO que comprende una cepa de *B. firmus*, producido por BAYER CROP SCIENCE. Además, las cepas de *Bacillus* actualmente utilizadas en los productos bioestimulantes comerciales incluyen: *Bacillus subtilis* var. *amyloliquefaciens* cepa FZB42 utilizado como el ingrediente activo en RHIZOVITAL 42, producido por ABiTEP GmbH, como también diversas otras especies de *Bacillus subtilis* que están incluidas como células enteras, inclusive su extracto de fermentación en productos bioestimulantes, tales como FULZYME producido por JHBiotech Inc.

Sin embargo, es deseable desarrollar nuevas composiciones y métodos para beneficiar el crecimiento de las plantas y controlar las plagas de plantas.

SÍNTESIS

El tema objeto divulgado en la presente proporciona composiciones microbianas y métodos para su utilización para beneficiar el crecimiento de las plantas y controlar las plagas de plantas.

En una forma de realización, se proporciona una composición que comprende un cultivo biológicamente puro de *Bacillus thuringiensis* RTI545 depositado como ATCC N.º PTA-122161 o una mutante de éste que tiene todas las características identificatorias de éste, para la aplicación a una planta para uno o ambos de beneficiar el crecimiento de la planta o conferir protección contra una plaga de planta en una planta susceptible.

En una forma de realización, se proporciona un método para uno o varios de beneficiar el crecimiento de una planta o conferir protección contra una plaga de planta en una planta susceptible, que comprende suministrar una composición que comprende un cultivo biológicamente puro de RTI545 de *Bacillus thuringiensis* depositado como ATCC N.º PTA-122161 o uno de sus mutantes que tiene todas sus características de identificación a una planta, parte de planta, semilla de la planta, raíces de la planta, suelo o medio de cultivo que rodea la planta o las semillas de la planta o el suelo o el medio de cultivo antes de plantar la planta o sembrar la semilla de la planta, en una cantidad apropiada para beneficiar el crecimiento de la planta y/o conferir protección contra la plaga de la planta en la planta susceptible.

En una forma de realización, se proporciona un método para uno o ambos de beneficiar el crecimiento de una planta o conferir protección contra una plaga de planta en una planta susceptible, que comprende: suministrar a la planta, parte de planta, semilla de la planta, raíces de la planta, suelo o medio de crecimiento que rodea la planta o la semilla de la planta o suelo o medio de cultivo antes de plantar la planta o sembrar una semilla de la planta, una combinación de: una composición que comprende un cultivo biológicamente puro de *Bacillus thuringiensis* RTI545 depositado por ATCC N.º PTA-122161 o uno de sus mutantes que tiene todas sus características de identificación en una cantidad apropiada para beneficiar el crecimiento de la planta y/o conferir protección contra la plaga de la planta en la planta susceptible; y uno o una combinación de un insecticida, un fungicida, nematocida, bactericida, bioestimulante, herbicida, extracto de planta, extracto microbiano, regulador del crecimiento de planta o fertilizante, en una cantidad apropiada para beneficiar el crecimiento de la planta y/o conferir protección contra la plaga de planta en la planta susceptible. Cada uno de estos agentes adicionales puede ser un agente biológico o un agente químico.

En una forma de realización, se proporciona una semilla de planta recubierta con una composición que comprende esporos de un cultivo biológicamente puro de *Bacillus thuringiensis* RTI545 depositado como ATCC N.º PTA-122161 o una mutante de éste que tiene todas las características identificatorias de éste, presente en una cantidad adecuada para beneficiar el crecimiento de las plantas y/o para conferir protección contra una plaga de planta en un agente susceptible.

En una forma de realización, se proporciona un método para uno o ambos de beneficiar el crecimiento de una planta o conferir protección contra una plaga de plantas en una planta susceptible, que comprende plantar una semilla de la planta,

en donde la semilla se recubrió con una composición que comprende un cultivo biológicamente puro de *Bacillus thuringiensis* RTI545 depositado como ATCC PTA–122161 o su mutante que tiene todas sus características de identificación, en donde el crecimiento de la planta se beneficia de la semilla y/o se confiere protección contra la plaga de la planta.

En una forma de realización, se proporciona una composición para beneficiar el crecimiento de la planta, que comprende: un cultivo biológicamente puro de *Bacillus thuringiensis* RTI545 depositado como ATCC N.º PTA–122161 o su mutante que tiene todas sus características de identificación; y un insecticida bifentrina.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Habiendo descrito de este modo el tema descrito en la presente en términos generales en términos generales, se hará ahora referencia a las figuras acompañantes que se describen a continuación.

La **FIG. 1A** es un diagrama esquemático que muestra más a la izquierda una semilla de planta (círculo interno) recubierta con un insecticida químico (banda oscura que rodea el círculo interno) con plagas de insectos vegetales en la rizosfera de la planta representada por marcas horizontales. La porción media del diagrama muestra la semilla de planta germinada con insecticida difuso que protege las raíces de la semilla de planta de las plagas de insectos (protección representada por las marcas "X"). Más a la derecha del diagrama muestra una protección disminuida de las raíces de la semilla de la planta de las plagas de insectos ya que las raíces crecen más allá de la zona de difusión del insecticida químico.

La **FIG. 1B** muestra el diagrama esquemático de la FIG. 1A con la adición de *Bacillus thuringiensis* RTI545 al recubrimiento en la semilla de la planta o al suelo que rodea la semilla de la planta de acuerdo con una o más formas de realización de la presente descripción. Más a la derecha del diagrama del diagrama muestra la protección continua de las raíces de la semilla de la planta de las plagas de insectos, incluso cuando las raíces crecen más allá de la zona de difusión del insecticida químico como resultado del establecimiento de *Bacillus thuringiensis* RTI545 en la rizosfera de la planta.

La **FIG.2** es un dibujo esquemático que muestra la filogenia de la cepa RTI545 usando el gen constitutivo *rpoB* de acuerdo con una o más formas de realización de la presente descripción. Los valores de remuestreo (bootstrap) indican replicados de 1000. Las secuencias del grupo externo son de las arqueas hipertermófilas *Pyrococcus furiosus* DSM3638.

La **FIG. 3A** es una imagen de plántulas de maíz tomadas 12 días desde la siembra de semilla tratada con células vegetativas de la cepa RTI545 de *Bacillus thuringiensis* en la plantación mediante riego planta por planta de acuerdo con una o más formas de realización de la presente descripción.

La **FIG. 3B** es una imagen de plántulas de maíz tomadas 12 días desde la plantación de semilla tratada de forma similar a la de la FIG. 3A pero sin la adición de las células RTI545 de *Bacillus thuringiensis*.

La **FIG. 4** es una imagen que muestra la capacidad de las células RTI545 de *Bacillus thuringiensis* para repeler larvas del gusano de la raíz del maíz del Sur (SCRW) en un ensayo de alimentación de elección de plántulas de maíz de acuerdo con una o más formas de realización de la presente descripción. En la imagen, el

papel de filtro a la izquierda se trató con células RTI545 de *Bacillus thuringiensis* y el papel de filtro a la derecha se trató con agua como control.

La **FIG. 5** es un gráfico que muestra el número de quistes por gramo de biomasa de raíces de plantas de papa plantadas en suelo naturalmente infectado con nematodos de *Globodera sp.* (RTI545) y potenciado con 10^9 UFC de esporas por litro de células de RTI545 *Bacillus thuringiensis* (RTI545) en suelo en comparación con los tratamientos de control y suelo: Vydate (DUPONT; A.I. = Oxamilo [Metoil N'N'-dimetil-N-[(metil carbamoil)oxil]oxi]-1-tiooxamimidato), BIOACT (BAYER CROPS SCIENCES LP; *Paecilomyces lilacinus* cepa 251), CAREX (NUFARM, piridabeno), Y HD-1 (*Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1) de acuerdo con una o más formas de realización de la presente descripción.

La **Fig. 6A** muestra un dibujo plano esquemático de un campo de prueba de quimiotaxis para ensayar la atracción/repelencia de muestras de prueba a nematodos. La **Fig. 6B** es una fotografía de un ensayo de kanosamina analizado a 100 µg/ml, donde los puntos que representan las ubicaciones de los nematodos indican distribución neutra. La **Fig. 6C** es una fotografía de un ensayo de sobrenadante RTI545 analizado a 100% de concentración, donde los puntos que representan posiciones de nematodos indican la distribución del repelente.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

A lo largo de esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones, las expresiones “comprende”, “comprenden” y “que comprende(n)”, se utilizan en un sentido no excluyente, a menos que el contexto claramente se requiera otra cosa. De manera similar, el término “incluyen” y sus variantes gramaticales tienen por objeto

no ser limitantes, de manera tal que la mención de los ítems en una lista no tiene la finalidad de excluir otros ítems similares que pueden actuar como sustitutos o ser añadidos a los ítems incluidos en la lista.

A los fines de esta memoria descriptiva y de las reivindicaciones anexas, debe entenderse que el término “aproximadamente”, cuando se lo utiliza en conexión con uno o más intervalos numéricos, se refiere a la totalidad de todos aquellos números, lo que incluye todo los números en un intervalo y modifica dicho intervalo por el hecho de extender los límites por arriba y por debajo de los valores numéricos establecidos. La mención de intervalos numéricos por medio de sus puntos extremos incluye la totalidad de los números, por ejemplo, números enteros, lo que incluye sus fracciones, subsumados dentro de dicho intervalo (por ejemplo, la mención de 1 a 5 incluye 1, 2, 3, 4, y 5, como también sus fracciones, por ejemplo, 1,5, 2,25, 3,75, 4,1 y similares) y cualquier intervalo dentro de dicho intervalo. Cuando se menciona un rango como de una lista de límites inferiores a una lista de límites superiores, los rangos se definen como cualquiera de los límites inferiores mencionados a cualquiera de los límites superiores mencionados.

Las marcas registradas se indican en la presente en mayúscula.

Como se usa en la presente a los fines de esta memoria descriptiva y reivindicaciones, en una forma de realización, la frase “un cultivo biológicamente puro de *Bacillus thuringiensis* RT1545” se refiere a uno o una combinación de: esporas de un cultivo de fermentación biológicamente puro de la cepa bacteriana, células vegetativas de un cultivo de fermentación biológicamente puro de la cepa bacteriana, uno o varios productos de un cultivo de fermentación biológicamente puro de la cepa bacteriana, un sólido de cultivo de un cultivo de fermentación biológicamente puro de

la cepa bacteriana, un sobrenadante de cultivo de un cultivo de fermentación biológicamente puro de la cepa bacteriana y un extracto libre de células de un cultivo de fermentación biológicamente puro de la cepa bacteriana.

En otra forma de realización, la frase “un cultivo biológicamente puro de *Bacillus thuringiensis* RTI545” se refiere a uno o una combinación de: esporas de un cultivo de fermentación biológicamente puro de la cepa bacteriana, células vegetativas de un cultivo de fermentación biológicamente puro de la cepa bacteriana, uno o varios productos de un cultivo de fermentación biológicamente puro de la cepa bacteriana y un sólido de cultivo de un cultivo de fermentación biológicamente puro de la cepa bacteriana. En una variante de esta forma de realización, la frase se puede referir a las esporas de un cultivo de fermentación biológicamente puro de la cepa bacteriana.

En otra forma de realización más, la frase “un cultivo biológicamente puro de *Bacillus thuringiensis* RTI545” se refiere a uno o una combinación de: un sobrenadante de cultivo de un cultivo de fermentación biológicamente puro de la cepa bacteriana y un extracto libre de células de un cultivo de fermentación biológicamente puro de la cepa bacteriana.

Notablemente, el “cultivo biológicamente puro de *Bacillus thuringiensis* RTI545” puede estar en la forma de esporas, células vegetativas o extractos libres de células del cultivo biológicamente puro.

Como se usa en la presente a los fines de esta memoria descriptiva y reivindicaciones, la frase “una plaga de planta” se refiere a cualquier plaga que es nociva y/o patogénica para una planta, incluyendo, sin limitación, una plaga de plantas tal como un insecto, un parásito, un nematodo, un hongo, una bacteria o un virus.

Una nueva bacteria asociada con una planta aislada del suelo de festuco se proporciona en la presente y se menciona como "RTI545". La cepa se identificó como una cepa de *Bacillus thuringiensis* a base de un análisis de secuencia, a pesar de que la cepa carece de los genes de proteínas cristalinas a menudo hallados en las cepas de *B. thuringiensis*. Inesperadamente, la cepa de RTI545 demuestra una fuerte actividad repelente de insectos, pero falla al matar a las larvas de insectos en el contacto directo y ensayos de elección de alimentación. Las composiciones y los métodos se proporcionan en la presente, que incluyen un cultivo biológicamente puro de la cepa RTI545 de *Bacillus thuringiensis* para el suministro a una planta, parte de planta, semilla de planta, raíces de planta o suelo para beneficiar el crecimiento de la planta y conferir la protección contra plagas de plantas. Los beneficios de crecimiento y la protección conferida incluyen un mayor vigor de las plántulas, un mejor desarrollo de las raíces, un mejor crecimiento de las plantas, mejor salud de la planta, mayor rendimiento, mejor aspecto, mejor resistencia a las plagas de la planta, infección patogénica reducida, o una combinación de estos.

El suministro de la composición a la planta o parte de planta incluye el suministro a cualquier porción de la planta, incluyendo las porciones aéreas, tales como partes foliares y partes de plantas para propagar la planta tales como plántulas, trasplantes, cortes (por ejemplo, tallos, raíces, hojas y similares), rizomas, esporas, setos (por ejemplo, de caña de azúcar), bulbos, cormos, tubérculos o sus porciones u otro tejido de planta del que se puede obtener una planta completa. El suministro al suelo o al medio de cultivo que rodea a la planta o la semilla de la planta o suelo o medio de cultivo antes de plantar la planta o sembrar la semilla de la planta incluye aplicaciones en surco de la composición al momento de la plantación, incluye la incorporación o mezcla de la composición con el suelo o medio de cultivo, aplicación

de la composición a la superficie del suelo o medio de cultivo como por inundación del suelo, y similares.

En una forma de realización, la cepa RTI545 de *Bacillus thuringiensis* se suministra a la planta, parte de planta, semilla de planta, raíces de planta o suelo en combinación con un insecticida químico para extender el control del insecticida químico por establecimiento de la cepa RTI545 en la rizosfera de la planta. Un mecanismo propuesto de este control de insectos por la cepa RTI545 se ilustra en la FIG. 1. La FIG. 1A muestra el control de insectos por revestimiento de una semilla con un insecticida químico solo (es decir, sin RTI545). Una semilla de planta (círculo interno) recubierto con un insecticida (banda oscura que rodea el círculo interno) se muestra en el extremo izquierdo del diagrama de la FIG. 1A, que está rodeado por plagas de insectos de plantas en la rizosfera de la planta representadas por marcas horizontales. La porción media del diagrama muestra la semilla de planta germinada con insecticida difundido que protege a las raíces de la semilla de la planta de las plagas de insectos (protección representada por las marcas "X"). El extremo derecho del diagrama muestra una menor protección de las raíces de la semilla de planta de las plagas de insectos cuando las raíces crecen más allá de la zona de difusión del insecticida químico. El diagrama en la FIG. 1B ilustra un mecanismo propuesto de cómo la adición de esporas RTI545 de *Bacillus thuringiensis* al recubrimiento sobre la semilla de la planta o como una aplicación en surco mejora el control de insectos respecto del uso del revestimiento insecticida solo. Específicamente, el lado del extremo derecho del diagrama de la FIG. 1B muestra una protección continua de las raíces de la semilla de planta de las plagas de insectos incluso cuando las raíces crecen más allá de la zona de difusión del insecticida química como resultado del establecimiento de *Bacillus thuringiensis* RTI545 en la rizosfera de la planta. En un

ejemplo, las semillas recubiertas con células de RTI545 o tratadas de otro modo con RTI545 se plantan en combinación con el insecticida químico, bifentrina y aplicación de un fertilizante líquido para beneficiar el crecimiento de la planta y controlar las plagas de insectos.

El aislamiento y la caracterización de la cepa RTI545 se describe más específicamente en los ejemplos proporcionados en la presente. El ejemplo 1 describe la comparación de las secuencias del rADN 16S (SEQ ID NO.: 1) y genes *rpoB* (SEQ ID NO.: 2) de la cepa RTI545 con otras de las cepas bacterianas conocidas en las bases de datos NCBI y RDP usando BLAST. Este análisis ubicó la cepa RTI545 dentro del clado de *Bacillus cereus/thuringiensis anthracis*. Otro análisis filogenético de la cepa RTI545 y especies relevantes de *Bacillus* se realizó usando árboles de consenso Bootstrap (1000 replicados) en el gen *rpoB*. El árbol de consenso para el gen *rpoB* se muestra en la Figura 2. Como se puede en la Figura 2, la cepa RTI545 forma una rama separada en el clado de *Bacillus cereus/thuringiensis anthracis* indicando que RTI545 es una nueva cepa que entra dentro del clado de *Bacillus cereus/thuringiensis anthracis*. El análisis de secuencia adicional reveló que la cepa RTI545 carece de genes para las proteínas cristalinas a menudo halladas en cepas de *B. thuringiensis*.

Además, se llevó a cabo un análisis de secuencia genómica para comparar la cepa de RTI545 con cepas íntimamente relacionadas de las especies de *Bacillus* usando tanto análisis de Average Nucleotide Identity (ANI) y UNIPePT a base de MUMmer y BLASTn para confirmar su clasificación filogenética. Los resultados de los cálculos de ANI a base de MUMmer y BLASTn se muestran en la Tabla I siguiente. Tanto los análisis de ANI como de UNIPePT (datos no mostrados) revelaron un grado de similitud de secuencia significativo entre RTI545 y secuencias publicadas de cepas

indicadas tanto como *B. cereus* como *B. thuringiensis*. La más alta similitud de secuencia con una cepa de tipo reconocido es con la cepa de tipo reconocido Berliner ATCC10792 de *B. thuringiensis*. Nuevamente las diferencias en la secuencia genómica completa de aquella previamente publicada indican que RTI545 es una nueva cepa de *Bacillus thuringiensis* que entra dentro del clado de *Bacillus cereus/thuringiensis/anthracis*.

En base a los análisis de secuencias anteriores, la cepa RTI545 se identificó como una nueva cepa y se menciona en la presente como una cepa de *Bacillus thuringiensis*.

La cepa de RTI545 fue depositada el 12 de mayo de 2015 bajo los términos del Tratado de Budapest en el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos para los Propósitos del Procedimiento de Patentes en la American Type Culture Collection (ATCC) en Manassas, Virginia, EE.UU. y lleva el N.º de acceso de patente PTA-122161.

Los resultados experimentales que demuestran el crecimiento que promueve las actividades de control antimicrobiano y de insectos y nematodos y hongos de la cepa RTI545 de *Bacillus thuringiensis* en varias plantas y en diversas condiciones que incluyen estudios *in vitro*, en invernadero y en campo se proporcionan en las Figuras 3-5 y en los ejemplos 2-17 en la presente. Específicamente, la cepa RTI545 de *Bacillus thuringiensis* muestra que se beneficia el crecimiento de la planta y confiere control contra plagas de plantas que incluyen gusanos de la raíz tales como gusano de la raíz de maíz sureño (SCRW), gusanos de alambre tales como gusanos de alambre del trigo y gusanos de alambre del trigo, plagas complejas de plagas blancas, gusanos de la tierra tales como gusanos de semillas de maíz y gusanos de las

semillas, chinches de plantas tales como chinche occidental (WPB), nematodos y patógenos fúngicos tales como *Rhizoctonia* spp. En algunos casos, el tratamiento de semillas con la cepa RTI545 de *Bacillus thuringiensis* proporcionaba resultados equivalentes o superiores en comparación con los productos asequibles en comercios a base de una combinación de agentes activos biológicos y químicos o agentes activos químicos solos.

Las propiedades antagonistas de la cepa RTI545 de *Bacillus thuringiensis* contra varios patógenos de plantas importantes en los ensayos en placas se describen en el EJEMPLO 2 y los rasgos fenotípicos tales como la producción de fitohormonas, acetoina y ácido indolacético (IAA), y el ciclado de nutrientes de la cepa se describen en el EJEMPLO 3.

El EJEMPLO 4 describe los efectos positivos de la incubación de semillas de maíz con células RTI545 sobre la germinación de las semillas, desarrollo de raíces y crecimiento temprano. Los resultados se muestran en la FIG. 3A y FIG. 3B, que son imágenes de las plántulas de maíz después de 12 días crecidas en presencia (FIG. 3A) y ausencia (FIG. 3B) de la cepa RTI545. Como se puede observar en las figuras, la presencia de la cepa RTI545 produjo una ventaja de crecimiento significativa.

El EJEMPLO 5 describe los efectos positivos de la inoculación de semillas de maíz con células RTI545 sobre el crecimiento temprano y el vigor de las plantas. Se inocularon semillas de maíz germinadas esterilizadas en superficie durante 2 días en una suspensión de 10^8 UFC/ml de RTI545 a temperatura ambiente y, posteriormente, las semillas inoculadas se plantaron en macetas y se incubaron en un invernadero. El peso húmedo y seco de la biomasa de los brotes de maíz se midió después de 42 días de crecimiento. El peso húmedo y el peso en seco de la biomasa de brotes de

maíz aumentaron para las plantas inoculadas con la cepa RTI545 de *Bacillus thuringiensis* en comparación con el control no inoculado. Como se puede deducir del aumento significativo de la biomasa tanto húmeda como seca, la presencia de la cepa RTI545 produjo una ventaja significativa del crecimiento.

El EJEMPLO 6 describe la actividad repelente de insectos inesperada de la cepa RTI545. Para el antagonismo contra la chinche de planta occidental (WPB), RTI545 *Bacillus thuringiensis* se evaluó en pulverización directa, ensayos de alimentación por elección y alimentación sin elección, junto con controles que incluyen un blanco de medios, un agente químico activo (O, S-Dimetil acetilfosforamidotioato) y *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 (HD-1). Como se esperaba, no se observó mortalidad significativa (ensayos por pulverización directa y de alimentación sin elección) o repelencia (ensayo de alimentación de elección) para los tratamientos con blanco del medio o HD-1, mientras que el control químico destruyó (ensayos de pulverización directa y alimentación sin elección) y repelió (ensayo de alimentación de elección) el WPB. *Bacillus thuringiensis* RTI545 no proporcionó mortalidad significativa a WPB cuando se aplicó tanto en pulverización directa como en ensayos de alimentación sin elección; sin embargo, inesperadamente, RTI545 mostró un comportamiento repelente a las 124 horas después de que el WPB se colocó en áreas de ensayo elegidas. Específicamente, cuando el WPB se colocó en un recipiente que contiene una fuente de alimento tratada y no tratada, se observó que WPB se alimentaba solamente de la fuente de alimento no tratada (datos no mostrados).

Para el antagonismo contra larvas de la gusano de la raíz del maíz del sur (SCRW), se evaluaron las células de RTI545 *Bacillus thuringiensis* en un ensayo de alimentación de elección de plántulas de maíz y se compararon con un control de agua. Los tratamientos adicionales en comparación con el control de agua fueron i)

cepa *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 (HD-1), ii) control químico CAPTURE LFR (A.I. = 17,15% bifentrina), y iii) medio 869. El papel de filtro se cortó por la mitad y cada sección se colocó en una placa de Petri, a la que se aplicó tratamiento o agua desionizada a cada mitad del papel. Una semilla de maíz germinada se ubicó en cada mitad del papel de filtro húmedo. Diez larvas de segundo instar se colocaron en la línea media entre el papel de filtro tratado y no tratado. Las placas se sellaron y se mantuvieron durante 6 días. En la FIG. 4 se muestra una imagen del ensayo de placa con las células RTI545 después de 6 días, y los datos de todos los ensayos de placa se resumen en la Tabla IV. Como se observó en el ensayo anterior para WPB, el RTI545 inesperadamente repelió, pero no mató las larvas de SCRW. Como se puede observar en la FIG. 4 y la Tabla IV, los cultivos RTI545 eran excelentes para repeler las larvas de SCRW; 100% de las larvas estaban presentes en la mitad tratada con agua del papel de filtro y ninguna de las larvas en el papel tratado con RTI545. Por el contrario, las larvas se dividieron estadísticamente entre el tratamiento y el control de agua para la cepa HD-1. El control químico produjo aproximadamente un 19% de las larvas presentes en el papel de filtro tratado. La Tabla V muestra resultados similares. Los resultados muestran que la cepa RTI545 fue inesperadamente superior al insecticida químico al repeler los insectos de la semilla de maíz, pero no mató a los insectos.

La Tabla VI compara el efecto repelente sobre SCRW de la kanosamina y las cepas de *B. thuringiensis* RTI545 y FD30, lo que muestra que el comportamiento repelente de RTI545 frente a insectos se puede deber a la producción de kanosamina.

El EJEMPLO 7 muestra la inhibición repelente e incubación de huevos de nematodos de nudos de raíz expuestos al sobrenadante RTI545, en comparación con la kanosamina. Los resultados resumidos en las Tablas VII y VIII sugieren que el

efecto de RTI545 contra nematodos no parece ser causado por la producción de kanosamina.

El EJEMPLO 8 describe el efecto positivo sobre el crecimiento y el rendimiento en ensayos en campo e invernadero bajo presión de insectos por tratamiento de semillas de maíz y soja con esporas de RTI545 *B. thuringiensis*. Los efectos sobre el crecimiento, rendimiento y control de las plagas del maíz, gusano del alambre y el gusano de la semilla, se midieron en ensayos de campo en Wisconsin. Se realizaron experimentos adicionales en el invernadero para medir el efecto sobre el crecimiento temprano de las plantas en presencia de gusano de alambre.

En un experimento de ensayo de campo, las semillas de maíz se trataron con suspensiones que contienen: 1) tratamiento de control fúngico químico que comprende MAXIM + APRON XL (denominado como "FC"); 2) FC + el insecticida bifentrina 0,125 mg/semilla; 3) FC + PONCHO 1250 (clotianidina 1,25 mg/semilla) y VOTIVO (*Bacillus firmus* I-1582); 4) FC + PONCHO 250 (clotianidina 0,25 mg/semilla); 5) FC + PONCHO 500 (clotianidina 0,5 mg/semilla) y VOTIVO (*Bacillus firmus* I-1582) y; 6) FC + bifentrina (0,125 mg/semilla) + esporas de *B. thuringiensis* RTI545. Las semillas de maíz tratadas se sembraron en ensayos de campo separados en Wisconsin en el gusano de alambre y gusano de la semilla infestados en suelo. Los resultados se muestran a continuación en la Tabla IX. La inclusión del *B. thuringiensis* RTI545 en combinación con el insecticida bifentrina produjo mejoras significativas en el porcentaje de emergencia, grado de establecimiento de la planta, vigor y control tanto del gusano de alambre como del gusano de semilla sobre las semillas tratadas con bifentrina sola. Además, los resultados de la combinación de *B. thuringiensis* RTI545 y bifentrina fueron estadísticamente equivalentes al producto PONCHO 1250 VOTIVO en el control del gusano de alambre y mostraron una mejora

con respecto a este producto en el control del gusano de semilla. Estos datos indican que el tratamiento de semillas de maíz con una combinación de *B. thuringiensis* RTI545 y un insecticida químico tal como bifentrina mejora significativamente el control de insectos respecto de la inclusión de insecticida químico solo y es superior a los productos comercialmente disponibles para algunos tipos de control de insectos.

En un segundo ensayo de campo, las semillas de maíz se trataron con las mismas suspensiones que el primer ensayo que contiene: 1) control químico MAXIM + APRON XL (denominado como "FC"); 2) FC + bifentrina; 3) FC + PONCHO 1250 VOTIVO; 4) FC + PONCHO 250; y 5) FC + bifentrina + esporas de RTI545. Las semillas de maíz tratadas se plantaron en ensayos de campo separados en Wisconsin con gusano de alambre presente pero sin gusano de semilla. El daño de las raíces del maíz debido a la alimentación del gusano de alambre se clasificó 41 días después de la plantación. Los resultados se muestran a continuación en la Tabla X y muestran resultados similares al ensayo anterior. Específicamente, la inclusión de *B. thuringiensis* RTI545 en combinación con el insecticida bifentrina produjo mejoras significativas en el porcentaje de emergencia, grado de establecimiento de plantas, vigor y control del gusano de alambre sobre las semillas tratadas con bifentrina sola. Además, los resultados de la combinación de *B. thuringiensis* RTI545 y bifentrina fueron estadísticamente equivalentes o superiores al producto PONCHO 1250 VOTIVO en el control del gusano de alambre.

También se determinó el rendimiento promedio en los ensayos de campo de maíz después del tratamiento de semillas con una combinación de insecticida químico y esporas de RTI545 en comparación con PONCHO VOTIVO. Los resultados se muestran a continuación en la Tabla XI. La inclusión de *B. thuringiensis* RTI545 en combinación con el insecticida bifentrina produjo mejoras significativas en el

rendimiento en comparación con las semillas tratadas con bifentrina sola. Además, la combinación de RTI545 y bifentrina superó a PONCHO 500 VOTIVO y PONCHO 1250 VOTIVO al aumentar el rendimiento de 13 bushels/acre (de 180,5 a 193,7 y de 185,5 a 193,7 bushels/acre, respectivamente), lo que representa un aumento de 6,8% y 4,2% del rendimiento de grano, respectivamente. Estos datos indican que el tratamiento de semillas de maíz con una combinación de RTI545 y un insecticida químico tal como la bifentrina mejora significativamente el rendimiento sobre la inclusión de insecticida químico solo y reduce la necesidad de aplicación en surco de cantidades mayores de insecticidas químicos para controlar el daño por insectos.

El efecto sobre el crecimiento bajo la presión de los insectos mediante el tratamiento de semillas de maíz con esporas de RTI545 se evaluó adicionalmente. En un conjunto de estudios en invernadero, las semillas de maíz se trataron primero con las suspensiones de tratamiento de semillas como se describe a continuación y luego se sembraron en suelo infestado con el gusano de alambre de la plaga (10 gusanos por ojo con una semilla), junto con un conjunto de control donde el suelo no contiene gusano de alambre. Las suspensiones de tratamiento de semillas fueron las siguientes: 1) control químico MAXIM + APRON XL (denominado FC); 2) FC; 3) FC + bifentrina (0125 mg/semilla para todos los tratamientos tratados); 4) FC + bifentrina + RTI545 $5,0 \times 10^6$; 5) FC + bifentrina + RTI545 $5,0 \times 10^6$ tratado térmicamente; 6) FC + bifentrina + RTI545 $1,0 \times 10^6$; 7) FC + RTI545 $5,0 \times 10^6$; y 8) FC + PONCHO 1250. Las semillas tratadas se evaluaron para el porcentaje de emergencia.

En un conjunto de estudios en invernadero, las semillas de maíz se trataron primero con las suspensiones de tratamiento de semillas como se describe a continuación y luego se plantaron en suelo infestado con el gusano de alambre de la plaga (10 gusanos por maceta con una semilla), junto con un conjunto de control

donde el suelo no contenía gusano de alambre. Las suspensiones de tratamiento de semillas fueron las siguientes: 1) control químico MAXIM + APRON XL (denominado como "FC"); 2) FC; 3) FC + bifentrina (0125 mg/semilla para todos los tratamientos tratados); 4) FC + bifentrina + RTI545 $5,0 \times 10^6$; 5) FC + bifentrina + RTI545 $5,0 \times 10^6$ tratado térmicamente; 6) FC + bifentrina + RTI545 $1,0 \times 10^6$; 7) FC + RTI545 $5,0 \times 10^6$; y 8) FC + PONCHO 1250. Las semillas tratadas se evaluaron por porcentaje de emergencia.

Los resultados se muestran a continuación en la Tabla XII. La inclusión del *B. thuringiensis* RTI545 en combinación con el insecticida bifentrina produjo 100% de emergencia, lo cual fue una mejora con respecto a la inclusión de bifentrina sola y proporcionó resultados equivalentes al control sin gusano de alambre y al tratamiento químico FC + PONCHO 1250. El gusano de alambre que se alimenta de las raíces del ciruelo causa la atrofia de la planta de maíz y RTI545 solo o bifentrina con RTI545 redujeron la atrofia de la planta en las plantas sobrevivientes. RTI545 solo exhibió actividad sobre la prevención de la pérdida de plantas, pero fue inferior a la bifentrina insecticida para proporcionar protección temprana contra la atrofia. Sin embargo, RTI545 fue más efectivo en la prevención de retraso de plantas a medida que las plantas crecieron (datos no presentados). Estos datos indican que la inclusión de esporas de RTI545 en el tratamiento de las semillas de maíz, solo o en combinación con un insecticida químico tal como bifentrina, mejora significativamente la salud de las plantas en presencia del gusano de alambre de plaga de insecto.

Se realizaron experimentos para determinar el efecto sobre el rendimiento mediante el tratamiento de la semilla de soja con una combinación fungicida estándar de ingredientes activos químicos, además de esporas de *B. thuringiensis* RTI545, en combinación con un insecticida químico. Los experimentos se realizaron como se

describe a continuación. En el experimento, las semillas de soja se mezclaron con una solución que contenía: 1) control químico fludioxonilo/TPM/mefenoxam ("FC"); 2) FC + insecticida tiametoxam; y 3) FC + tiametoxam + esporas de *B. thuringiensis* RTI545. Las semillas de soja tratadas se plantaron en tres sitios (N = 3) que tenían infestación de gusano de alambre, y se analizó el rendimiento. Los resultados se muestran a continuación en la Tabla XIII. La inclusión de las esporas RTI545 en combinación con el tiametoxam produjo mejoras significativas en el rendimiento en comparación con las semillas tratadas con tiametoxam solo. Estos datos indican que el tratamiento de semillas de soja con una combinación de RTI545 y un insecticida químico mejora significativamente el rendimiento respecto de la inclusión de insecticida solo y reduce la necesidad de aplicación en surco de cantidades mayores de insecticidas químicos para controlar el daño por insectos.

El EJEMPLO 9 describe la capacidad de *Bacillus thuringiensis* RTI545 para reducir la infestación de nematodos en soja y papa. Se realizó un estudio en invernadero con plantas de soja de maceta en el suelo infectado con nematodos de nudos de raíces del sur (*Meloidogyne incognita*) proveniente de semillas tratadas con y sin células RTI545. El tratamiento con semillas incluyó productos PONCHO VOTIVO (BAYER CROPS SCIENCE LP, AI = 40,3% de clotianidina, 8,1% de *Bacillus firmus* I-1582) y AVICTA COMPLETE (SYNGENTA, AI = 11,7% de tiametoxam, 10,3% de abamectina, 2,34% de tiabendazol, 0,3% de fludioxonilo, 0,23 % de mefenoxam, 0,12% de azoxistrobina). Los resultados se muestran en la Tabla XIV a continuación. A los 63 días después del inicio, no hubo diferencia estadística en el número de huevos de nematodo/maceta para la semilla tratada con células RTI545 y semilla tratada con la combinación química AVICTA COMPLETE. Sin embargo, el número de huevos de nematodo/maceta para la semilla tratada con células RTI545 fue menor

que el de la semilla tratada con PONCHO VOTIVO. Esto demuestra el efecto positivo sobre el control de nematodos en la soja provisto por *Bacillus thuringiensis* RTI545, lo que proporciona el control equivalente a superior en comparación con productos biológicos más productos químicos y a base de compuestos químicos activo disponibles en el comercio.

Se realizó un estudio de invernadero con plantas de papa en maceta en suelo naturalmente infectado con los nematodos *Globodera sp.* para determinar el efecto del tratamiento del suelo con las células *Bacillus thuringiensis* RTI545. Se plantaron papas (variedad sensible al nematodo "Bintje") en el suelo infectado con *Globodera sp.* (Control) y mejorado con 10^9 de ufc de esporas por litro de suelo de RTI545. Los resultados se muestran en el gráfico de la FIG. 5. Los tratamientos adicionales del suelo se incluyeron en el estudio: producto VYDATE (DUPONT; AI = Oxamilo[Metoil N'N'-dimetil-N-[(metilcarbamoil)oxil]oxi]-1-tiooxamimidato), producto BIOACT (BAYER CROPS SCIENCES LP; AI = cepa 251 de *Paecilomyces lilacinus*), producto CAREX (NUFARM, piridabeno) y *Bacillus thuringiensis* spp. *kurstaki* HD-1). Los productos se aplicaron a las tasas indicadas en las etiquetas del producto. Como se puede observar en la FIG. 5, el número de quistes por gramo de biomasa de raíz para el suelo tratado con células RTI545 se redujo significativamente en comparación con todos los tratamientos que incluyen los productos que contienen ingredientes activos químicos. Esto demuestra el efecto positivo sobre el control de nematodos para la papa proporcionada por *Bacillus thuringiensis* RTI545, lo que proporciona un control superior en comparación con los productos biológicos y a base de compuestos químicos disponibles en el comercio.

El EJEMPLO 10 describe experimentos realizados para investigar el efecto sobre la emergencia, enfermedad de las raíces y rendimiento en algodón en presencia

de la presión de la enfermedad de *Rhizoctonia* cuando las semillas se trataron con la cepa RTI545 además de agentes químicos activos para el control de patógenos.

Específicamente, se estableció un experimento en algodón como sigue: 1) la semilla no se trató (UTC); 2) la semilla se trató con una combinación de base de fludioxonilo + mefenoxam + imidacloprida de acuerdo con la etiqueta del fabricante (denominada como "B"); 3) la semilla se trató con base más 5×10^5 ufc/semilla de RTI545 (B + RTI545); y 4) la semilla se trató con base más VIBRANCE (ingrediente activo sedaxano, SYNGENTA CROP PROTECTION, INC) de acuerdo con las instrucciones de la etiqueta (B + VIBRANCE). Se realizaron ensayos de campo en Georgia. Los ensayos se inocularon con *Rhizoctonia* mediante la mezcla de inóculo seco con la semilla en el momento de la plantación a una tasa prescrita para proporcionar infección cuando la semilla comenzó a crecer. El porcentaje promedio de emergencia de algodón se presenta en la Tabla XV a continuación.

Los resultados en la Tabla XV muestran que el tratamiento con esporas RTI545 además de la base produjo una mejora significativa en el porcentaje de emergencia respecto del de la base química sola. Además, se realizó el tratamiento con RTI545 así como la base más producto comercial VIBRANCE con compuesto químico activo. Por lo tanto, el tratamiento de semillas con RTI545 puede proporcionar una mejora significativa en la emergencia incluso bajo condiciones de presión de patógeno severa.

El EJEMPLO 11 describe experimentos para investigar el efecto sobre el crecimiento y rendimiento bajo presión de insecto por semilla de trigo tratada con esporas de *B. thuringiensis* RTI545 y semillas tratadas con RTI545 más agentes activos químicos para el control de patógenos. Más específicamente, se midieron los

efectos sobre el crecimiento, rendimiento y control de plagas de trigo, gusano de alambre y escarabajo blanco en ensayos de campo en Wisconsin. Las semillas de trigo se trataron con suspensiones que contienen: 1) base de fungicida químico difenoconazol/tebuconazol/TPM/mefenoxan (denominado como “FC”); 2) FC + esporas de *B. thuringiensis* RTI545 (RTI545 1×10^6 ufc/g de semilla); 3) FC + bifentrina (20 g/semilla); 4) FC + bifentrina (20 g/semilla) + RTI545 1×10^6 ufc/g de semilla; 5) FC + bifentrina (50 g/semilla); y 6) FC + bifentrina (50 g/semilla) + RTI545 1×10^6 ufc/g de semilla. Los resultados se muestran a continuación en la Tabla XVI. El tratamiento de las semillas con cada una de las esporas de *B. thuringiensis* RTI545 y el tratamiento con las esporas RTI545 con la base fungicida sola o en combinación con el insecticida bifentrina produjeron mejoras significativas en el porcentaje de emergencia, vigor, control de gusanos de alambre y escarabajo blanco, y rendimiento. En todos los casos analizados, la inclusión de las esporas RTI545 en el tratamiento de la semilla de trigo produjo mejoras significativas en el crecimiento, vigor, control de plagas y rendimiento.

El EJEMPLO 12 muestra el impacto del tratamiento de la semilla de soja RTI545 sobre el crecimiento y el rendimiento frente al patógeno fúngico *Rhizoctonia*. La Tabla XVII muestra una comparación de RTI545 añadido a un tratamiento de semillas químico base en comparación con el tratamiento base solo y al tratamiento base más otro ingrediente químico activo. La adición de RTI545 al tratamiento químico de base produjo aumentos significativos en el grado de establecimiento, vigor y rendimiento en comparación con el químico de base.

El EJEMPLO 13 muestra el impacto del tratamiento de las semillas de maíz RTI545 sobre el crecimiento y el rendimiento frente a gusanos de alambre y gusanos de semillas. La Tabla XVIII muestra que el RTI545 proporciona cierta protección y

mejora la protección insecticida frente a estas plagas cuando se añade a insecticidas químicos tales como clotianidina, bifentrina y clorantraniliprol.

El EJEMPLO 14 muestra que el RTI545 es efectivo en aplicaciones en surcos contra el gusano del maíz y gusano de la raíz del maíz, lo que produce un aumento de rendimiento y reducción del daño de las raíces, solos y especialmente en combinación con el insecticida químico bifentrina, como se muestra en las Tablas XIX y XX.

El EJEMPLO 15 muestra el impacto del tratamiento con semillas de maníes RTI545 sobre el crecimiento y el rendimiento frente al patógeno fúngico *Rhizoctonia*. La Tabla XXI muestra una comparación de RTI545 añadido a un tratamiento de semilla químico de base en comparación con el tratamiento de base solo. La adición de RTI545 al tratamiento químico de base produjo aumentos significativos en el en el grado de establecimiento, vigor y rendimiento en comparación con el químico de base.

El EJEMPLO 16 presenta ensayos en invernadero del tratamiento de semillas de maíz RTI545 contra nematodos de lesión. La Tabla XXII muestra una comparación de RTI545 añadido a un tratamiento de semillas químico fungicida de base en comparación con el tratamiento de base solo y el tratamiento de base más PONCHO/VOTIVO. RTI545 más el tratamiento de base proporcionó un aumento superior de la longitud de la raíz respecto del no tratado en comparación con el proporcionado por el tratamiento base más PONCHO/VOTIVO. La Tabla XXIII muestra que el tratamiento con RTI545 + base proporcionó una reducción superior en la penetración y el peso superior fresco en comparación con el tratamiento de base y el tratamiento de base + PONCHO/VOTIVO. Esta tabla también muestra los resultados cuando RT545 se combina con otros agentes de control biológico.

El Ejemplo 17 presenta ensayos de riego del suelo de tratamiento de semillas de soja RTI545 contra nematodos de quistes de soja. La Tabla XXIV muestra una reducción de quistes en comparación con el control no tratado.

Los EJEMPLOS 18 y 19 muestran formulaciones concentradas en suspensión de RTI545 (Tabla XXV) y RTI545 más bifentrina (Tablas XXVI y XXVII). La Tabla XXVIII muestra que las esporas en una formulación SC permanecieron estables durante dos semanas de almacenamiento a temperatura elevada.

En una forma de realización de la presente descripción, se proporciona una composición que incluye un cultivo biológicamente puro de *Bacillus thuringiensis* RTI545 depositado como ATCC N° PTA-122161, o una mutante de este que tiene todas sus características de identificación, para aplicación a una planta para uno o ambos de beneficiar el crecimiento de las plantas o conferir protección contra una plaga vegetal en una planta susceptible.

En otra realización, se proporciona un método para uno o ambos de beneficiar el crecimiento de una planta o conferir protección contra una plaga vegetal en una planta susceptible, el método incluye administrar una composición que comprende un cultivo biológicamente puro de *Bacillus thuringiensis* RTI545 depositado como ATCC No. PTA-122161, o una mutante de este que tiene todas sus características de identificación a: una planta, parte de planta, semilla de la planta, raíces de la planta, suelo o medio de crecimiento que rodea la planta o la semilla de la planta o suelo o medio de crecimiento antes de plantar la planta o sembrar la semilla de la planta, en una cantidad adecuada para beneficiar el crecimiento de la planta y/o conferir protección contra la plaga vegetal en la planta susceptible.

En las composiciones y métodos de la presente descripción, el beneficio de crecimiento de la planta y/o la protección conferida se puede exhibir mediante un vigor de plántulas mejorado, desarrollo de raíces mejorado, crecimiento de plantas mejorado, salud de las plantas mejorada, rendimiento aumentado, aspecto mejorado, resistencia a plagas de plantas mejorada, infección patógena reducida, o una combinación de estos.

Las composiciones y métodos de la presente invención son beneficiosos para una amplia variedad de plantas que incluyen, pero sin limitación, monocotiledóneas, dicotiledóneas, cereales tales como maíz, maíz dulce, maíz palomero, maíz de siembra, maíz de ensilaje, maíz de campo, arroz, cebada, sorgo, espárrago, bayas tales como arándano, zarzamora, frambuesa, mora roja, arándano, arándano azul, arándano agrio, saúco, grosella, corinto, zarzamora, arbusto de bayas, verduras del género Brassica tales como brócoli, repollo, coliflor, repollitos de Bruselas, col, col rizada, hojas de mostaza, colirrábano, verduras cucurbitáceas, tales como pepino, cantalupo, melón, melón almizcleño, calabaza, sandía, zapallo, berenjena, verduras de bulbo como cebolla, ajo, chalote, cítricos como naranja, pomelo, limón, mandarina, tangelo, pomelo, hortalizas de fruto tales como pimiento, tomate, tomate silvestre, tomatillo, okra, uva, hierbas, especias, verduras de hojas tales como lechuga, apio, espinaca, perejil, achicoria, legumbres o verduras tales como porotos, porotos verdes, habichuelas, habas, porotos de soja, porotos secos, porotos pallares, arvejas, garbanzo, arvejas partidas, lentejas, cultivos de semillas oleaginosas tales como canola, ricino, coco, algodón, lino, aceite de palma, aceite de oliva, maní, colza, cártamo, sésamo, girasol, soja, fruta de pepita tales como manzana, manzana silvestre, pera, membrillo, mayhaw, verduras de raíz, tubérculo y corno tales como zanahoria, papa, batata, yuca, remolacha, jengibre, rábano picante, rábano, ginseng,

nabo, fruta de hueso tales como damasco, cereza, nectarina, durazno, ciruela, ciruela pasa, frutilla, frutos secas tales como almendra, pistacho, pecan, nuez, avellanas, castaña, anacardo, hayuco, nuez blanca, macadamia, kiwi, banano, agave (azul), pasto, césped, plantas ornamentales, flor de pascua, estacas de madera tal como castaño, roble, arce, caña de azúcar y remolacha azucarera. En una o más formas de realización, la planta puede incluir maíz, soja, papa, algodón, tomate, pimiento, cucurbitáceas, caña de azúcar, maní o trigo; o soja, algodón, trigo, maíz o papa.

En las composiciones y métodos de la presente invención, el daño a las plantas puede ser causado por una amplia variedad de plagas de plantas que incluyen, por ejemplo, pero sin limitación, una plaga de insecto de planta, tal como un chinche de planta occidental (WPB) *Lygus hesperus*, *Coleoptera* sp., *Diabrotica* sp., que incluyen el gusano de la raíz del maíz occidental (*D. virgifera*), del sur (*D. undecimpunctata*) y del norte (*D. barberi*), rootworm), *D. balteata*, y *D. longicornis*, *Melanotus* spp. (que incluye el gusano del maíz, *Melanotus communis* y *Melanotus cribulosus*), *Phyllophaga* spp. (que incluye gusanos blancos, gusanos de alambre, gusanos falsos y *Phyllophaga rugosa*), *Limoniuss* spp. (gusanos de la remolacha azucarera y *Limoniuss agronus*), *Agriotes* spp. (que incluyen gusanos de trigo *Agriotes mancus*, gusanos de maíz, gusanos blancos y gusanos de semillas), *Lepidoptera* sp., *Peridroma* spp. (que incluyen el gusano variado), *Euxoa* spp. (que incluyen el gusano cortador), *Agrotis* spp. (que incluyen el gusano negro *Agrotis ipsilon*), *Diptera* sp., *Hylemya* spp. (que incluyen gusano de semilla *Delia platura* Meigen y *Hylemya cilicrura*), *Tetanops* spp. (que incluyen gusano de la raíz de la remolacha azucarera), *Homoptera* sp., *Pemphigus* sp. (que incluyen el pulgón de la raíz de la remolacha azucarera, gusano cortador y escarabajo blanco), *Aphis* spp. (que incluyen el pulgón de la raíz del maíz), el escarabajo de semilla de maíz *Agonoderus lecontei*, *Feltia subgothica*, o

combinaciones de estos. Los insectos destacados incluyen chinche de planta occidental, gusano de la raíz del maíz del Sur, gusano alambre del maíz, gusano del semillero, gusano de la semilla de maíz, gusano del trigo y escarabajo blanco.

En las composiciones y métodos de la presente invención, la plaga vegetal puede ser, por ejemplo, pero sin limitación, nematodo patógeno de plantas, nematodo reniforme, *Rotylenchulus spp.*, nematodo de daga, *Xiphinema spp.*, nematodo de lanza, *Hoplolaimus spp.*, nematodo alfiler (lesión), *Paratylenchus spp.*, nematodo de anillo, *Criconeoides spp.*, nematodo de nudo de raíz, *Meloidogyne spp.*, nematodo de vaina, *Hemicycliophora spp.*, nematodo espiral, *Helicotylenchus spp.*, nematodo de raíz gruesa, *Trichodorus spp.*, *Heterodera spp.* y *Globodera spp.*, nematodo de picadura, *Belonolaimus spp.*, nematodos de atrofia, y *Tylenchorhynchus spp.*, nematodo barrenador, *Radopholus spp.* o sus combinaciones. Los nematodos destacados incluyen los nematodos del nudo de raíz (*Meloidogyne spp.*), nematodos de lesión, (*Paratylenchus spp.*) y nematodos del quiste (*Heterodera spp.* y *Globodera spp.*).

En las composiciones y métodos de la presente invención, la plaga vegetal se puede caracterizar, por ejemplo, pero sin limitación, un patógeno fúngico de planta o un patógeno bacteriano de planta, tal como un hongo de roya, un *Botrytis spp.*, un *Erwinia spp.*, un *Dickeya spp.*, un *Agrobacterium spp.*, un *Xanthomonas spp.*, un *Xylella spp.*, un *Candidatus spp.*, un *Fusarium spp.*, un *Sclerotinia spp.*, un *Cercospora/Cercosporidium spp.*, un *Uncinula spp.*, un *Podosphaera spp.* (Oídio), un *Phomopsis spp.*, un *Alternaria spp.*, un *Pseudomonas spp.*, un *Phytophthora spp.*, un *Phakopsora spp.*, un *Aspergillus spp.*, un *Uromyces spp.*, tales como *Uromyces appendiculatus*, un *Cladosporium spp.*, un *Rhizopus spp.*, un *Penicillium spp.*, un *Rhizoctonia spp.*, *Macrophomina phaseolina*, un *Mycosphaerella spp.*, un

Magnaporthe spp., tales como *Magnaporthe oryzae* o *Magnaporthe grisea*, un *Monilinia* spp., un *Colletotrichum* spp., un *Diaporthe* spp., un *Corynespora* spp., un *Gymnosporangium* spp., un *Schizothyrium* spp., un *Gloeodes* spp., un *Botryosphaeria* spp., un *Neofabraea* spp., un *Wilsonomyces* spp., un *Sphaerotheca* spp., un *Erysiphe* spp., un *Stagonospora* spp., un *Pythium* spp., un *Venturia* spp., un *Ustilago* spp., un *Claviceps* spp., un *Tilletia* spp., un *Phoma* spp., *Cocliobolus sativus*, *Gaeumanomyces gaminis*, un *Rhynchosporium* spp., un *Biopolaris* spp., y un *Helminthosporium* spp., o sus combinaciones.

Los patógenos fúngicos destacados incluyen *Aspergillus flavus*, *Botrytis* spp. tales como *Botrytis cinerea*, *Fusarium* spp., tales como *Fusarium colmorum*, *Fusarium oxysporum* o *Fusarium virguliforme*, *Phytophthora* spp. tales como *Phytophthora capsici*, *Rhizoctonia* spp. tales como *Rhizoctonia solani*, *Magnaporthe* spp., tales como *Magnaporthe grisea* and *Magnaporthe oryzae*, y *Pythium* spp. tales como *Pythium aphanidermatum* y *Pythium sylvaticum*, *Monilinia* spp. tales como *Monilinia fructicola*, *Colletotrichum* spp., tales como *Colletotrichum gloeosporioides* (etapa sexual de *Glomerella cingulata*) es decir, antracnosis, *Sclerotinia* spp., tales como *Sclerotinia sclerotiorum* y *Sclerotinia homeocarpa*; más especialmente *Rhizoctonia* spp. Los patógenos bacterianos destacados incluyen *Erwinia* spp. tales como *Erwinia amylovora*.

En las composiciones y métodos de la presente descripción, las composiciones que incluyen la cepa RTI545 pueden estar en forma de un líquido, un concentrado en suspensión, una dispersión en aceite, un polvo, un polvo humectable seco, un gránulo esparcible o un gránulo humectable seco. En formas de realización, el *Bacillus thuringiensis* RTI545 puede estar presente en la composición a una concentración de aproximadamente $1,0 \times 10^8$ UFC/ml a aproximadamente $1,0 \times 10^{12}$ UFC/ml. En formas

de realización, el *Bacillus thuringiensis* RTI545 puede estar presente en una cantidad de aproximadamente $1,0 \times 10^8$ UFC/g a aproximadamente $1,0 \times 10^{12}$ UFC/g. El *Bacillus thuringiensis* RTI545 puede estar en la forma de esporas o células vegetativas.

En las composiciones y métodos de la presente descripción, la composición que incluye la cepa RTI545 puede incluir una o una combinación de adyuvantes que incluyen, por ejemplo, un portador, un aglutinante, un tensioactivo, un dispersante o un extracto de levadura. El portador, aglutinante, tensioactivo, dispersante, y/o extracto de levadura se incluyen para mejorar las propiedades de la composición para su uso en beneficio del crecimiento de la planta y/o conferir protección contra plagas de plantas, las propiedades que incluyen una o más propiedades de manejo mejoradas, capacidad de humectación, fluidez mejorada, adhesión mejorada a la semilla, estabilidad mejorada de la cepa RTI545 y actividad mejorada de la cepa RTI545 después de la administración o aplicación a las semillas, raíces o suelo de la planta. El extracto de levadura se puede administrar a una tasa para beneficiar el crecimiento de la planta que varía de aproximadamente 0,01% a 0,2% p/p.

Las composiciones que incluyen la cepa RTI545 pueden estar en forma de una matriz de plantación. La matriz de plantación puede estar en forma de una mezcla de suela de tierra de maceta.

En las composiciones y métodos de la presente descripción, la composición puede incluir además una o una combinación de un agente agrícola adicional, tales como un insecticida, fungicida, nematocida, bactericida, bioestimulante, herbicida, extracto de planta, extracto microbiano, regulador de crecimiento de plantas, fertilizante o producto nutriente de cultivo presente en una cantidad adecuada para beneficiar el crecimiento de la planta y/o conferir protección contra la plaga vegetal en

la planta susceptible. En una forma de realización, la composición que incluye el cultivo biológicamente puro de *Bacillus thuringiensis* RTI545 y el o una combinación del insecticida, fungicida, nematocida, bactericida, bioestimulante, herbicida, extracto de planta, extracto microbiano, regulador de crecimiento de plantas, fertilizante o producto nutritivo de cultivo, se formulan conjuntamente. Cualquiera de los agentes agrícolas adicionales puede ser un agente biológico o un agente químico. En otras formas de realización, la composición que comprende la cepa RTI545 se formula por separado del agente agrícola adicional, que también se puede formular, y luego se mezcla con el agente agrícola adicional, tal como en una mezcla en tanque.

El fertilizante puede ser un fertilizante líquido. El término "fertilizante líquido" se refiere a un fertilizante en forma fluida o líquida que contiene diversas relaciones de nitrógeno, fósforo y potasio (por ejemplo, pero sin limitación, 5 a 15%, tal como 10% de nitrógeno, 20 a 50%, tales como 34%, de fósforo y 0 a 15%, tales como 0%, de potasio) y, opcionalmente, nutrientes secundarios y/o micronutrientes, comúnmente conocidos como fertilizantes de iniciación que son ricos en fósforo y promueven un crecimiento de raíces rápido y vigoroso.

Como se usa en la presente, el término "bioestimulante" se refiere a una sustancia o microorganismo aplicado a plantas con el objetivo de aumentar la captación de nutrientes, eficiencia nutricional y/o tolerancia al estrés abiótico para mejorar el vigor, rendimientos y/o rasgos de calidad de cultivo, tales como contenido nutricional, aspecto y vida útil, independientemente de su contenido en nutrientes. Los bioestimulantes operan a través de diferentes mecanismos que los fertilizantes y no tienen acción directa contra plagas o enfermedades.

En una forma de realización, la composición que incluye el cultivo

biólogicamente puro de *Bacillus thuringiensis* RTI545 además comprende el insecticida químico bifentrina.

Cabe destacar que las mezclas de *Bacillus thuringiensis* cepa RTI545 con otras cepas de biocontrol que incluyen otras cepas *Bacillus thuringiensis* tales como *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai* o *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*, cepas de *Bacillus subtilis* tales como CH201 o QST713 o MBI600 o RTI477, cepas *Bacillus licheniformis* tales como CH200 o RTI184, cepas de *Bacillus velezensis* tales como RTI301, *Bacillus subtilis* var. *amyloliquefaciens* FZB24, o *Bacillus amyloliquefaciens* D747, o sus combinaciones.

Se pueden usar mezclas de cepas microbianas, que incluyen RTI545, para aumentar la actividad contra plagas blanco específicas, pero también se pueden usar para mejorar el espectro de utilidad. Como ejemplo, se puede combinar una cepa con una fuerte actividad contra insectos del suelo con otras cepas que tienen una fuerte actividad contra nematodos, hongos, o beneficios de crecimiento de plantas fuertes. Además, estas mezclas de cepas también se pueden combinar con plaguicidas sintéticos (químicos) para obtener beneficios adicionales.

En una forma de realización, la composición que incluye el cultivo biológicamente puro de *Bacillus thuringiensis* RTI545 además comprende una cepa previamente identificada como *Bacillus amyloliquefaciens* RTI301 depositada como ATCC N° PTA-121165 (Ver US2016/0186273). Esta cepa ha sido reclasificada recientemente como una cepa de *Bacillus velezensis*. En el resto de esta memoria descriptiva, la cepa depositada como ATCC N.º PTA-121165 se denominará "RTI301" o "*Bacillus velezensis* RTI301". En una forma de realización, la combinación de las cepas RTI545 y RTI301 extiende el beneficio al crecimiento de la planta y la

protección contra las plagas vegetales mediante la ampliación y el aumento del rango de temperatura en el que una o ambas cepas proporcionan máxima protección contra las plagas de las plantas, que incluyen patógenos fúngicos de planta.

En otras formas de realización, la composición que incluye el cultivo biológicamente puro de *Bacillus thuringiensis* RTI545 comprende además un cultivo biológicamente puro de un *Bacillus licheniformis* CH200 depositado como DSM 17236, o una mutante de este que tiene todas sus características de identificación; un cultivo biológicamente puro de un *Bacillus subtilis* CH201 depositado como DSM 17231, o una mutante de este que tiene todas sus características de identificación; un cultivo biológicamente puro de un *Bacillus subtilis* RTI477 depositado como ATCC No. PTA-121167, o una mutante de este que tiene todas sus características de identificación; un cultivo biológicamente puro de una cepa *Bacillus amyloliquefaciens* D747 depositada como FERM BP-8234; un *Bacillus licheniformis* RTI184 depositado como ATCC No. PTA-121722, o una mutante de este que tiene todas sus características de identificación o cualquier combinación de estos, que incluyen combinaciones que también comprenden RTI301.

En una forma de realización, la composición que incluye el cultivo biológicamente puro de *Bacillus thuringiensis* RTI545 comprende además el insecticida químico, bifentrina, y la composición se administra en combinación con un fertilizante líquido a: una planta, parte de planta, semilla de la planta, raíces del planta, suelo o medio de crecimiento que rodea la planta o la semilla de la planta, o suelo o medio de crecimiento antes de la plantación de la planta o siembra de semilla de la planta. Los ejemplos de utilización del insecticida, bifentrina, en combinación con un fertilizante líquido para beneficiar el crecimiento de la planta, se describen, por ejemplo, en el documento WO 2016/108972 A1, que se incorpora en la presente como

referencia en su totalidad.

En otra forma de realización, se proporciona un método para uno o ambos de beneficiar el crecimiento de una planta o conferir protección contra una plaga vegetal en una planta susceptible, el método comprende: administrar a una planta, parte de planta, semilla de la planta, raíces de la planta, suelo o medio de crecimiento que rodea la planta o la semilla de la planta, o suelo o medio de crecimiento antes de plantar la planta o sembrar semilla de la planta, una combinación de: una composición que comprende un cultivo biológicamente puro de *Bacillus thuringiensis* RTI545 depositado como ATCC PTA-122161, o una mutante de este que tiene todas sus características de identificación en una cantidad adecuada para beneficiar el crecimiento de la planta y/o conferir protección contra la plaga vegetal en la planta susceptible; o una combinación de agentes agrícolas adicionales como un insecticida, fungicida, nematocida, bactericida, herbicida, extracto de planta, regulador del crecimiento vegetal, o fertilizante como se describe en la presente memoria en una cantidad adecuada para beneficiar el crecimiento de la planta y/o conferir protección contra la plaga en la planta susceptible. Cualquiera de los agentes agrícolas adicionales puede ser un agente biológico o un agente químico. En esta forma de realización, la composición que incluye el cultivo biológicamente puro de *Bacillus thuringiensis* RTI545 y el o una combinación de agentes agrícolas adicionales como se describe en la presente se administran por separado a la planta susceptible, en lugar de a partir de una única formulación.

En una forma de realización, la composición que incluye el cultivo biológicamente puro de *Bacillus thuringiensis* RTI545 se administra en combinación con un fertilizante líquido a: planta, parte de planta, semilla de la planta, raíces de la planta, suelo o medio de crecimiento que rodea la planta o la semilla de la planta, o

suelo o medio de crecimiento antes de plantar la planta o sembrar semilla de la planta.

En una forma de realización, la composición que incluye el cultivo biológicamente puro de *Bacillus thuringiensis* RT1545 se administra en combinación con el insecticida químico, bifentrina, y con el fertilizante líquido a: planta, parte de planta, semilla de la planta, raíces de la planta, suelo o medio de crecimiento que rodea la planta o la semilla de la planta, o suelo o medio de crecimiento antes de plantar la planta o sembrar semilla de la planta.

En una forma de realización, se proporciona una semilla de planta que se recubre con una composición que comprende un agente agrícola biológico adicional, tal como: esporas de un cultivo biológicamente puro de *Bacillus velezensis* RT1301 depositado como ATCC No. PTA-121165, o una mutante de este que tiene todas sus características de identificación, presentes en una cantidad adecuada para beneficiar el crecimiento de la planta y/o conferir protección contra la plaga en la planta susceptible. La composición puede incluir una cantidad de esporas de *Bacillus velezensis* de aproximadamente $1,0 \times 10^2$ UFC/semilla a aproximadamente $1,0 \times 10^9$ UFC/semilla.

Las composiciones de semilla recubierta de la presente invención son beneficiosas para una amplia variedad de semillas de planta que incluyen pero sin limitación, semillas de monocotiledóneas, dicotiledóneas, cereales tales como maíz, maíz dulce, maíz palomero, maíz de siembra, maíz de ensilaje, maíz de campo, arroz, cebada, sorgo, espárrago, bayas tales como arándano, moras, frambuesa, mora roja, arándano, arándano azul, arándano agrio, saúco, grosella, corinto, zarzamora, arbusto de bayas, verduras del género Brassica tales como brócoli, repollo, coliflor, repollitos de Bruselas, col, col rizada, hojas de mostaza, colirrábano, verduras

cucurbitáceas, tales como pepino, cantalupo, melón, melón almizcleño, calabaza, sandía, zapallo, berenjena, verduras de bulbo como cebolla, ajo, chalote, cítricos como naranja, pomelo, limón, mandarina, tangelo, pomelo, hortalizas de fruto tales como pimiento, tomate, tomate silvestre, tomatillo, okra, uva, hierbas, especias, verduras de hojas tales como lechuga, apio, espinaca, perejil, achicoria, legumbres o verduras tales como porotos, porotos verdes, habichuelas, habas, porotos de soja, porotos secos, porotos pallares, arvejas, garbanzo, arvejas partidas, lentejas, cultivos de semillas oleaginosas tales como canola, ricino, coco, algodón, lino, aceite de palma, aceite de oliva, maní, colza, cártamo, sésamo, girasol, soja, fruta de pepita tales como manzana, manzana silvestre, pera, membrillo, mayhaw, verduras de raíz, tubérculo y cormo tales como zanahoria, papa, batata, yuca, remolacha, jengibre, rábano picante, rábano, ginseng, nabo, fruta de hueso tales como damasco, cereza, nectarina, durazno, ciruela, ciruela pasa, frutilla, frutos secas tales como almendra, pistacho, pecan, nuez, avellanas, castaña, anacardo, hayuco, nuez blanca, macadamia, kiwi, banano, agave (azul), pasto, césped, plantas ornamentales, flor de pascua, estacas de madera tal como castaño, roble, arce, caña de azúcar y remolacha azucarera. En una o más formas de realización, la planta puede incluir maíz, soja, papa, algodón, tomate, pimiento, cucurbitáceas, caña de azúcar, maní o trigo; o soja, algodón, trigo, maíz o papa.

En una forma de realización de la semilla de planta recubierta con la composición, la composición también comprende una o una combinación de agentes agrícolas adicionales aquí descriptos presentes en una cantidad adecuada para beneficiar el crecimiento de la planta y/o conferir protección contra la plaga en la planta susceptible.

En una forma de realización, se proporciona un método para uno o ambos de

beneficiar el crecimiento de una planta o conferir protección contra una plaga vegetal en una planta susceptible, el método comprende: plantar una semilla de la planta, en donde la semilla se ha recubierto con una composición que comprende un cultivo biológicamente puro de *Bacillus thuringiensis* RTI545 depositado como ATCC PTA-122161, o una mutante de este que tiene todas sus características de identificación, donde se beneficia el crecimiento de la planta a partir de la semilla y/o se confiere protección contra la plaga vegetal.

En una forma de realización, el método también incluye administrar un fertilizante líquido a la semilla recubierta de la planta, suelo o medio de crecimiento que rodea la semilla recubierta de la planta o suelo o medio de crecimiento antes de plantar la semilla recubierta de la planta.

En una forma de realización del método, la semilla de planta se recubre con la composición que además comprende un agente agrícola biológico adicional, tal como *Bacillus velezensis* RTI301 depositado como ATCC No. PTA-121165. En una forma de realización, la combinación de las cepas RTI545 y RTI301 extiende el beneficio al crecimiento de la planta y la protección contra las plagas vegetales mediante la ampliación y el aumento del rango de temperatura en el que una o ambas cepas proporcionan máxima protección contra las plagas de las plantas, que incluyen patógenos fúngicos de planta

En una forma de realización, la semilla de planta se recubre con la composición que además comprende un insecticida químico, y el método también incluye administrar un fertilizante líquido a la semilla recubierta de la planta, suelo o medio de crecimiento que rodea la semilla recubierta de la planta, o suelo o medio de crecimiento antes de plantar la semilla recubierta de la planta. En una forma de

realización, el insecticida químico es bifentrina.

En formas de realización de la presente que comprenden semillas recubiertas, el término "semilla" se refiere no solo a semillas verdaderas, sino también a otras partes de plantas para propagar las plantas tales como plántulas, trasplantes, gajos (por ejemplo, tallos, raíces, hojas y similares), esporas, esquejes (por ejemplo de caña de azúcar), bulbos, cormos, rizomas, tubérculos, o porciones de estos, u otro tejido vegetal del que se puede obtener una planta completa.

En las composiciones y métodos de la presente descripción, la composición puede incluir un fungicida. El fungicida puede incluir un extracto de *Lupinus albus*. En una o más formas de realización, el fungicida puede incluir un polipéptido BLAD. El polipéptido BLAD puede ser un fragmento de la proteína de almacenamiento de semillas de origen natural del lupín dulce (*Lupinus albus*) que actúa sobre patógenos fúngicos susceptibles causando daño a la pared celular fúngica hongos y alterando la membrana celular interna. Las composiciones pueden incluir aproximadamente 20% del polipéptido BLAD.

Además, en una o varias formas de realización, los insecticidas, herbicidas, fungicidas y nematocidas apropiados de las composiciones y métodos de la presente invención pueden incluir los siguientes:

Insecticidas: A0) diversos insecticidas, incluyendo agrigata, al-fosfuro, amblyseius, aphelinus, aphidius, aphidoletes, artimisinina, autographa californica NPV, azociclotina, *Bacillus subtilis*, *Bacillus thuringiensis subsp. aizawai*, *Bacillus thuringiensis subsp. kurstaki*, *Bacillus thuringiensis*, *Beauveria*, *Beauveria bassiana*, betaciflutrina, agentes biológicos, bisultap, broflutrinato, bromofos-e, bromopropilato, Bt-Corn-GM, Bt-Soya-GM, capsaicina, cartap, extracto de celastrus,

clorantraniliprol, clorbenzurona, cloretoxifos, clorfluazurona, clorpirifos-e, cnidiadina, criolita, cianofos, ciantraniliprol, ciclaniliprol, cihalotrina, cihexatina, cipermetrina, dacnusa, DCIP, dicloropropeno, dicofol, diglifus, diglifus + dacnusa, dimethacarb, ditioéter, dodecil-acetato, emamectina, encarsia, EPN, eretmocerus, dibromuro de etileno, eucaliptol, ácidos grasos, ácidos grasos/sales, fenazaquina, fenobucarb (BPMC), fenpiroximato, flubrocitrinato, flufenzina, flupiradifurona, formetanato, formotiona, furatiocarb, gamma-cihalotrina, jugo de ajo, virus de granulosis, harmonia, heliothis armigera NPV, bacteria inactiva, ácido indol-3-ilbutírico, yodometano, hierro, isocarbofos, isofenfos, isofenfos-m, isoprocarb, isotioato, caolín, lindano, liuyangmicina, matrina, mefosfolano, metaldehído, metarhizium-anisopliae, metamidofos, metolcarb (MTMC), aceite mineral, mirex, m-isotiocianato, monosultap, myrothecium verrucaria, naled, neochrysocharis formosa, nicotina, nicotinoides, aceite, ácido oleico, ometoato, orius, oximatrina, paecilomyces, aceite de parafina, parationa-e, pasteuria, aceite de petróleo, feromonas, ácido de fósforo, photorhabdus, foxim, phytoseiulus, pirimifos-e, aceite vegetal, plutella xylostella GV, virus de polihedrosis, extractos de polifenol, oleato de potasio, profenofos, prosuler, protiofos, piraclofos, piretrinas, piridafentiona, pirimidifeno, piriproxifeno, extracto de quillay, quinometionato, aceite de colza, rotenona, saponina, saponozit, compuestos de sodio, fluosilicato de sodio, almidón, steinernema, streptomyces, sulfluramida, azufre, tebupirinfos, temefos, tetradifona, tetraniliprol, tiofanox, tiometona, transgénicos (por ejemplo, Cry3Bb1), triazamato, trichoderma, tricogramma, triflumurona, verticillium, vertrina, insecticidas isoméricos (por ejemplo, kappa-bifentrina, kappa-teflutrina), dicoromezotiaz, broflanilida, piraziflumida; A1) la clase de carbamatos, incluyendo aldicarb, alanicarb, benfuracarb, carbarilo, carbofurano, carbosulfano, metiocarb, metomilo, oxamilo, pirimicarb, propoxur y tiodicarb; A2) la

clase de organofosfatos, incluyendo acefato, azinfos-etilo, azinfos-metilo, clorfenvinfos, clorpirifos, clorpirifos-metilo, demeton-S-metilo, diazinona, diclorvos/DDVP, dicrotofos, dimetoato, disulfotona, etiona, fenitrotona, fentiona, isoxationa, malationa, metamidafos, metidationa, mevinfos, monocrotofos, oximetoato, oxidemetona-metilo, parationa, parationa-metilo, fentoato, forato, fosalona, fosmet, fosfamidona, pirimifos-metilo, quinalfos, terbufos, tetraclorvinfos, triazofos y triclorfona; A3) la clase de compuestos de ciclodieno organocloro como endosulfano; A4) la clase de fiproles, incluyendo etiprol, fipronilo, pirafluprol y piriprol; A5) la clase de neonicotinoides, incluyendo acetamiprida, clotianidina, dinotefurano, imidacloprida, nitenpiram, tiacloprida y tiametoxam; A6) la clase de espinosinas tales como espinosad y espinetoram; A7) activadores del canal de cloruro de la clase de mectinas, incluyendo abamectina, benzoato de emamectin, ivermectina, lepimectina y milbemectina; A8) mímicos de la hormona juvenil tales como hidropreno, kinopreno, metopreno, fenoxicarb y piriproxifeno; A9) bloqueadores selectivos de alimentación homópteros tales como pimetrozina, flonicamida y pirifluquinazona; A10) inhibidores del crecimiento de ácaros tales como clofentezina, hexitiazox y etoxazol; A11) inhibidores de la síntesis de ATP mitocondrial tales como diafentiurona, óxido de fenbutatina y propargita; desacopladores de la fosforilación oxidativa como clorfenapir; A12) bloqueadores del canal de los receptores de acetilcolina nicotínicos tales como bensultap, clorhidrato de cartap, tiociclam y tiosultap sodio; A13) inhibidores de la biosíntesis de quitina tipo 0 de la clase de benzoilurea, incluyendo bistriflurona, diflubenzurona, flufenoxurona, hexaflumurona, lufenurona, novalurona y teflubenzurona; A14) inhibidores de la biosíntesis de quitina tipo 1 tal como buprofezina; A15) disruptores de la muda tal como ciromazina; A16) agonistas del receptor de ecdisoma tales como metoxifenoazida, tebufenoazida, halofenoazida y

cromafenozida; A17) agonistas del receptor de octopamina tal como amitraz; A18) inhibidores del transporte de electrones del complejo mitocondrial piridabeno, tebufenpirad, tolfenpirad, flufenerim, cienopirafeno, ciflumetofeno, hidrametilonona, acequinocilo o fluacipirim; A19) bloqueadores del canal de sodio dependiente del voltaje tales como indoxacarb y metaflumizona; A20) inhibidores de la síntesis de los lípidos tales como espiroclorfenol, espiromesifeno y espirotetramato; A21) moduladores del receptor de rianodina de la clase de diamidas, incluyendo flubendiamida, los compuestos de ftalamida (R)-3-cloro-N1-{2-metil-4-[1,2,2,2-tetrafluoro-1-(trifluorometilo)etilo]fenil}-N2-(1-metil-2-metilsulfonietil)ftalamida y (S)-3-cloro-N1-{2-metil-4-[1,2,2,2-tetrafluoro-1-(trifluorometil)etil]fenil}-N2-(1-metil-2-metilsulfonietil)ftalamida, clorantraniliprol, ciclaniliprol y ciantraniliprol; A22) compuestos de modo de acción desconocido o incierto tales como azadiractina, amidoflumet, bifenazato, fluensulfona, butóxido de piperonilo, piridalilo, sulfoxaflor; o A23) moduladores del canal de sodio de la clase de piretroides, incluyendo acrinatrina, aletrina, bifentrina, ciflutrina, lambda-cihalotrina, cipermetrina, alfa-cipermetrina, beta-cipermetrina, zeta-cipermetrina, deltametrina, esfenvalerato, etofenprox, fenpropatrina, fenvalerato, flucitrinato, tau-fluvalinato, permetrina, silafluofeno, teflutrina y tralometrina.

Se han de destacar las mezclas de la cepa RTI545 de *Bacillus thuringiensis* con otras cepas de biocontrol que incluyen cepas de *Bacillus subtilis* tales como CH201, cepas de *Bacillus licheniformis* tales como CH200, otras cepas de *Bacillus thuringiensis* tales como *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai*, *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* o combinaciones de ellas para el control de insectos.

En las composiciones y los métodos de la presente descripción, la composición puede incluir un insecticida químico. El insecticida químico puede incluir un piretroide

tales como bifentrina, teflutrina, zeta-cipermetrina, ciflutrina; un organofosfato tales como cloretoxifos, clorpirifos, tebupirinfos, fiproles tales como fipronilo; neonicotinoides tales como imidacloprida, tiametoxam, clotianidina; diamidas tales como clorantraniliprol, ciantraniliprol, ciclaniliprol; o mezclas de ellos.

Se prefieren las mezclas de la cepa RTI545 *de Bacillus thuringiensis* con agentes de control de insectos químicos que comprenden clorantraniliprol, cloretoxifos, clorpirifos-e, ciantraniliprol, ciclaniliprol, cipermetrina, dicloropropeno, flupiradifurona, gamma-cihalotrina, profenofos, tebupirinfos, teflutrina, kappa-bifentrina, kappa-teflutrina, carbofurano, carbosulfano, oxamilo, tiodicarb, clorpirifos, clorpirifos-e, clorpirifos-metilo, diazinona, forato, terbufos, fipronilo, acetamiprida, clotianidina, imidacloprida, tiacloprida, tiametoxam, abamectina, flonicamida, flubendiamida, bifentrina, lambda-cihalotrina, cipermetrina, zeta-cipermetrina, deltametrina o cualquiera de sus mezclas.

Se prefieren más las mezclas de la cepa RTI545 *de Bacillus thuringiensis* con clotianidina, tiametoxam, imidacloprida, teflutrina, fipronilo, clorpirifos-e, tebupirinfos, bifentrina, cipermetrina, zeta-cipermetrina, gamma-cihalotrina, oxamilo, clorantraniliprol, ciantraniliprol, ciclaniliprol o mezclas de ellos.

En una o varias formas de realización, el insecticida puede comprender bifentrina y la composición se puede formular como un líquido. En una o varias formas de realización, el insecticida puede comprender bifentrina y clotianidina. En una o varias formas de realización, el insecticida puede comprender bifentrina y clotianidina y la composición se puede formular como un líquido. En una o varias formas de realización, el insecticida puede comprender bifentrina o zeta-cipermetrina. En una o varias formas de realización, la composición se puede formular como un líquido y el

insecticida puede comprender bifentrina o zeta–cipermetrina.

En una forma de realización, el insecticida químico incluye bifentrina. En una forma de realización, el insecticida químico incluye bifentrina y la composición también incluye un silicato de aluminio–magnesio hidratado, y al menos un dispersante seleccionado del grupo que consiste en un éster de sacarosa, un lignosulfonato, un alquilglicósido, un condensado de ácido naftalensulfónico formaldehído y éster de fosfato. El insecticida bifentrina puede hallarse presente con una concentración en el intervalo de 0,1g/ml a 0,2 g/ml. El insecticida bifentrina puede hallarse presente en una concentración de aproximadamente 0,17 g/ml. El coeficiente de aplicación del insecticida bifentrina puede estar presente en el intervalo de aproximadamente 0,1 gramos de bifentrina por hectárea (g ai/ha) a aproximadamente 1.000 g ai/ha, más preferiblemente en un intervalo de aproximadamente 1 g ai/ha a aproximadamente 100 g ai/ha.

La bifentrina puede estar presente preferentemente en una concentración del 1,0% en peso al 35% en peso, más particularmente, del 15% en peso al 25% en peso en base al peso total de todos los componentes en la composición. La composición del insecticida bifentrina puede ser formulada de una manera adecuada para la mezcla como un líquido con un fertilizante.

Fungicidas: B0) benzovindiflupir, anitiperonospóricos (tales como ametocradina, amisulbromo, bentiavalicarb, ciazofamida, cimoxanilo, dimetomorf, etaboxam, famoxadona, fenamidona, flumetover, flumorf, fluopicolida, iprovalicarb, mandipropamida, valifenalato, benalaxilo, benalaxilo–M, furalaxilo, metalaxilo y metalaxilo–M), ametocradina, amisulbromo, sales de cobre (por ejemplo, hidróxido de cobre, oxiclورو de cobre, sulfato de cobre, persulfato de cobre), boscalida,

tiflumazida, flutianilo, furalaxilo, tiabendazol, benodanilo, mepronilo, isofetamida, fenfuram, bixafeno, fluxapiroxad, penflufeno, sedaxano, coumoxistrobina, enoxastrobina, flufenoxistrobina, piraoxistrobina, pirametostrobin, triclopiricarb, fenaministrobina, metominostrobin, piribencarb, meptildinocap, acetato de fentina, cloruro de fentina, hidróxido de fentina, oxitetraciclina, clozolinato, cloroneb, tecnazeno, etridiazol, yodocarb, protiocarb, varias cepas de *Bacillus* (por ejemplo, cepas identificadas como CH200, CH201, RT1184, RT1301, QST713, FZB24, MBI600, D747), extracto de *Melaleuca alternifolia*, pyrisoxazol, oxpoconazol, etaconazol, fenpirazamina, fempicoxamida, mefentrifluconazol, naftifina, terbinafina, validamicina, pirimorf, valifenalato, ftalida, probenazol, isotianilo, laminarina, extracto de *Reynoutria sachalinensis*, ácido fosforoso y sales, tecloftalam, triazóxido, piriofenona, aceites orgánicos, bicarbonato de potasio, clorotalonilo, fluoroimida; B1) azoles, incluyendo bitertanol, bromuconazol, ciproconazol, difenoconazol, diniconazol, enilconazol, epoxiconazol, fluquinconazol, fenbuconazol, flusilazol, flutriafol, hexaconazol, imibenconazol, ipconazol, metconazol, miclobutanilo, penconazol, propiconazol, protioconazol, simeconazol, triadimefona, triadimenol, tebuconazol, tetraconazol, triticonazol, procloraz, pefurazoato, imazalilo, triflumizol, ciazofamida, benomilo, carbendazim, tiabendazol, fuberidazol, etaboxam, etridiazol e himexazol, azaconazol, diniconazol-M, oxpoconazol, paclobutrazol, uniconazol, 1-(4-cloro-fenil)-2-([1,2,4]triazol-1-il)-cicloheptanol e imazalilsulfato; B2) estrobilurinas, incluyendo azoxistrobina, dimoxistrobina, enestroburina, fluoxastrobina, kresoxim-metilo, metominostrobin, orisastrobina, picoxistrobina, piraclostrobina, trifloxistrobina, enestroburina, (2-cloro-5-[1-(3-metilobenciloxiimino)etil]bencil)carbamato de metilo, (2-cloro-5-[1-(6-metilpiridin-2-ilmetoxiimino)etil]bencil)carbamato de metilo y 2-(orto-(2,5-

dimetilfeniloximetilen)-fenil)-3-metoxiacrilato de metilo, 2-(2-(6-(3-cloro-2-metil-fenoxi)-5-fluoro-pirimidin-4-iloxi)-fenil)-2-metoxiimino-N-metil-acetamida y éster metílico de ácido 3-metoxi-2-(2-(N-(4-metoxi-fenil)-ciclopropanocarboximidoilsulfanilmetil)-fenil)-acrílico; B3) carboxamidas, incluyendo carboxina, benalaxilo, benalaxilo-M, fenhexamida, flutolanilo, furametpir, mepronilo, metalaxilo, mefenoxam, ofurace, oxadixilo, oxicarboxina, pentiopirad, isopirazam, tifulzamida, tiadinilo, 3,4-dicloro-N-(2-cianofenil)isotiazol-5-carboxamida, dimetomorf, flumorf, flumetover, fluopicolida (picobenzamida), zoxamida, carpropamida, diclocimet, mandipropamida, N-(2-(4-[3-(4-clorofenil)prop-2-iniloxi]-3-metoxifenil)etil)-2-metansulfonil-amino-3-metilbutiramida, N-(2-(4-[3-(4-cloro-fenil)prop-2-iniloxi]-3-metoxi-fenil)etil)-2-etansulfonilamino-3-metilbutiramida, 3-(4-clorofenil)-3-(2-isopropoxycarbonil-amino-3-metil-butirilamino)propionato de metilo, N-(4'-bromobifenil-2-il)-4-difluorometil-metiltiazol-5-carboxamida, N-(4'-trifluorometil-bifenil-2-il)-4-difluorometil-2-metiltiazol-5-carboxamida, N-(4'-cloro-3'-fluorobifenil-2-il)-4-difluorometil-2-metil-tiazol-5-carboxamida, N-(3,4'-dicloro-4-fluorobifenil-2-il)-3-difluoro-metil-1-metil-pirazol-4-carboxamida, N-(3',4'-dicloro-5-fluorobifenil-2-il)-3-difluorometil-1-metilopirazol-4-carboxamida, N-(2-ciano-fenil)-3,4-dicloroisotidazol-5-carboxamida, 2-amino-4-metil-tiazol-5-carboxanilida, 2-cloro-N-(1,1,3-trimetil-indan-4-il)-nicotinamida, N-(2-(1,3-dimetilobutil)-fenil)-1,3-dimetil-5-fluoro-1H-pirazol-4-carboxamida, N-(4'-cloro-3',5-difluoro-bifenil-2-il)-3-difluorometil-1-metil-1H-pirazol-4-carboxamida, N-(4'-cloro-3',5-difluoro-bifenil-2-il)-3-trifluorometil-1-metil-1H-pirazol-4-carboxamida, N-(3',4'-dicloro-5-fluoro-bifenil-2-il)-3-trifluorometil-1-metil-1H-pirazol-4-carboxamida, N-(3',5-difluoro-4'-metil-bifenil-2-il)-3-difluorometil-1-metil-1H-pirazol-4-carboxamida,

N-(3',5-difluoro-4'-metil-bifenil-2-il)-3-trifluorometil-1-metil-1H-pirazol-4-carboxamida, N-(cis-2-biciclopropil-2-il-fenil)-3-difluorometil-1-metil-1H-pirazol-4-carboxamida, N-(trans-2-biciclopropil-2-il-fenil)-3-difluoro-metil-1-metil-1H-pirazol-4-carboxamida, fluopiram, N-(3-etil-3,5,5-trimetil-ciclohexil)-3-formilamino-2-idroxi-benzamida, oxitetraciclina, siltiofam, N-(6-metoxi-piridin-3-il) ciclopropancarboxamida, 2-yodo-N-fenil-benzamida, N-(2-biciclo-propil-2-il-fenil)-3-difluorometil-1-metilpirazol-4-ilcarboxamida, N-(3',4',5'-trifluorobifenil-2-il)-1,3-dimetilpirazol-4-ilcarboxamida, N-(3',4',5'-trifluorobifenil-2-il)-1,3-dimetil-5-fluoropirazol-4-il-carboxamida, N-(3',4',5'-trifluorobifenil-2-il)-5-cloro-1,3-dimetil-pirazol-4-ilcarboxamida, N-(3',4',5'-trifluorobifenil-2-il)-3-fluorometil-1-metilpirazol-4-ilcarboxamida, N-(3',4',5'-trifluorobifenil-2-il)-3-(clorofluorometilo)-1-metilpirazol-4-ilcarboxamida, N-(3',4',5'-trifluorobifenil-2-il)-3-difluorometil-1-metilpirazol-4-ilcarboxamida, N-(3',4',5'-trifluorobifenil-2-il)-3-difluorometil-5-fluoro-1-metilpirazol-4-ilcarboxamida, N-(3',4',5'-trifluorobifenil-2-il)-5-cloro-3-difluorometil-1-metilpirazol-4-ilcarboxamida, N-(3',4',5'-trifluorobifenil-2-il)-3-(clorodifluorometilo)-1-metilpirazol-4-ilcarboxamida, N-(3',4',5'-trifluorobifenil-2-il)-1-metil-3-trifluorometilpirazol-4-ilcarboxamida, N-(3',4',5'-trifluorobifenil-2-il)-5-fluoro-1-metil-3-trifluorometilpirazol-4-ilcarboxamida, N-(3',4',5'-trifluorobifenil-2-il)-5-cloro-1-metil-3-trifluorometilpirazol-4-ilcarboxamida, N-(2',4',5'-trifluorobifenil-2-il)-1,3-dimetilpirazol-4-ilcarboxamida, N-(2',4',5'-trifluorobifenil-2-il)-1,3-dimetil-5-fluoropirazol-4-ilcarboxamida, N-(2',4',5'-trifluorobifenil-2-il)-5-cloro-1,3-dimetilpirazol-4-ilcarboxamida, N-(2',4',5'-trifluorobifenil-2-il)-3-fluorometil-1-metilpirazol-4-ilcarboxamida, N-(2',4',5'-trifluorobifenil-2-il)-3-(clorofluorometil)-1-metilpirazol-4-ilcarboxamida, N-(2',4',5'-trifluorobifenil-2-il)-3-difluorometil-1-metilpirazol-4-ilcarboxamida, N-(2',4',5'-trifluorobifenil-2-il)-3-

difluorometil-5-fluoro-1-metilpirazol-4-ilcarboxamida, N-(2',4',5'-trifluorobifenil-2-il)-5-cloro-3-difluorometil-1-metilpirazol-4-ilcarboxamida, N-(2',4',5'-trifluorobifenil-2-il)-3-(clorodifluorometilo)-1-metilpirazol-4-ilcarboxamida, N-(2',4',5'-trifluorobifenil-2-il)-1-metil-3-trifluorometilpirazol-4-ilcarboxamida, N-(2',4',5'-trifluorobifenil-2-il)-5-fluoro-1-metil-3-trifluorometilpirazol-4-ilcarboxamida, N-(2',4',5'-trifluorobifenil-2-il)-5-cloro-1-metil-3-trifluorometilpirazol-4-ilcarboxamida, N-(3',4'-dicloro-3-fluorobifenil-2-il)-1-metil-3-trifluorometil-1H-pirazol-4-carboxamida, N-(3',4'-dicloro-3-fluorobifenil-2-il)-1-metil-3-difluorometil-1H-pirazol-4-carboxamida, N-(3',4'-difluoro-3-fluorobifenil-2-il)-1-metil-3-trifluorometil-1H-pirazol-4-carboxamida, N-(3',4'-difluoro-3-fluorobifenil-2-il)-1-metil-5-difluorometil-1H-pirazol-4-carboxamida, N-(3'-cloro-4'-fluoro-3-fluorobifenil-2-il)-1-metil-3-difluorometil-1H-pirazol-4-carboxamida, N-(3',4'-dicloro-4-fluorobifenil-2-il)-1-metil-3-trifluorometil-1H-pirazol-4-carboxamida, N-(3',4'-difluoro-4-fluorobifenil-2-il)-1-metil-S-trifluorometil-1H-pirazol-4-carboxamida, N-(3',4'-dicloro-4-fluorobifenil-2-il)-1-metil-3-difluorometil-1H-pirazol-4-carboxamida, N-(3',4'-difluoro-4-fluorobifenil-2-il)-1-metil-3-difluorometil-1H-pirazol-4-carboxamida, N-(3'-cloro-4'-fluoro-4-fluorobifenil-2-il)-1-metil-5-difluorometil-1H-pirazol-4-carboxamida, N-(3',4'-dicloro-5-fluorobifenil-2-il)-1-metil-3-trifluorometil-1H-pirazol-4-carboxamida, N-(3',4'-difluoro-5-fluorobifenil-2-il)-1-metil-3-trifluorometil-1H-pirazol-4-carboxamida, N-(3',4'-dicloro-5-fluorobifenil-2-il)-1-metil-S-difluorometil-1H-pirazol-carboxamida, N-(3',4'-difluoro-5-fluorobifenil-2-il)-1-metil-3-difluorometil-1H-pirazol-4-carboxamida, N-(3',4'-dicloro-5-fluorobifenil-2-il)-1,3-dimetil-1H-pirazol-4-carboxamida, N-(3'-cloro-4'-fluoro-5-fluorobifenil-2-il)-1-metil-3-difluorometil-1H-pirazol-4-carboxamida, N-(4'-fluoro-4-fluorobifenil-2-il)-1-metil-

3-trifluorometil-1H-pirazol-4-carboxamida, N-(4'-fluoro-5-fluorobifenil-2-il)-1-metil-3-trifluorometil-1H-pirazol-4-carboxamida, N-(4'-cloro-5-fluorobifenil-2-il)-1-metil-3-trifluorometil-1H-pirazol-4-carboxamida, N-(4'-metil-5-fluorobifenil-2-il)-1-metil-3-trifluorometil-1H-pirazol-4-carboxamida, N-(4'-fluoro-5-fluorobifenil-2-il)-1,3-dimetil-1H-pirazol-4-carboxamida, N-(4'-cloro-5-fluorobifenil-2-il)-1,3-dimetil-1H-pirazol-4-carboxamida, N-(4'-metil-5-fluorobifenil-2-il)-1,3-dimetil-1H-pirazol-4-carboxamida, N-(4'-fluoro-6-fluorobifenil-2-il)-1-metil-3-trifluorometil-1H-pirazol-4-carboxamida, N-(4'-cloro-6-fluorobifenil-2-il)-1-metil-3-trifluorometil-1H-pirazol-4-carboxamida, N-[2-(1,1,2,3,3,3-hexafluoropropoxi)-fenil]-3-difluorometil-1-metil-1H-pirazol-4-carboxamida, N-[4'-(trifluorometiltio)-bifenil-2-il]-3-difluorometil-1-metil-1H-pirazol-4-carboxamida y N-[4'-(trifluorometiltio)-bifenil-2-il]-1-metil-3-trifluorometil-1-metil-1H-pirazol-4-carboxamida, 3-difluorometil-N-(7-fluoro-1,1,3-trimetil-4-indanil)-1-metil-4-pirazolcarboxamida (fluindapir), 4-difluorometil-N-(7-fluoro-1,1,3-trimetil-4-indanil)-2-metil-5-tiazolcarboxamida, 3-difluorometil-1-metil-N-(1,1,3,7-tetrametil-4-indanil)-pirazolcarboxamida, 4-difluorometil-2-metil-N-(1,1,3,7-tetrametil-4-indanil)-5-tiazolcarboxamida, 3-difluorometil-1-metil-N-(7-metoxi-1,1,3-trimetil-4-indanil)-4-pirazolcarboxamida, 4-difluorometil-2-metil-N-(7-metoxi-1,1,3-trimetil-4-indanil)-5-tiazolcarboxamida, 3-difluorometil-1-metil-N-(7-metiltio-1,1,3-trimetil-4-indanil)-4-pirazolcarboxamida, 4-difluorometil-2-metil-N-(7-metiltio-1,1,3-trimetil-4-indanil)-5-tiazolcarboxamida, 3-difluorometil-1-metil-N-(7-trifluorometoxi-1,1,3-trimetil-4-indanil)-4-pirazolcarboxamida, 4-difluorometil-2-metil-N-(7-trifluorometoxi-1,1,3-trimetil-4-indanil)-5-tiazolcarboxamida, 3-difluorometil-N-(7-fluoro-1,1,3-trimetil-4-indanil)-4-furazancarboxamida, 4-difluorometil-N-(7-fluoro-1,1,3-trimetil-4-

indanil)-2-metiltio-5-pirimidincarboxamida, 3-difluorometil-N-(7-cloro-1,1,3-trimetil-4-indanil)-1-metil-4-pirazolcarboxamida, 3-difluorometil-N-(7-cloro-1,1-dietil-3-metil-4-indanil)-1-metil-4-pirazolcarboxamida o 4-difluorometil-N-(7-fluoro-1,1,3-trimetil-4-indanil)-5-tiadiazolcarboxamida; B4) compuestos heterocíclicos, incluyendo fluazinam, pyrifenox, bupirinato, ciprodinilo, fenarimol, ferimzona, mepanipirim, nuarimol, pirimetanilo, triforina, fenciclonilo, fludioxonilo, aldimorf, dodemorf, fenpropimorf, tridemorf, fenpropidina, iprodiona, procimidona, vinclozolina, famoxadona, fenamidona, octilinona, probenazol, 5-cloro-7-(4-metil-piperidin-1-il)-6-(2,4,6-trifluorofenil)-[1,2,4]triazolo[1,5-a]pirimidina, anilazina, diclomezina, piroquilona, proquinazida, triciclazol, 2-butoxi-6-yodo-3-propilcromen-4-ona, acibenzolar-S-metilo, captafol, captano, dazomet, folpet, fenoxanilo, quinoxifeno, N,N-dimetil-3-(3-bromo-6-fluoro-2-metiloindol-1-sulfonyl)-[1,2,4]triazol-1-sulfonamida, 5-etil-6-octil-[1,2,4]triazolo[1,5-a]pirimidin-2,7-diamina, 2,3,5,6-tetracloro-4-metansulfonyl-piridina, 3,4,5-tricloro-piridin-2,6-dicarbonitrilo, N-(1-(5-bromo-3-cloro-piridin-2-il)-etilo)-2,4-dicloro-nicotinamida, N-((5-bromo-3-cloropiridin-2-il)-metil)-2,4-dicloro-nicotinamida, diflumetorim, nitrapirina, acetato de dodemorf, fluoroimida, blasticidina-S, quinometionato, debacarb, difenzoquat, difenzoquat-metilsulfato, ácido oxolínico y piperalina; B5) carbamatos, incluyendo mancozeb, maneb, metam, metasulfocarb, metiram, ferbam, propineb, tiram, zineb, ziram, dietofencarb, iprovalicarb, bentiavalicarb, propamocarb, clorhidrato de propamocarb, N-(1-(1-(4-cianofenil)-etansulfonyl)but-2-il)carbamato de 4-fluorofenilo, 3-(4-cloro-fenil)-3-(2-isopropoxycarbonilamino-3-metil-butirilamino)propanoato de metilo; o B6) otros fungicidas, incluyendo guanidina, dodina, base libre de dodina, iminoctadina, guazatina, antibióticos: kasugamicina, oxitetraciclina y sus sales, estreptomycin, polioxina, validamicina A, derivados de

nitrofenilo: binapacril, dinocap, dinobutona, compuestos de heterociclilo con contenido de azufre: ditionona, isoprotiolano, compuestos organometálicos: sales de fentina, compuestos de organofósforo: edifenfos, iprobenfos, fosetilo, fosetil–aluminio, ácido fosforoso y sus sales, pirazofos, tolclofos–metilo, compuestos de organocloro: diclofluanida, flusulfamida, hexaclorobenceno, ftalida, pencicurona, quintoceno, tiofanato, tiofanato–metilo, tolilfluanida, otros: ciflufenamida, cimoxanilo, dimetirimol, etirimol, furalaxilo, metrafenona y espiroxamina, acetato de guazatina, triacetato de iminoctadina, tris(albesilato) de iminoctadina, clorhidrato hidrato de kasugamicina, diclorofeno, pentaclorofenol y sus sales, N–(4–cloro–2–nitro–fenil)–N–etil–4–metil–bencensulfonamida, diclorano, nitotal–isopropilo, tecnazeno, bifenilo, bronopol, difenilamina, mildiomicina, oxincobre, prohexadiona calcio, N–(ciclopropilmetoxiimino–(6–difluorometoxi–2,3–difluoro–fenil)–metil)–2–fenilacetamida, N'–(4–(4–cloro–3–trifluorometil–fenoxi)–2,5–dimetil–fenil)–N–etil–N–metilformamidina, N'–(4–(4–fluoro–3–trifluorometil–fenoxi)–2,5–dimetil–fenil)–N–etil–N–metilformamidina, N'–(2–metil–5–trifluorometil–4–(3–trimetilosilanil–propoxi)–fenil)–N–etil–N–metilformamidina y N'–(5–difluorometil–2–metil–4–(3–trimetilosilanil–propoxi)–fenil)–N–etil–N–metilformamidina.

Se destacan mezclas de la cepa RTI545 de *Bacillus thuringiensis* con otras cepas de biocontrol que incluyen cepas de *Bacillus subtilis* tales como CH201 o QST713 o MBI600 o RTI477, cepas de *Bacillus licheniformis* tales como CH200 o RTI184, cepas de *Bacillus velezensis* tales como RTI301, *Bacillus subtilis* var. *amiloliquefaciens* FZB24 o *Bacillus amiloliquefaciens* D747 o combinaciones de ellos para el control de enfermedades fúngicas.

En las composiciones y métodos de la presente descripción, la composición puede incluir un fungicida químico.

Se prefieren mezclas de la cepa *thuringiensis* de *Bacillus thuringiensis* RTI545 con agentes de control fúngicos químicos que comprenden tiabendazol, fluxapiraxad, penflufeno, sedaxano, bitertanol, ciproconazol, difenoconazol, fluquinconazol, flutriafol, ipconazol, miclobutanilo, protioconazol, triadimefona, triadimenol, tebuconazol, triticonazol, procloraz, imazalilo, benomilo, carbendazim, himexazol, azoxistrobina, fluoxastrobina, piraclostrobina, trifloxistrobina, carboxina, flutolanilo, metalaxilo, mefenoxam, pentiopirad, fluopiram, siltiofam, fluazinam, pirimetanilo, fludioxonilo, iprodiona, triciclazol, captano, dazomet, mancozeb, metam, tiram, guazatina, tolclofos–metilo, pencicurona, tiofanate–metilo, fempicoxamida, mefentrifluconazol, fluindapir o cualquiera de sus mezclas.

Se prefieren más las mezclas de la cepa RTI545 de *Bacillus thuringiensis* con fludioxonilo, protioconazol, mefenoxam, metalaxilo, tebuconazol, difenoconazol, tiram, carboxina, carbendazim, triticonazol, pencicurona, imazalilo, piraclostrobina, sedaxano, trifloxistrobina, fluquinconazol, fluoxastrobina, azoxistrobina, flutriafol, fluxapiraxad, pentiopirad, fempicoxamida, mefentrifluconazol, fluindapir o mezclas de ellos.

Herbicidas: C1) inhibidores de acetil–CoA carboxilasa (ACC), por ejemplo, éteres de oxima de ciclohexenona, tales como aloxidim, cletodim, cloproxidim, cicloxidim, setoxidim, tralcoxidim, butroxidim, clefoxidim o tepraloxidim; éteres fenoxifenoxipropiónicos tales como clodinafop–propargilo, cihalofop–butilo, diclofop–metilo, fenoxaprop–etilo, fenoxaprop–P–etilo, fentiapropetilo, fluazifop–butilo, fluazifop–P–butilo, haloxifop–etoxietilo, haloxifop–metilo, haloxifop–P–metilo, isoxapirifop, propaquizafop, quizalofop–etilo, quizalofop–P–etilo o quizalofop–tefurilo; o ácidos arilaminopropiónicos tales como flamprop–metilo o flamprop–isopropilo; inhibidores de C2 acetolactato sintasa (ALS), por ejemplo, imidazolinonas, tales como

imazapir, imazaquina, imazametabenz–metilo (imazame), imazamox, imazapic o imazetapir; éteres de pirimidilo tales como ácido de piritiobac, piritiobac–sodio, bispiribac–sodio; KIH–6127 o piribenzoxim; sulfonamidas, tales como florasulam, flumetsulam o metosulam; o sulfonilureas, tales como amidosulfurona, azimsulfurona, bensulfurona–metilo, clorimurona–etilo, clorsulfurona, cinosulfurona, ciclosulfamurona, etametsulfurona–metilo, etoxisulfurona, flazasulfurona, halosulfurona–metilo, imazosulfurona, metsulfurona–metilo, nicosulfurona, primisulfurona–metilo, prosulfurona, piyrazosulfurona–etilo, rimsulfurona, sulfometurona–metilo, tifensulfurona–metilo, triasulfurona, tribenurona–metilo, triflusulfurona–metilo, tritosulfurona, sulfosulfurona, foramsulfurona o yodosulfurona; C3) amidas, por ejemplo, alidoclor (CDAA), benzoilprop–etilo, bromobutide, ciortiamida, difenamida, etobenzanidibenzclomet), flutiamida, fosamina o monalida; C4) herbicidas de auxina, por ejemplo, ácidos piridincarboxílicos tales como clopiralida o picloram; o 2,4–D o benazolina; C5) inhibidores del transporte de auxina, por ejemplo, naptalame ordiflufenzopir; C6) inhibidores de la biosíntesis de carotenoides, por ejemplo, benzofenap, clomazona (dimetazona), diflufenican, fluorocloridona, fluridona, pirazolinato, pirazoxifeno, isoxaflutol, isoxaclortol, mesotriona, sulcotriona (clormesulona), ketospiradox, flurtamona, norflurazona o amitrol; C7) inhibidores de enolpiruvilshikimato–3–fosfato sintasa (EPSPS), por ejemplo, glifosato o sulfosato; C8) inhibidores de la glutamina sintetasa, por ejemplo, bilanafos (bialaphos) o glufosinato–amonio; C9) inhibidores de la biosíntesis de lípidos, por ejemplo, anilidas, tales como anilofos o mefenacet; cloroacetanilidas, tales como dimetenamida, S–dimetenamida, acetoclor, alaclor, butaclor, butenaclor, dietetil–etilo, dimetaclor, metazaclor, metolaclor, S–metolaclor, pretilaclor, propaclor, prinaclor, terbuclor, tenilclor o xylaclor; tioureas, tales como butilato, cicloato, di–alato,

dimepiperato, EPTC, esprocarb, molinato, pebulato, prosulfocarb, tiobencarb (bentiocarb), tri-alato o vemolato; o benfuresato o perfluidona; C10) inhibidores de la mitosis, por ejemplo, carbamatos, tales como asulam, carbetamida, clorprofam, orbencarb, pronamida (propizamida), profam o tiocarbazilo; dinitroanilinas, tales como benefina, butralina, dinitramina, etalfluralina, flucloralina, orizalina, pendimetalina, prodiamina o trifluralina; piridinas, tales como ditiopir o tiazopir; o butamifos, clortal-dimetilo (DCPA) o hidrazida maleica; C11) inhibidores de la protoporfirinógeno IX oxidasa, por ejemplo, éteres difenólicos, tales como acifluorfenó, acifluorfenó-sodio, aclonifeno, bifenox, clomitrofenó (CNP), etoxifeno, fluorodifeno, fluoroglicofeno-etilo, fomesafenó, furiloxifeno, lactofeno, nitrofenó, nitrofluorfenó u oxifluorfenó; oxadiazoles, tales como oxadiargilo u oxadiazona; imidas cíclicas, tales como azafenidina, butafenacilo, carfentrazona-etilo, cinidona-etilo, flumiclorac-pentilo, flumioxazina, flumipropino, flupropacilo, flutiacet-metilo, sulfentrazona o tidiazimina; o pirazoles, tales como ET-751.JV 485 o nipiraclofenó; C12) inhibidores de la fotosíntesis, por ejemplo, propanilo, piridato o piridafol; benzotiadiazinonas, tales como bentazona; dinitrofenoles, por ejemplo, bromofenoxim, dinoseb, acetato de dinoseb, dinoterb o DNOC; dipiridilenos, tales como cloruro de ciperquat, metilsulfato de difenzoquat, diquat o dicloruro de paraquat; ureas, tales como clorbromurona, clorotolurona, difenoxurona, dimefurona, diurona, etidimurona, fenurona, fluometurona, isoproturona, isourona, linurona, metabenzthiazurona, metazol, metobenzurona, metoxurona, monolinurona, neburona, sidurona o tebutiurona; fenoles, tales como bromoxinilo o ioxinilo; cloridazona; triazinas, tales como ametrina, atrazina, cianazina, desmeína, dimetametrina, hexazinona, prometona, prometrina, propazina, simazina, simetrina, terbumetona, terbutrina, terbutilazina o trietazina; triazinonas, tales como metamitrona o metribuzina; uracilos, tales como bromacilo,

lenacilo o terbacilo; o biscarbamatos, tales como desmedifam o fenmedifam; C13) sinergistas, por ejemplo, oxiranos, tales como tridifeno; C14) inhibidores de la síntesis de la pared celular CIS, por ejemplo, isoxabeno o diclobenilo; C16) varios otros herbicidas, por ejemplo, ácidos dicloropropiónicos, tales como dalapona; dihidrobenzofuranos, tales como etofumesato; ácidos fenilacéticos, tales como clorfenac (fenac); o aziprotrina, barban, bensulida, benztiazurona, benzofluor, buminafos, butidazol, buturona, cafenstrol, clorbufam, clorfenprop–metilo, cloroxurona, cinmetiloína, cumilurona, ciclurona, ciprazina, ciprazol, dibencilurona, dipropetrina, dimrona, eglinazina–etilo, endotall, etiozina, flucabazona, fluorbentranilo, flupoxam, isocarbamida, isopropalina, karbutilato, mefluidide, monurona, napropamida, napropamida–M, napropanilida, nitalina, oxaciclomefona, fenisofam, piperofos, prociazina, profluralina, piributicarb, secbumetona, sulfalato (CDEC), terbucarb, triaziflam, triazofenamida o trimeturona; o sus sales compatibles para el medio ambiente.

Nematicidas o bionematicidas: Benomilo, cloetocarb, aldoxicarb, tirpato, diamidafos, fenamifos, cadusafos, diclofentiona, etoprofos, fensulfotiona, fostiazato, heterofos, isamidofof, isazofos, fosfocarb, tionazina, imiciafos, mecarfona, acetoprol, benclotiaz, oxamilo, cloropicrina, dazomet, fluensulfona, 1,3–dicloropropeno (telona), disulfuro de dimetilo, metam sodio, metam potasio, sal de metam (todos generadores de MITC), bromuro de metilo, enmiendas biológicas para suelos (por ejemplo, semillas de mostaza, extractos de semillas de mostazas), fumigación de vapor de suelo, isotiocianato de alilo (AITC), sulfato de dimetilo, furfural (aldehído), fluazaindolizina (DPX–Q8U80), fluopiram o tioazafeno.

Se prefieren mezclas de la cepa RTI545 de *Bacillus thuringiensis* con agentes de control de nematodos químicos que comprende benomilo, fenamifos, cadusafos,

etoprofos, fostiazato, cloropicrina, dazomet, fluensulfona, oxamilo, 1,3-dicloropropeno (telona), metam sódico, metam potásico, sal de metam (todos generadores de MITC), bromuro de metilo, isotiocianato de alilo (AITC), fluazaindolizina (DPX-Q8U80), tioxazafeno, fluopiram o cualquiera de sus mezclas.

Se prefieren más las mezclas de la cepa RTI545 de *Bacillus thuringiensis* con cadusafos, etoprofos, fostiazato, fluensulfona, oxamilo, fluazaindolizina (DPX-Q8U80), tioxazafeno o cualquiera de sus mezclas. En las composiciones y métodos de la presente descripción, la composición puede incluir el nematocida cadusafos.

Los reguladores del crecimiento de plantas apropiados de la presente invención incluyen los siguientes: reguladores del crecimiento de plantas: D1) Antiauxinas, tales como ácido clofíbrico, ácido 2,3,5-tri-yodobenzoico; D2) Auxinas tales como 4-CPA, 2,4-D, 2,4-DB, 2,4-DEP, diclorprop, fenoprop, IAA, IBA, naftalenacetamida, ácidos α -naftalenacético, 1-naftol, ácidos naftoxiacéticos, naftenato de potasio, naftenato de sodio, 2,4,5-T; D3) citoquinas, tales como 2iP, benciladenina, alcohol de 4-hidroxifenetilo, kinetina, zeatina; D4) defoliantes, tales como cianamida de calcio, dimetipina, endotal, etefona, merfos, metoxurona, pentaclorofenol, tidiazurona, tribufos; D5) inhibidores de etileno, tales como aviglicina, 1-metilciclopropeno; D6) liberadores de etileno, tales como ACC, etacelasilo, etefona, glioxima; D7) gametocidas, tales como fenridazona, hidrazida maleica; D8) gibberelinas, tales como gibberelinas, ácido gibberélico; D9) inhibidores del crecimiento, tales como ácido abscísico, ancimidol, butralina, carbarilo, clorfonio, clorprofam, dikegulac, flumetralina, fluoridamida, fosamina, glifosina, isopirimol, ácido jasmónico, hidrazida maleica, mepiquat, piproctanilo, prohidrojasmona, profam, tiaojiean, ácido 2,3,5-tri-yodobenzoico; D10) morfactinas, tales como clorflureno, clorflurenol, diclorflurenol, flurenol; D11) retardantes del crecimiento, tales como

cloromequat, daminozida, flurprimidol, mefluidide, paclobutrazol, tetciclacis, uniconazol; D12) estimuladores del crecimiento, tales como brassinolida, brassinolida-etilo, DCPTA, forclorfenurona, himexazol, prosuler, triacontanol; D13) reguladores del crecimiento de plantas no clasificados, tales como bachmedesh, benzofluor, buminafos, carvona, cloruro de colina, ciobutide, clofencet, cianamida, ciclanilida, cicloheximida, ciprosulfamida, epocoleona, eticlozato, etileno, fufentiourea, furalano, heptopargilo, holosulf, inabenfida, karetazano, arsenato de plomo, metasulfocarb, prohexadiona, pidanona, sintofeno, triapentenol, trinexapac.

Las formulaciones químicas de la presente invención pueden estar en cualquier forma adecuado o convencional, por ejemplo de una emulsión concentrada (EC), una suspensión concentrada, una suspoemulsión (SE), una suspensión de cápsulas (CS), gránulos dispersables en agua (WG), gránulos emulsionables e (EG), una suspensión de agua en aceite (EO), una evolución de aceite en agua (EW), una microemulsión (ME), una dispersión de aceite (OD), un producto escurrible miscible (OF), un líquido miscible con aceite (OL), un concentrado soluble (SL), una susp de espuma expansible (EF), una suspensión de volumen ultra bajo (SU), un líquido de volumen ultra bajo (UL), un concentrado dispersable (DC), un polvo humectable (WP) o gránulos (G) de varios tamaños que se pueden depositar al momento de la plantación o cualquier formulación técnicamente factible en combinación con adyuvantes aceptables desde el punto de vista agrícola.

En formas de realización, la composición puede comprender: 0,5–99% en peso de un cultivo biológico puro de *Bacillus thuringiensis* RTI545 depositado como ATCC No. PTA–122161 o un mutante de este que tiene todas sus características de identificación de no menos de aproximadamente 1×10^{11} UFC/g y un adyuvante aceptable para uso agrícola. En al menos una forma de realización, el ingrediente

activo que comprende las especies de *Bacillus* está presente en concentraciones totales que varían de 0,5% a aproximadamente 95% en peso de la composición agrícola, tales como en la que la especie *Bacillus* está presente en una cantidad independientemente seleccionada de un límite inferior de 1, 2, 3, 4 ó 5, 7, 8 o 10% en peso a un límite superior de 10, 15, 20, 25, 40, 50, 60, 70, 80 o 90% en peso de la composición total. En otra forma de realización, los adyuvantes aceptables para uso agrícola representan aproximadamente 1% a aproximadamente 99,5%, tal como de un límite inferior de 1, 2, 3, 4 ó 5% en peso hasta un límite superior de 10, 15, 20, 25, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ó 95% en peso de la composición total.

En formas de realización, el adyuvante se puede seleccionar del grupo que consiste en portadores líquidos, portadores sólidos, los agentes de acción superficial (tensioactivos), modificadores de viscosidad, espesantes, aditivos reológicos, agentes estructurantes, conservantes, agentes biocidas o biostáticos, anticongelantes, inhibidores de cristalización, agentes de suspensión, colorantes, anti-oxidantes, agentes espumantes, absorbentes de luz, auxiliares de mezcla, antiespumantes, agentes complejantes, sustancias y buffers neutralizantes o modificadores del pH, inhibidores de corrosión, fragancias, agentes humectantes, potenciadores de la absorción, micronutrientes, plastificantes, deslizantes, lubricantes y dispersantes.

Los portadores pueden ser líquidos o sólidos. Los adyuvantes que se pueden usar en tales formulaciones incluyen agentes tensioactivos, modificadores de viscosidad, tales como espesantes, conservantes, agentes biocidas o biostáticos, anticongelantes, inhibidores de cristalización, inhibidores de la suspensión, colorantes, anti-oxidantes, agentes espumantes, absorbentes de luz, auxiliares de mezcla, antiespumantes, agentes complejantes, sustancias y buffers neutralizantes o

modificadores del pH, inhibidores de corrosión, fragancias, agentes humectantes, potenciadores de la absorción, micronutrientes, plastificantes, deslizantes, lubricantes, dispersantes y también fertilizantes sólidos y líquidos.

En formas de realización, las composiciones de esta invención se pueden formular como un concentrado en suspensión (SC), polvo humectable (WP) o gránulo humectable (WG). Otras formulaciones incluyen polvos dispersables en agua para tratamiento de suspensión (WS), dispersiones oleosas (OD), gránulos para aplicaciones al voleo (GR), suspensiones de cápsulas (CS), concentrados emulsionables (EC), emulsiones en agua (EW), concentrados solubles SL), formulaciones mixtas de una CS y un SC (ZC), formulaciones mixtas de un SC y una EW como suspo-emulsiones (SE), una suspensión de espuma expansible (EF) o formulaciones mixtas de una CS y una EW (ZW) . En algunas formas de realización las composiciones se pueden formular como polvillos o polvos o gránulos que se pueden aplicar a la planta, a la parte de la planta, semilla o suelo como una formulación seca (por ejemplo, un recubrimiento de semilla seco sobre maní o un polvillo, polvo o gránulos de varios tamaños para incorporación al suelo).

Los portadores líquidos incluyen solventes y cosolventes que incluyen agua, éter de petróleo, aceites vegetales, anhídridos ácidos, acetato de amilo, carbonato de butileno, ciclohexano, ciclohexanol, alcohol diacetona, 1,2-dicloropropano, dietanolamina, dietilenglicol, abietato de dietilenglicol, dietilenglicol butiléter, dietilenglicoletiléter, dietilenglicolmetiléter, 1,4-dioxano, dipropilenglicol, dipropilenglicolmetiléter, dibenzoato de dipropilenglicol, diproxitol, alquilpirrolidona, 2-etilhexanol, carbonato de etileno, 1,1,1-tricloroetano, alfa-pineno, d-limoneno, acetato de etilo, etilenglicol, etilenglicolbutiléter, etilenglicolmetiléter, gamma-butirolactona, glicerol, acetato de glicerol, diacetato de glicerol, triacetato de glicerol,

hexadecano, hexilenglicol, acetato de isobornilo, isooctano, isoforona, miristato de isopropilo, ácido láctico, laurilamina, óxido de mesilo, metoxipropanol, laurato de metilo, octanoato de metilo, oleato de metilo, cloruro de metileno, n-hexano, n-octilamina, ácido octadecanoico, acetato de octilamina, ácido oleico, oleilamina, polietilen glicol (PEG), ácido propiónico, lactato de propilo, carbonato de propileno, propilenglicol, propilenglicolmetiléter, fosfato de trietilo, trietilenglicol, ácido xilenosulfónico, parafina, aceite mineral, tricloroetileno, percloroetileno, alcoholes de peso molecular más alto, tales como alcohol amílico, alcohol tetrahidrofurfurílico, hexanol, octanol, amidas líquidas como N,N-dimetiloctanamida, N,N-dimetildecanamida, N-metil-N-(2-propilheptil)-acetamida, N-metil-N-(2-propilheptil)-formamida, N-metil-2-pirrolidona y similares. Con preferencia, los portadores líquidos son tales que los agentes activos biológicos permanecen esencialmente sin cambios en la composición hasta después de aplicar al locus de control. El agua generalmente es el portador de elección para diluir las formulaciones concentradas.

Los portadores sólidos adecuados incluyen, por ejemplo, carbohidratos que incluyen mono o di carbohidratos tales como sacarosa, oligo o polisacárido tales como maltodextrina o pectina, talco, dióxido de titanio, arcilla pirofilita, arcilla atapulgita, kieselguhr, sílice (dióxido de silicio), piedra caliza, bentonita, montmorillonita de calcio, sales solubles en agua tales como sales de sodio, potasio, magnesio, calcio o amonio de acetato, carbonato, cloruro, citrato, fosfato o sulfato tales como carbonato de calcio, cáscaras de semillas de algodón, harina de trigo, harina de soja, piedra pómez y aserrín, cáscaras de nuez molida, lignina y sustancias similares, extractos de levaduras, harina de pescado o mezclas de estas. Los portadores sólidos destacados incluyen maltodextrina, sílice, carbonato de calcio y cualquiera de sus mezclas.

Los agentes activos de superficie que incluyen tensioactivos, dispersantes y emulsionantes, agentes potenciadores de la viscosidad, solventes y otros adyuvantes pueden constituir de modo independiente entre aproximadamente 0,1% y aproximadamente 25% en peso de la formulación final.

Las composiciones contienen una sustancia activa de superficie (tensioactivos, dispersantes y emulsionantes) de una gran variedad de sustancias conocidas en la técnica también están comercialmente disponibles. Las sustancias activas de superficie (descriptas en la presente en general como tensioactivos) pueden ser aniónicas, catiónicas, no iónicas o poliméricas se pueden usar como tensioactivos, dispersantes, emulsionantes, agentes humectantes o agentes de suspensión o para otros propósitos.

Los tensioactivos pertenecen a clases diferentes tales como tensioactivos catiónicos, tensioactivos aniónicos, tensioactivos no iónicos, tensioactivos iónicos y tensioactivos anfotéricos. De acuerdo con la invención, el tensioactivo puede ser cualquier tensioactivo o combinación de dos o más tensioactivos útiles para dispersar los ingredientes activos biológicos en formulación o mezcla en tanque para su aplicación. Las cantidades de tensioactivo en las composiciones de esta invención pueden variar de aproximadamente 1 a aproximadamente 15 % o aproximadamente 1 a aproximadamente 10%, con preferencia aproximadamente 3 a aproximadamente 8% y con más preferencia aproximadamente 5 a aproximadamente 7% p/p.

Ejemplos de algunos tensioactivos preferidos incluyen tensioactivos catiónicos, no iónicos, aniónicos y/o anfotéricos.

Los tensioactivos no iónicos adecuados para esta invención incluyen alcoholes lineales etoxilados, alquil fenol etoxilado, copolímero de alquil EO/PO,

polialquilenglicolmonobutíler de ácidos grasos/aceites etoxilados, laurato de sorbitano, polisorbato, oleato de sorbitano, alcoholes de ácidos grasos etoxilados o alquilfenoles, alcanolamidas o alquillamidas, (tales como dietanolamida, monoisopropanolamida de ácido láurico y miristamida etoxilada), ésteres de polioxietilénácido graso, éteres de polioxietileno–alcohol graso (tales como alquilaril poliglicol éteres), productos de adición de alquilfenol/óxido de alquileo, tales como etoxilato de nonilfenol; productos de adición de alcohol/óxido de alquileo, tales como etoxilato de tridecilaalcohol.

Los tensioactivos aniónicos incluyen alquil–, alquilaril– y arilsulfonatos o sus sales (tales como sales de sodio, potasio y calcio de lauril sarcosinato, alquilbencensulfonato, dodecibencensulfonato, alquilnaftalensulfonatos tales como dibutilnaftalensulfonato o sulfonatos de olefina C_{14-16}), alquil–, alquilaril– y arilsulfates o sus sales (tales como sales de sodio, potasio y calcio de sulfato de tridedet, sulfato de laurilo, sulfato de decilo y laurilsulfato de dietanolamonio), hidrolizados de proteínas, derivados de ácido policarboxílico, (tales como lauril éter carboxilato de amonio), sulfonatos de olefina (tales como sulfonato de alfa olefina de sodio), sarcosinatos (tales como ciclohexil palmitoil taurinato de amonio), succinatos (tales como N–octadecilsulfosuccinamato disódico), derivados de fósforo (tales como ésteres de ácido fosfórico y sales equivalentes).

Los tensioactivos catiónicos incluyen cloruro de alquilbenciltrimetilamonio, lauril sulfato de amonio y óxido de lauramina.

En algunas formas de realización, los tensioactivos se pueden usar como agentes espumantes que permiten que la formulación sea espumable para aplicarse a la semilla o en el surco en el momento de la plantación. La composición espumable

opcionalmente se puede diluir con agua y mezclar con un gas presurizado tal como aire en una cámara de espumado que comprende un medio espumante como una pluralidad de perlas de vidrio.

Los agentes espumantes adecuados pueden ser tensioactivos no iónicos que incluyen alcanolamidas o alquilamidas tales como cocamida dietanolamida, monoisopropanolamida del ácido láurico y miristamida etoxilada), ésteres de polioxietilen ácido graso, éteres de polioxietileno alcohol graso (tales como alquilaril poliglicol éteres), y fluorocarbonos (tales como alcohol polifluorado etoxilado); tensioactivos aniónicos que incluyen alquil-, alquilaril y arilsulfonatos (tales como lauril sarcosinato de sodio y tales como alquilbencensulfonato de sodio), alquil-, alquilaril- y arilsulfatos, hidrolizados de proteína, derivados de ácido policarboxílico (tales como lauril éter carboxilato de amonio), sulfonatos de olefina (tales como sulfonato de alfa olefina de sodio), sarcosinatos (tales como ciclohexil palmitoil taurinato de amonio), succinatos (tales como N-octadecil sulfosuccinamato disódico), derivados de fósforo (tales como ésteres de ácido fosfórico y sus sales equivalentes); tensioactivos catiónicos que incluye cloruro de alquilbenciltrimetilamonio; y tensioactivos anfotéricos que incluyen betaína. Los agentes espumantes particularmente preferidos incluyen dodecilbencensulfonato de sodio (por ejemplo, Bio-Soft® D-40), sulfonato de olefina C₁₄₋₁₆ de sodio (por ejemplo Bioterge® AS-40), óxido de lauramina (por ejemplo Ammonix® DO, Ammonix® LO) lauril sulfato de butilo (por ejemplo Steol®), sodio (Cedepal® TD-407) y alquil sulfatos (por ejemplo, Polistep® B-25). La concentración total de los agentes espumantes en la formulación será dependiente de los agentes espumantes utilizados comprenden entre aproximadamente 0,1% y aproximadamente 50% de la formulación espumable concentrada, con preferencia entre aproximadamente 0,3% y aproximadamente 30%

con más preferencia entre aproximadamente 5% y 25% e incluso con más preferencia entre aproximadamente 17% y aproximadamente 23%.

Entre las formas de realización destacadas se incluyen aquellas en las que el volumen de la espuma generada por la formulación se reduce en 25% (o menos) después de aproximadamente 45 minutos o más. Otras sustancias activas de superficie incluyen jabones, tales como estearato sódico; dialquil ésteres de sales sulfosuccinato, tales como di(2-etilhexil)sulfosuccinato de sodio; ésteres de sorbitol, tales como oleato de sorbitol; aminas cuaternarias, tales como cloruro de lauriltrimetilamonio, polietilén glicol ésteres de ácidos grasos, tales como estearato de polietilén glicol; copolímeros en bloque de óxido de etileno y óxido de propileno; y sales de mono- y di-alquilfosfato ésteres.

También son adecuados los tensioactivos de silicona, especialmente los heptametiltriloxanos modificados con óxido de polialquilo que están comercialmente disponibles, por ejemplo, como Silwet L-77® y también tensioactivos perfluorados.

De estos, algunos de tipos aún más específicos de tensioactivos preferidos incluyen tensioactivos no iónicos de etoxilato de alcohol lineal o ramificado, tensioactivos aniónicos de éster de ácido fosfórico (a veces denominados tensioactivos de "ésteres de fosfato") y tensioactivos catiónicos de aminas de sebo etoxilada.

Los tensioactivos destacados (dispersantes) comprenden al menos un alquiltoliglicósido, con preferencia que comprende grupos alquílicos C₈-C₁₄. Los productos Agnique® de BASF Corporation (Cognis) son representativos. En una forma de realización, el tensioactivo de alquil d-glicopiranósido incluye una mezcla de alquil C₈-C₁₀ d-glucopiranósidos, tales como Agnique® PG8105-G. En otra forma

de realización, el tensioactivo alquil d-glucopiranosido incluye una mezcla de alquil C₉–C₁₁ d-glucopiranosidos. Un producto preferido es Agnique® PG9116 que es una mezcla de alquil C₉–C₁₁ d-glucopiranosidos, que tiene un grado de polimerización de aproximadamente 1,6 y un equilibrio hidrofílico–lipofílico (HLB) de aproximadamente 13.1.

Los tensioactivos de ésteres de fosfato (dispersantes) pueden comprender ésteres de fosfato de alcoholes, alcoholes etoxilados o fenol etoxilado. Estos pueden estar en forma de ácido libre o neutralizado como sales de sodio, potasio o amonio. Los productos Dextrol® de Ashland Corporation son representativos, tales como Dextrol® OC–180. El éster de fosfato se selecciona con preferencia de éster de fosfato de nonil fenol y una sal potásica de fosfato alcohol tridecílico etoxilado.

En este aspecto, la composición puede contener un espesante, un modificador de la viscosidad, un aditivo reológico o un agente estructurante que estabiliza las formulaciones tales como concentrados en suspensión o dispersiones de aceite frente a la decantación o sedimentación. Los espesantes adecuados son arroz, almidón, goma arábiga, goma tragacanto, harina de guar, goma británica, ésteres de almidón y ésteres de almidón, resinas de goma, galactomananos, silicato de magnesio y aluminio, goma de xantano, carragenano, derivados de celulosa, metil celulosa, carboximetilcelulosa, alginatos y sus combinaciones. Otros productos comerciales conocidos pueden incluir Lattice NTC 50, Lattice NTC 60, metocel, arcilla y sílice veegum.

En otra forma de realización, las composiciones de esta invención pueden contener un agente anticongelante como glicerina, etilenglicol, propilen glicol, urea, cloruro de calcio, nitrato de sodio, cloruro de magnesio y sulfato de amonio.

Los conservantes adecuados incluyen, pero sin limitación, benzoatos de alquilo C₁₂ a C₁₅, p-hidroxibenzoatos de alquilo, extracto de aloe vera, ácido ascórbico, cloruro de benzalconio, ácido benzoico, ésteres de ácido benzoico de alcoholes C₉ a C₁₅, hidroxitolueno butilado, hidroxianisol butilado, ter-butilhidroquinona, aceite de ricino, alcoholes cetílicos, clorocresol, ácido cítrico, manteca de cacao, aceite de coco, diazolidinil urea, adipato de diisopropilo, dimetil polisiloxano, DMDM hidantoína, etanol, ácido etilendiaminotetraacético, ácidos grasos, alcoholes grasos, alcohol hexadecílico, ésteres de hidroxibenzoato, butilcarbamato de yodopropino, iso-nonanoato de isononilo, aceite de jojoba, aceite de lanolina, aceite mineral, ácido oleico, aceite de oliva, parabenos, poliéteres, polioxipropilen butil éter, polioxipropilen cetil éter, sorbato de potasio, galato de propilo, aceites de silicona, propionato de sodio, benzoato de sodio, bisulfito de sodio, ácido sórbico, ácido graso esteárico, dióxido de azufre, vitamina E, acetato de vitamina E y derivados, ésteres, sales y mezclas de estos. Los conservantes preferidos incluyen o-fenilfenato de sodio, 5-cloro-2-metil-4-isotiazolin-3-ona, 2-metil-4-isotiazolin-3-ona y 1,2-benisotiazolin-3-ona.

Los agentes antiespumantes tales como Xiameter AFE-100, Dow Corning AFs, Dow Corning 1520, 1530 o 1540 también se pueden usar en las formulaciones reivindicadas en la presente.

En formas de formas de realización, la composición puede ser un concentrado en suspensión líquida que comprende agua y al menos un agente activo de superficie y uno o más adyuvantes adicionales. En formas de formas de realización, el uno o más adyuvantes se puede seleccionar de espesantes, modificadores de viscosidad, agentes estructurantes o aditivos reológicos, solventes, conservantes, agentes anticongelantes y agentes antiespumantes. Normalmente, el concentrado en

suspensión también se diluye con agua antes de la administración de la composición. En formas de formas de realización, la composición líquida puede ser un concentrado en suspensión que comprende de 0,5 a 20% en peso de un cultivo biológicamente puro de *Bacillus thuringiensis* RTI545 o una mutante de este que tiene todas sus características de identificación; 1 a 5% en peso de uno o más agentes activos de superficie; y al menos un espesante, solvente, conservante, agente anticongelante o agente antiespumante cada uno de modo independiente que comprende hasta aproximadamente 1% en peso de la composición.

En otras formas de realización, la composición puede ser una dispersión oleosa líquida que comprende los ingredientes activos sólidos dispersos en aceite tales como un aceite vegetal y al menos un agente activo de superficie y uno o más adyuvantes adicionales. En formas de formas de realización, el uno o más adyuvantes se puede seleccionar de espesantes, modificadores de viscosidad, agentes estructurantes o aditivos reológicos, solventes, conservantes, agentes anticongelantes, agentes antiespumantes y similares. Normalmente, la dispersión oleosa también se diluye con agua antes de la administración de la composición. En formas de formas de realización, la composición líquida puede ser una dispersión oleosa que comprende de 0,5 a 20% en peso de un cultivo biológicamente puro de *Bacillus thuringiensis* RTI545 o una mutante de este que tiene todas sus características de identificación; 1 a 10% en peso de uno o más agentes activos de superficie; y al menos un espesante, modificador de viscosidad, agente estructurante, aditivo reológico, solvente, conservante, agente anticongelante o agente antiespumante cada uno de modo independiente que comprende up a aproximadamente 5% en peso de la composición.

En formas de formas de realización, la composición puede estar en la forma de un polvillo, polvo, gránulo, un polvo humectable seco, un gránulo esparcible o un gránulo humectable seco y el cultivo biológicamente puro de *Bacillus thuringiensis* RTI545 o una mutante de este que tiene todas sus características de identificación puede estar presente en una cantidad de aproximadamente $1,0 \times 10^8$ UFC/g a aproximadamente 5×10^{13} UFC/g. En formas de formas de realización, la composición puede comprender un portador sólido seleccionado del grupo que consiste en mono o disacáridos, oligo o polisacáridos, talco, dióxido de titanio, arcilla de pirofilita, arcilla de atapulgita, kieselguhr, sílice, piedra caliza, bentonita, montmorillonita de calcio, bentonita, montmorillonita de calcio, sales de sodio, potasio, magnesio, calcio o amonio de acetato, carbonato, cloruro, citrato, fosfato o sulfato, cáscaras de semillas de algodón, harina de trigo, harina de soja, piedra pómez y aserrín, cáscaras de nuez molida (tales como maní o nuez), lignina, extractos de levaduras, harina de pescado o mezclas de estas.

En una forma de realización, la composición comprende: 5–40% **de un** cultivo biológicamente puro no menor de aproximadamente 1×10^{11} UFC/g; y maltodextrina, sílice, carbonato de calcio o cualquiera de sus mezclas. En formas de formas de realización, la composición comprende 5–15% de maltodextrina.

En formas de formas de realización, la composición puede comprender en % en peso: 5–40 % de un cultivo biológicamente puro no menor de aproximadamente 1×10^{11} UFC/g de *Bacillus thuringiensis* RTI545 o una mutante de este que tiene todas sus características de identificación; 5–15% de maltodextrina; 35–45% de carbonato de calcio; y 5–15% de sílice. En formas de formas de realización, la composición puede ser una formulación de polvo humectable.

En una forma de realización, la composición puede ser una formulación de polvo humectable que comprende en % en peso: aproximadamente 40 % de a cultivo biológicamente puro no menos de aproximadamente 1×10^{11} UFC/g *Bacillus thuringiensis* RTI545 o una mutante de este que tiene todas sus características de identificación; 10 % de maltodextrina; 40 % de carbonato de calcio; y 10 % de sílice.

En formas de formas de realización, la composición es útil en el tratamiento de semillas de plantas o en aplicaciones de surco para conferir protección contra o controlar la infección patogénica fúngica de las plantas. Para el tratamiento de semillas, se puede aplicar una solución o suspensión de la composición a la semilla utilizando procedimientos de tratamiento de semillas estándares. La composición se puede aplicar a semillas no tratadas o las semillas que se han tratado con al menos un agente de protección de cultivos adicional como se describe en la presente. Alternativamente, la composición también se puede mezclar con un agente de protección de cultivos adicional para el tratamiento de semillas en aplicaciones en surco. En algunas formas de realización, la composición se puede aplicar al follaje de la planta a proteger, opcionalmente mezclada con un agente de protección de cultivos adicional.

En algunas formas de realización de las composiciones y métodos, la composición incluye una o combinación de agentes agrícolas adicionales tales como un insecticida, fungicida, nematocida, bactericida, herbicida, extracto de planta, regulador del crecimiento de la planta o fertilizante como se describe aquí presente en una cantidad adecuado para beneficiar el crecimiento de la planta y/o para conferir protección de la planta contra una plaga de la planta. El agente agrícola adicional puede ser un agente microbiano, un agente biológico o un agente químico.

En algunas formas de realización de las composiciones y métodos, la composición se puede formular para la compatibilidad con un fertilizante líquido.

La formulación compatible con un fertilizante líquido puede incluir un silicato de aluminio–magnesio hidratado y menos un dispersante. El término "en una formulación compatible con un fertilizante líquido" tal como se utiliza a lo largo de la memoria descriptiva y reivindicaciones se considera que significa que la formulación es capaz de disolución o dispersión o emulsión en una solución acuosa para permitir la mezcla con un fertilizante para suministrar a las plantas en una formulación líquida.

En formas de realización destacadas, la formulación compatible con un fertilizante líquido puede incluir bifentrina, tal como una composición que comprende bifentrina; un silicato de aluminio–magnesio hidratado; y al menos un dispersante seleccionado de un éster de sacarosa, un lignosulfonato, un alquil poliglicósido, un condensado de ácido naftalensulfónico formaldehído y un éster de fosfato. La bifentrina con preferencia puede estar presente en una concentración de 1,0% en peso a 35% en peso, más particularmente, de 15% en peso a 25% en peso sobre la base del peso total de todos los componentes en la composición. La composición insecticida de bifentrina puede estar presente en una formulación líquida a una concentración que varía de 0,1 g/ml y 0,2 g/ml. El insecticida de bifentrina puede estar presente en una formulación líquida a una concentración de 0,17 g/ml. El dispersante o dispersantes con preferencia pueden estar presentes en una concentración total de aproximadamente 0,02% en peso a aproximadamente 20% en peso sobre la base del peso total de todos los componentes en la composición. En algunas formas de realización, el silicato de aluminio–magnesio hidratado se puede seleccionar del grupo que consiste en montmorillonita y atapulgita. En algunas formas de realización,

el éster de fosfato se puede seleccionar un éster de fosfato de nonil fenol y una sal de potasio de fosfato de alcohol tridecílico etoxilado.

El dispersante o dispersantes con preferencia pueden estar presentes en una concentración total de aproximadamente 0,02% en peso a aproximadamente 20% en peso sobre la base del peso total de todos los componentes en la composición.

En algunas formas de realización, el silicato de aluminio–magnesio hidratado se puede seleccionar del grupo que consiste en montmorillonita y atapulgita.

En algunas formas de realización, el éster de fosfato se puede seleccionar de un éster fosfato de nonilfenol y una sal de potasio de fosfato de alcohol tridecílico etoxilado.

Otras formas de realización pueden incluir al menos uno de un agente anticongelante, un agente antiespumante y un biocida.

En el aspecto anterior, las composiciones se pueden preparar mediante un proceso siguiendo las etapas de combinar los ingredientes activos biológicos en cantidades efectivas con los portadores y adyuvantes como se describe en la presente. Las composiciones formuladas se pueden preparar, por ejemplo, mediante la mezcla de agentes activos biológicos con componentes de formulación para obtener composiciones en forma de sólidos finamente divididos, gránulos o dispersiones. Los ingredientes activos también se pueden formular como componentes orgánicos, tales como sólidos finamente divididos, aceites minerales, aceites de origen vegetal o animal, aceites modificados de origen vegetal o animal, solventes orgánicos, agua, sustancias tensioactivas, combinaciones de estos.

En algunas formas de realización, los componentes de la formulación se pueden mezclar en seco o los componentes sólidos y líquidos se pueden mezclar en

un homogeneizador u otro recipiente de mezcla adecuado. La mezcla simple de los ingredientes por homogenización puede ser preferible a cualquier forma de molienda. En otras formas de realización, la mezcla se puede someter a un proceso de molienda, tales como molienda seca o molienda húmeda, hasta que se obtienen tamaños de partícula adecuados que varían de aproximadamente 1 a aproximadamente 250 micrones. La composición puede tener tamaños de partícula de menos de 250, menos de 100 o con preferencia menos de 50 micrones. En una forma de realización preferida, la mezcla se homogeniza hasta que el 90% del tamaño de partícula (D90) es menor de a aproximadamente 50 micrones.

Una forma de realización se dirige a una composición que comprende: i) el *Bacillus thuringiensis* RTI545 depositado como ATCC No. PTA-122161 o una mutante de este que tiene todas sus características de identificación; y ii) al menos un componente de formulación seleccionado del grupo que consiste en los adyuvantes para una formulación SC; adyuvantes para una formulación WP; y para una formulación WG.

En otra forma de realización, la composición está en la forma de un SC, tal como uno que comprende agua y al menos un tensioactivo y uno o más adyuvantes adicionales seleccionados de espesantes, solventes, conservantes, agentes anticongelantes, modificadores de pH y agentes antiespumantes.

En una forma de realización, el SC comprende de 1 a 20% en peso de *Bacillus thuringiensis* RTI545 depositado como ATCC No. PTA-122161 o una mutante de este que tiene todas sus características de identificación; 1 a 5% en peso de uno o más tensioactivos; y opcionalmente al menos un espesante, solvente, conservante, agente anticongelante o agente antiespumante; y agua. El opcional espesante, solvente,

conservante, agente anticongelante o agente antiespumante puede comprender cada uno de modo independiente hasta aproximadamente 1% en peso de la formulación de SC. El SC comprende agua en una cantidad complementaria con todos los otros componentes para llevar la composición total a 100% en peso (qs).

La composición puede estar forma sólida, por ejemplo, un polvillo, polvo, gránulo, formulación WP o WG. Estas formulaciones comprenden al menos un portador sólido como se describió anteriormente. En formas de formas de realización, las formulaciones WP o WG pueden comprender de aproximadamente 1 a aproximadamente 50% en peso, tal como de 1 a 10, 5 a 10 o 5 a 50 o 7 a 50 o 10 a 50% en peso, de *Bacillus thuringiensis* RTI545 depositado como ATCC No. PTA-122161 o una mutante de este que tiene todas sus características de identificación; y al menos un portador sólido seleccionado del grupo que consiste en maltodextrina, carbonato de calcio y Zilina. Las formulaciones de gránulos humectables son similares a las formulaciones en polvo humectables, excepto que el polvo se forme en gránulos más grandes, por ejemplo mediante la dilución del polvo en agua opcionalmente con dispersante adicional y formación de gránulos por aglomeración, secado por pulverización o extrusión.

En una forma de realización, la composición puede comprender de 2 a 20% en peso de *Bacillus thuringiensis* RTI545 depositado como ATCC No. PTA-122161 o una mutante de este que tiene todas sus características de identificación; de aproximadamente 80 a aproximadamente 90% en peso de maltodextrina y aproximadamente 0,5 a aproximadamente 2% en peso de sílice.

En otra forma de realización, la composición puede comprender de 5 a 60 (tal como 40%) de *Bacillus thuringiensis* RTI545 depositado como ATCC No. PTA-

122161 o una mutante de este que tiene todas sus características de identificación; de aproximadamente 30 a aproximadamente 50 (tales como 40 %)% en peso de maltodextrina, aproximadamente 10 a 20 (tales como 16 %)% en peso de carbonato de calcio y aproximadamente 0.5 a aproximadamente 5 (tal como 4%) en peso de sílice.

En otra forma de realización, la composición comprende un polvo humectable o formulación de gránulo humectable que comprende en % en peso:

5–50 % (tal como 40%) de *Bacillus thuringiensis* RTI545 depositado como ATCC No. PTA–122161 o una mutante de este que tiene todas sus características de identificación;

5–15% (tal como 10%) de maltodextrina;

35–45% (tal como 40%) de carbonato de calcio; y

5–15% (tal como 10%) de sílice.

La composición puede ser útil en el tratamiento de semillas de plantas e en aplicaciones en surcos. Para el tratamiento de semillas, una solución, suspensión, pasta, gel o sólido humedecido de la composición se puede aplicar a la semilla utilizando procedimientos de tratamiento de semillas estándares. La composición se puede aplicar a semillas no tratadas o semillas que se han tratado con al menos un agente de protección de cultivos adicional como se describe en la presente. Alternativamente, la composición también se puede mezclar con un agente adicional de protección de cultivos para el tratamiento de semillas o aplicaciones de surco.

Las aplicaciones en surco pueden incluir el tratamiento del suelo en el surco, con preferencia en proximidad a las semillas de cultivos al momento de plantar e incorporar la formulación en el suelo. Las aplicaciones en surco pueden incluir

formulaciones líquidas o sólidas. En algunas formas de realización, las aplicaciones en surco comprenden aplicar la composición en una espuma.

En formas de formas de realización, las composiciones formuladas pueden estar en la forma de concentrados que se diluyen antes del uso, aunque también se pueden preparar formulaciones listas para usar. Mientras que los productos comerciales con preferencia se formularán como concentrados, el usuario final empleará normalmente formulaciones diluidas para su aplicación en la planta del suelo. Las diluciones se pueden preparar, por ejemplo, con agua, fertilizantes líquidos, micronutrientes, organismos biológicos, aceite o solventes.

En formas de formas de realización, las composiciones formuladas adicionalmente pueden incluir un aditivo que comprende un aceite de origen vegetal o animal, un aceite mineral, alquil ésteres de tales aceites o mezclas de tales aceites y derivados de aceite. La cantidad de aditivo de aceite en la composición de acuerdo con la invención es generalmente de 0,01 a 10%, sobre la base de la mezcla de pulverización. Por ejemplo, se puede añadir el aditivo de aceite al tanque de pulverización en la concentración deseada una vez que se ha preparado la mezcla de pulverización. En formas de formas de realización, los aditivos de aceite pueden comprender aceites minerales o un aceite de origen vegetal, por ejemplo aceite de soja, aceite de colza, aceite de oliva o aceite de girasol, aceite vegetal emulsionado, alquil ésteres de aceites de origen vegetal, por ejemplo derivados metilados o un aceite de origen animal, tales como aceite de pescado o sebo de vaca.

EJEMPLOS

Se han incluido los siguientes Ejemplos para proporcionar una orientación a un experto en la técnica para implementar formas de realización representativas de la

materia objeto de la presente descripción. A la luz de la presente invención y en base al nivel general de experiencia en la técnica, los expertos en la técnica pueden apreciar que los siguientes son solamente ejemplos y que es posible utilizar numerosos cambios, modificaciones y alteraciones sin apartarse de los alcances del tema sujeto descrito en la presente.

EJEMPLO 1

Identificación del aislado bacteriano RTI545 de *Bacillus thuringiensis* mediante análisis de secuencias

Una cepa bacteriana asociada a planta, designada en la presente como RTI545, se aisló del suelo de rizosfera que rodeaba la hierba alta de festuco en Carolina del Norte. Se secuenció el genoma de la cepa RTI545 y se compararon las secuencias de los genes 16S rARN (SEQ ID NO: 1) y *rpoB* (SEQ ID NO: 2) de la cepa RTI545 con las de otras cepas bacterianas conocidas en las bases de datos de NCBI y RDP utilizando el BLAST; esta cepa colocó la cepa RTI545 dentro del clado *Bacillus cereus/thuringiensis/anthracis*. Se llevó a cabo un análisis filogenético adicional de la cepa RTI545 y de las especies de *Bacillus* relevantes mediante árboles de consenso Bootstrap (1,000 replicados) en el gen *rpoB*. El árbol de consenso para el gen *rpoB* se muestra en la Figura 2. Como puede verse en la Figura 2, la cepa RTI545 forma una rama separada en el clado *Bacillus cereus/thuringiensis/anthracis*. Las diferencias en secuencia para el gen *rpoB* al nivel del ADN indican que RTI545 es una nueva cepa que recae dentro del clado *Bacillus cereus/thuringiensis/anthracis*. El análisis adicional de secuencias reveló que la cepa RTI545 carece de los genes para las proteínas de cristal (gen *cry*) frecuentemente encontradas en las cepas de *B. thuringiensis*.

Además, se llevó a cabo el análisis de la secuencia del genoma para comprar la cepa RTI545 con cepas de las especies relacionadas de *Bacillus* utilizándose os cálculos de ANI (Average Nucleotide Identity) basados tanto en MUMmer como en BLASTn (Richter M, & Rosselló–Mora R (2009) *Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition. Proc Natl Acad Sci USA* 106(45):19126–31) y en análisis UNIPePT (Mesuere, B., Debyser, G., Aerts, M., Devreese, B., Vandamme, P. and Dawyndt, P. (2015), *The Unipept metaproteomics analysis pipeline. Proteomics*, 15: 1437–1442. doi:10.1002/pmic.201400361) para confirmar su clasificación filogenética. Los resultados de los cálculos ANI basados en MUMmer y BLASTn se muestran en la siguiente Tabla I. Los análisis de tanto ANI como UNIPePT (no se muestran los datos) revelaron un grado de similitud de secuencia entre RTI545 y las secuencias publicadas de cepas indicadas tanto como *B. thuringiensis* y *B. cereus*. La similitud de secuencias más elevada con respecto a un tipo de cepa reconocida fue con respecto al tipo de cepa reconocida *B. thuringiensis* Berliner ATCC10792. Nuevamente, las diferencias en la totalidad de la secuencia genómica con respecto a aquellas anteriormente publicadas indican que el RTI545 es una nueva cepa de *Bacillus thuringiensis* que recae dentro del clado *Bacillus cereus/thuringiensis/anthracis*.

Tabla I. Análisis de secuencias (cálculos de ANI basados tanto en MUMmer como en BLASTn) que permite comparar la cepa RTI545 con cepas de *Bacillus* relevantes.

<i>B. thuringiensis</i> RTI545		
Cepa	ANI (BLAST)	ANI (MUMmer)
<i>B. cereus</i> UW85	98,48	98,91

<i>B. cereus</i> CMCC P0011	97,59	98,11
<i>B. cereus</i> CMCC P0021	97,59	98,11
<i>B. thuringiensis</i> Berliner ATCC 10792*	97,51	98,17
<i>B. thuringiensis</i> Bt407	97,32	98,26
<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>chinensis</i> CT-43	97,21	98,17
<i>B. thuringiensis</i> YBT-1518	97,18	98,11
<i>B. cereus</i> ATCC 14579*	95,92	96,78
<i>B. cereus</i> B4264	95,84	96,70
<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>tolworthi</i> : Pasteur	95,99	96,66
<i>B. bombysepticus</i> Wang	95,86	96,52
<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> HD 1	95,57	96,37
<i>B. cereus</i> ATCC 4342	91,01	92,02
<i>B. cereus</i> 03BB87	91,01	92,04
<i>B. anthracis</i> Ames A0462	90,67	91,71
<i>B. anthracis</i> Sterne	90,65	91,71
<i>B. weihenstephanensis</i> DSM11821	88,64	90,04
<i>B. mycoides</i> Rock 1-4	81,51	86,11
<i>B. cytotoxicus</i> NVH 391-98	80,01	85,31
<i>B. subtilis</i> BAB-1	66,74	83,22
<i>B. subtilis</i> 168	66,70	85,58

<i>B. amyloliquefaciens</i> (<i>B. velezensis</i>) FZB42	66,22	85,34
<i>B. velezensis</i> YAU B9601–Y2	66,21	85,15
<i>Enterobacter</i> 638	63,92	82,06
<i>P. furiosus</i> DSM3638	62,16	0,00

Nota: * indica cepas de tipo reconocido tanto para *Bacillus thuringiensis* como para *Bacillus cereus*.

La cepa de RTI545 se registró el 12 de mayo de 2015 bajo los términos del Tratado de Budapest para el Reconocimiento Internacional del Registro de Microorganismos para los Propósitos del Procedimiento de Patentes en la American Type Culture Collection (ATCC) en Manassas, Virginia, EE.UU., N° de Acceso de Patente PTA–122161.

rADN–1 16S genómico de RTI545 (SEQ ID NO: 1)

AGAAAGGAGGTGATCCAGCCGCACCTTCCGATACGGCTACCTTGTTACGACTT
CACCCAATCATCTGTCCCACCTTAGGCGGCTGGCTCCAAAAGGTTACCCA
CCGACTTCGGGTGTTACAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGC
CCGGGAACGTATTCACCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCAGC
TTCATGTAGGCGAGTTGCAGCCTACAATCCGAACTGAGAACGGTTTTATGAGAT
TAGCTCCACCTCGCGGTCTTGCAGCTCTTTGTACCGTCCATTGTAGCACGTGTG
TAGCCCAGGTCATAAGGGGCGATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCG
GTTTGTACCGGCAGTCACCTTAGAGTGCCCAACTTAATGATGGCAACTAAGAT
CAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGA
CGACAACCATGCACCACCTGTCACTCTGCTCCCGAAGGAGAAGCCCTATCTCTA

GGGTTTTTCAGAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTA
AACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAGC
CTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAACTTCAGCACTAAA
GGGCGGAAACCCTCTAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAG
GGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCGCCTCAGTGTGAGTTACAGA
CCAGAAAGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCTCCATATCTCTACGCATTTACCG
CTACACATGGAATTCCACTTTCCTCTTCTGCACTCAAGTCTCCCAGTTTCCAATG
ACCCTCCACGGTTGAGCCGTGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAACCACCTGC
GCGCGCTTTACGCCCAATAATTCCGGATAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGC
GGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTAGGTACCGTCAAGGTGC
CAGCTTATTCAACTAGCACTTGTTCTTCCCTAACAACAGAGTTTTACGACCCGAA
AGCCTTCATCACTCACGCGGCGTTGCTCCGTCAGACTTTCGTCCATTGCGGAA
GATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTG
TGGCCGATCACCTCTCAGGTGGGCTACGCATCGTTGCCTTGGTGAGCCGTTA
CCTCACCAACTAGCTAATGCGACGCGGGTCCATCCATAAGTGACAGCCGAAGC
CGCCTTTCAATTTGAACCATGCAGTTCAAATGTTATCCGGTATTAGCCCCGG
TTTCCCGGAGTTATCCCAGTCTTATGGGCAGGTTACCCACGTGTTACTCACCCG
TCGCGCGCTAACTTCTTGAGAGCAAGCTCTCAATCCATTGCTCGACTTGATG
TATTAGGCACGCCGCCAGCGTTCATCCTGAGCCAGGATCAAAC

Gen *rpoB* de RTI545 (SEQ ID NO: 2)

TTGACAGGTCAACTAGTTCAATACGGACGCCACCGCCAACGAAGAAGTTATGC
CCGTATTAGTGAAGTATTAGAGTTACCAAATCTTATCGAAATTCAAACCTCTTCTT
ATCAGTGGTTTCTTGATGAGGGTTTGCGAGAAATGTTCCAAGACATTTCTCCGA

TTGAAGACTTTACGGGAAATCTATCGCTTGAATTTATCGACTACAGCTTAGGTGA
ACCTAAATACTCTGTAGACGAATGCAAAGAGCGTGATGTGACGTATGCAGCACC
ACTTCGTGTAAAAGTGCGTCTAATCAACAAGGAAACTGGTGAAGTAAAAGAACA
AGATGTGTTTCATGGGAGATTTCCCACTCATGACAGAGACTGGAACATTCGTAAT
TAACGGTGCAGAACGTGTTATCGTTTCCCAGTTAGTTCGCTCTCCAAGCGTATA
CTATAGTGGCAAAGTGGATAAAAACGGAAAACGTGGTTTTACTGCTACTGTAAT
TCCAAACCGCGGAGCTTGGTTAGAGTATGAGACAGATGCTAAGGATGTTGTATA
TGTGCGTATTGACCGTACGCGTAACTTCCTGTAAGTGTGTTTGTACGCGCATT
GGGTTTGGCTCTGATCAAGAAATCACCGAGCTTTTAGGTGATAACGAATACTTA
AGCAACACATTAGAAAAAGACAACACAGATAGTACAGAAAAAGCATTGCTTGAA
ATTTATGAGCGTCTACGTCCTGGTGAACCAACAGTAGAAAATGCTAAGAGC
TACTTGTGTCTCGTTTCTTCGATCCAAAGCGCTACGATTTAGCAAATGTAGGTC
GCTATAAGATCAACAAGAAGTTACACATTA AAAACAGATTGTTTAATCAACGTTT
AGCTGAAACATTAGTGGATCCAGAACTGGTGAATTTTAGCGGCAGAAGGAAC
AATCTTAGATCGTCGTACACTTGATCGCATTTTACCTTACTTAGAGAAAAACATT
GGATTCAAACAGCGAAACCAATGGGTGGAGTGGTAGAAGGCGATGTTGAGCT
GCAATCTATTAAGATTTATGCTCCTGAGTCGGAAGGCGAACGTGTAATTAATGTA
ATTGGTAATGCAAATATTACTCGTGATGTGAAACACATCACACCAGGTGATATCC
TTGCTTCTATCAGTTACTTCTTCAACCTACTATACAAAGTAGGGGATACAGATGA
TATTGACCATTTAGGAAACCGTCGTCTGCGTTCTGTTGGAGAACTATTACAAAAT
CAATTCCGTATCGGTCTTTCTCGTATGGAACGTGTTGTTTCGTGAGAGAATGTGG
ATCCAAGATACAAATGCAATTACACCACAGGCGCTAATTAATATTCGTCCTGTTA
TTGCATCTATTAAGAGTTCTTCGGAAGTTCTCAGTTATCTCAGTTCATGGACCA
AACAAATCCATTAGCAGAGTTAACTCACAAACGAAGACTATCTGCATTAGGACC
TGGTGGTTTAACGCGTGAGCGCGCAGGCTTTGAAGTACGTGACGTTCACTACTC

CCACTACGGTCGTATGTGTCCGATTGAAACACCAGAGGGACCAAACATCGGTTT
GATTAAC TCATTATCTTCGTT CGCGAAAGTAAATGAGTTTGGTTTCATTGAAACA
CCATATCGTCGTGTTGACCCAGAACTGGTCTTGTAACAGGGCATGTTGATTAT
TTAACAGCAGATGAAGAAGATAACTATGTTGTAGCCCAAGCGAATATGAAATTAT
CTGATGAAGGTGAATTCCTAAGTGAAGATATCGTAGCTCGTTTCCGTGGTGAAA
ACATTGTCACAAATAGAGAACGCATCGACTACATGGATGTATCTCCAAAACAAG
TAGTGTCGGCAGCGACAGCTTGTATTCCGTTCTTAGAAAACGATGACTCTAACC
GCGCACTTATGGGAGCGAACATGCAACGTCAGGCGGTTCCGTTAATGAATCCG
GAATCTCCGATTGTAGGTACAGGTATGGAGTACGTATCAGCAAAAGACTCAGGT
GCTGCAGTAATCTGTAAACATCCTGGTGTGTTGAGCGCGTAGAAGCACGTGAA
GTTTGGGTACGTCGCTATGTAGAAGTTGACGGTCAAACAGTAAAAGGCGACTTA
GATCGCTACAAAATGCAAAAATTCATTCTGTTCTAACCAAGGAACTTGTTACAACC
AACGTCCAATCGTAAGTGTTGGAAATGAAGTTGTAAAAGGTGAAATCCTTGCGG
ATGGTCCTTCTATGGAATTAGGTGAACTAGCACTTGGACGTAAACGTGCTTGTTG
GCTTCATGACTTGGGACGGTTATAACTACGAGGATGCGATCATCATGAGTGAGC
GCCTTGTAAGATGATGTGTACACTTCTATTCATATTGAAGAATATGAATCAGA
AGCTCGTGATACGAAGCTTGGACCAGAAGAAATTACACGTGACATTCCAAATGT
TGGGGAAGACGCATTACGTAACCTTGACGAGCGCGGTATCATTGCGGTTGGTG
CTGAAGTAAAAGATGGAGATTTACTTGTTGGTAAAGTAACACCTAAAGGTGTAA
CAGAATTAACAGCTGAAGAACGTCTATTACATGCTATCTTTGGAGAAAAAGCGC
GTGAAGTACGTGATACATCACTACGTGTACCACACGGTGGTGGCGGTATTATCT
TAGACGTAAAAGTATTCAACCGTGAAGATGGCGATGAATTGCCACCAGGCGTG
AATCAACTTGACGTGCATATATCGTTCAAAAACGTAAAATTTCTGAAGGTGACA
AGATGGCCGGACGTCACGGTAACAAAGGTGTTATTTCTCGTATTTTACCAGAAG
AAGATATGCCTTACTTACCAGACGGTACGCCAATCGATATCATGTAAACCCATT

AGGGGTACCATCTCGTATGAATATCGGTCAGGTATTAGAGCTTCATCTTGGTAT
 GGCAGCAAGATACCTGGGCATTACATTGCAACACCAGTATTCGATGGTGCTC
 GTGAGGAAGATGTTTGGGGCACAATTGAAGAAGCTGGTATGGCAAATGACGCG
 AAAACAATCCTGTATGACGGACGTAAGTGGTGAACCATTCGATAACCGCGTATCT
 GTTGGTGTCATGTATATGATCAAAGTGGCGACATGGTTGACGATAAACTTCATG
 CTCGTTCTACTGGACCATACTCACTTGTAACGCAGCAACCTCTTGGAGGTAAAG
 CTCAGTTCGGTGGACAGCGTTTCGGTGAGATGGAGGTTTGGGCACTTGAAGCT
 TACGGTGCTGCTTATACTCTTCAAGAAATCTTAACAGTGAAGTCTGATGATGTTG
 TTGGACGTGTTAAGACTTATGAAGCAATTGTTAAAGGCGAAAATGTTCCAGAAC
 CAGGCGTTCCTGAATCATTCAAAGTATTGATTAAAGAGCTGCAAAGTTTAGGTAT
 GGACGTTAAAATGATGTCTAGCGACGATACAGAAATTGAAATGCGTGATACAGA
 AGATGACGATGATCATCAATCAGCAGATAAATTGAATGTCGAAGTTGAGACAAC
 TAAGGAATAA

EJEMPLO 2

Propiedades antimicrobianas del aislado RTI545 de *Bacillus thuringiensis*

La capacidad antagonista de la cepa RTI545 con respecto a los principales agentes patógenos de las plantas se midió en ensayos de placa. Se llevó a cabo un ensayo de placa para evaluar el antagonismo contra agentes fúngicos patógenos de las plantas cultivando el aislado bacteriano y los hongos patógenos lado a lado sobre placas de agar 869 a una distancia de 3–4 cm. Las placas fueron incubadas a temperatura ambiente y se las verificó regularmente durante hasta dos semanas para comprobar los comportamientos de crecimiento tales como la inhibición del crecimiento, ocupación de nicho, o ausencia de efecto. En el caso de una selección

preliminar para establecer propiedades antagonistas contra los agentes bacterianos patógenos, se empezó por distribuir el agente patógeno como un césped sobre 869 placas de agar. Subsiguientemente, se aplicaron alícuotas de 20 µl de cultivo de RTI545 sobre la placa. Las placas fueron sometidas a incubación a temperatura ambiente y se las verificó regularmente durante hasta dos semanas para detectar una zona de inhibición en el césped alrededor de las posiciones en las que se había aplicado el RTI545. En la siguiente Tabla II se muestra un resumen de la actividad antagonista.

Tabla II. Propiedades antagonistas del aislado RTI545 de *Bacillus thuringiensis* frente a los principales agentes patógenos de las plantas.

Ensayos antimicrobianos		RTI545
Agentes patógenos fúngicos	<i>Alternaria solani</i>	+
	<i>Aspergillus flavus</i>	++
	<i>Botrytis cinerea</i>	++
	<i>Cercospora sojina</i>	+
	<i>Fusarium colmorum</i>	+—
	<i>Fusarium graminearum</i>	++
	<i>Fusarium oxysporum</i>	++
	<i>Fusarium oxysporum f. sp. Cubense</i>	+
	<i>Fusarium virguliforme</i>	++
	<i>Glomerella cingulata</i>	+++

	<i>Magnaporthe grisea</i>	++
	<i>Monilina fructicola</i>	+++
	<i>Phytophthora capsici</i>	-/+
	<i>Pythium sylvaticum</i>	+
	<i>Pythium aphanidermatum</i>	+
	<i>Rhizoctonia solani</i>	++
	<i>Sclerotinia homeocarpa</i>	++
	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	+++
	<i>Stagonospora nodorum</i>	+++
Agentes	<i>Erwinia amylovora</i>	+
patógenos	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	—
bacterianos	<i>Xanthomonas euvesicatoria</i>	—

+++ Actividad muy fuerte, ++ Actividad fuerte, + Actividad, +— Actividad débil,—No se observó ninguna actividad

EJEMPLO 3

Rasgos Fenotípicos del Aislado RTI545 de *Bacillus thuringiensis*

Además de las propiedades antagonistas, también se midieron diversos rasgos fenotípicos para la cepa RT545 de *Bacillus thuringiensis*, y los datos de muestran en la siguiente Tabla III. Los ensayos se llevaron a cabo de acuerdo con los procedimientos descritos en el texto debajo de la Tabla III.

Tabla III. Ensayo fenotípico: producción de fitohormonas, acetoina y ácido indol acético (IAA), y ciclado de nutrientes del aislado RTI545.

Ensayos característicos	RTI545
Producción de ácido (Rojo metilo)	+
Producción de acetoína (MR–VP)	+++
Quitinasa	–
Producción de ácido Indol 3–acético	–
Actividad de proteasa	+++
Solubilización de fosfatos	+–
Fenotipo	Crema, un tanto seco con textura/arrugas en colonia, y la cepa presenta un robusto crecimiento a 10 °C
+++ Muy fuerte, ++ Fuerte, + Algo, +– Débil, –No observable	

Test de ácido y de acetoína. 20 µl de un cultivo de iniciación en un medio 869 rico fueron transferidos a un 1ml de medio Rojo metilo–Voges Proskauer (Sigma Aldrich 39484). Los cultivos fueron sometidos a incubación durante dos días a 30 °C 200 rpm. 0,5 ml de cultivo fue transferido y se añadieron 50 µl de 0,2 g/l rojo metilo. El color rojo indicó una producción de ácido. El cultivo remanente de 0,5 ml fue mezclado con 0,3 ml de α-naftol al 5% (Sigma Aldrich N1000) seguido por 0,1 ml de KOH al 40%. Las muestras fueron interpretadas después de 30 minutos de incubación. El desarrollo de un color rojo indicó la producción de acetoína. Para ambos ensayos, de ácido y acetoína se utilizaron medios no inoculados como control negativo (Sokol *et al.*, 1979, *Journal of Clinical Microbiology*. 9: 538–540).

Ácido indol–3–acético. 20 µl de un cultivo de iniciación en un medio 869 rico fueron transferidos a 1 ml de medio 1/10 869 suplementado con 0,5 g/l de triptófano

(Sigma Aldrich T0254). Los cultivos fueron sometidos de incubación durante 4–5 días en la oscuridad a 30 °C, 200 RPM. Las muestras fueron sometidas a centrifugación y 0,1 ml de material sobrenadante fueron mezclados con 0,2 ml de Reactivo de Salkowski (ácido perclórico al 35%, 10 mM FeCl₃). Después de incubar durante 30 minutos en la oscuridad, las muestras que resultaron en color rosa fueron registradas como positivas para el análisis de IAA. Las diluciones de IAA (Sigma Aldrich I5148) fueron utilizados como comparación positiva, los medios no inoculados fueron utilizados como control negativo (Taghavi, *et al.*, 2009, *Applied and Environmental Microbiology* 75: 748–757).

Test de solubilización de fosfatos. Unas bacterias fueron aplicadas sobre un medio de agar Pikovskaya (PVK) consistente en 10 g de glucosa, 5 g de trifosfato de calcio, 0,2 g de cloruro de potasio, 0,5 g de sulfato de amonio, 0,2 g de cloruro de sodio, 0,1 g de sulfato de magnesio heptahidrato, 0,5 g de extracto de levadura, 2 mg de sulfato de manganeso, 2 mg de sulfato de hierro y 15 g de agar por litro, pH 7, procesado el autoclave. Las zonas de liberación eran indicativas de bacterias solubilizadoras de fosfato (Sharma *et al.*, 2011, *Journal of Microbiology and Biotechnology Research* 1: 90–95).

Actividad de quitinasa. 10% de peso neto de quitina coloidal fueron añadidos a medio agar PVK modificado (10 g de glucosa, 0,2 g de cloruro de potasio, 0,5 g de sulfato de amonio, 0,2 g de cloruro de sodio, 0,1 g de sulfato de magnesio heptahidrato, 0,5 g de extracto de levadura, 2 mg de sulfato de manganeso, 2 mg de sulfato de hierro y 15g de agar por litro, pH 7, procesado en autoclave). Las bacterias fueron aplicadas sobre estas placas de quitina; las zona de liberación indicaban una actividad de quitinasa (N. K. S. Murthy & Bleakley., 2012. "Simplified Method of

Preparing Colloidal Chitin Used for Screening of Chitinase Producing Microorganisms". *The Internet Journal of Microbiology*. 10(2)).

Actividad de proteasa. Unas bacterias fueron aplicadas sobre medio agar 869 suplementado con leche al 10%. Las zonas de liberación indicaban la capacidad de desintegrar proteínas, lo que sugiere una actividad de proteasa (Sokol *et al.*, 1979, *Journal of Clinical Microbiology*. 9: 538–540).

EJEMPLO 4

Efectos del aislado RTI545 de *Bacillus thuringiensis* sobre la germinación de las semillas de maíz

El efecto de las células vegetales del aislado RTI545 bacteriano sobre la germinación de las semillas de maíz se determinó como se describe a continuación.

Los ensayos con células vegetativas de RTI545 se llevaron a cabo utilizando semillas de maíz. Se aplicó RTI545 sobre placas con el medio 869 media tomadas de un stock congelado y se cultivó durante la noche a 30°C. Se tomó una colonia aislada de la placa y se inoculó en un tubo cónico de 50 mL que contenía 20 mL de caldo de 869. El cultivo fue incubado durante la noche bajo agitación a 30 °C y 200 RPM. El cultivo obtenido después de la noche fue centrifugado a 10.000 rpm durante 10 minutos. El material sobrenadante fue descartado y se resuspendieron las pellets en MgSO₄ para su lavado. La mezcla fue nuevamente centrifugada durante 10 minutos a 10.000 rpm. Se descartó el material sobrenadante y las pellas fueron suspendidas en solución de Hoagland modificada. A continuación se diluyó una mezcla de manera de proveer una concentración inicial. A partir de esto, se prepararon diluciones del cultivo de RTI545 de manera de obtener una concentración final de 2×10^7 cfu/ml. Para

estos experimentos de germinación de semillas de maíz, unos contenedores para el cultivo de plantas fueron etiquetados con RTI545 o con control. Se colocaron diez (10) semillas en un contenedor individual. Se añadieron 10 mL de la suspensión de RTI545 con una concentración de 2×10^7 cfu/ml a los contenedores, y las semillas fueron sometidas a incubación a 21°C en la oscuridad. Los contenedores de control contenían semillas y solución de Hoagland modificada sin bacterias añadidas. Se tomaron imágenes de los contenedores después de 10 a 12 días. Las Figuras 3A–3B son imágenes de las plántulas de maíz después de 12 días cultivadas en la presencia (Figura 3A) y ausencia (Figura 3B) de la cepa RTI545. Como puede observarse en las figuras, la presencia de la cepa RTI545 resultó en una significativa ventaja en cuanto al crecimiento.

EJEMPLO 5

Efectos del crecimiento del aislado RTI545 de *Bacillus thuringiensis* en el maíz

Se determinó el efecto de la aplicación del aislado bacteriano sobre el crecimiento temprano de las plantas y el vigor en el maíz. El experimento se llevó a cabo inoculando semillas de maíz germinadas esterilizadas durante 2 días en una suspensión de 10^8 UFC/ml de la bacteria a temperatura ambiente bajo agitación (también se llevó a cabo un control sin bacterias). Posteriormente, las semillas inoculadas se plantaron en macetas de 1 galón llenos con PROMIX BX al que se añadió limo hasta obtener un pH = 6,5. Para cada tratamiento se sembraron 9 macetas con una única semilla de maíz. Las macetas se incubaron en el invernadero a 22 °C con un ciclo de luz y oscuridad de 14/10 hrs y se regaron dos veces por semana de acuerdo con necesidad.

Cuarenta y dos días después de la plantación, las plantas fueron cosechadas y se midieron su peso fresco y seco que se compararon con los datos obtenidos para plantas de control no inoculadas. El peso húmedo y seco de la biomasa de los brotes de maíz se midió después de 42 días de crecimiento. Se encontró que el peso neto de la biomasa de los brotes de maíz era igual a 173,7 g para las plantas inoculadas con la cepa RTI545 de *Bacillus thuringiensis* vs. un peso húmedo igual a 147,6 g para el control no inoculado, lo que es un aumento del 17,7% en peso neto con respecto al control no inoculado. El peso seco de la biomasa de los brotes de maíz era igual a 16,0 g para las plantas inoculadas con la cepa RTI545 de *Bacillus thuringiensis* vs. un peso seco igual a 12,4 g para el control no inoculado, lo que es un incremento de 29% en el peso seco con respecto al control no inoculado. Como puede observarse a partir del incremento significativo en la biomasa tanto húmeda como seca, la presencia de la cepa RTI545 resultó en una significativa ventaja desde el punto de vista del crecimiento.

EJEMPLO 6

Actividad del aislado RTI545 de *Bacillus thuringiensis* contra los insectos

La capacidad de la cepa RTI545 de *Bacillus thuringiensis* para antagonizar el WPBH (Western Plant Bug, Chinche de Planta Occidental), *Lygus hesperus*, y el SCRW (Southern Corn Rootworm, Gusano de las Raíces del Maíz del Sur), *Diabrotica undecimpunctata howardi*, se evaluó mediante ensayos *in vitro*.

Para los ensayos se cultivó el RTI545 de *Bacillus thuringiensis* durante 7 horas en 5 ml de medio 869, a 200 rpm y a 30 °C. Posteriormente, una pequeña porción del precultivo se diluyó 100 veces en medio 869 y se cultivó durante 17 horas a 150 rpm a 30 °C. Se utilizó todo el cultivo bacteriano en todos los bioensayos. Como control

biológico, se utilizó *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 se utilizó de acuerdo con el mismo protocolo.

Para el antagonismo contra WPB, se evaluó RTI545 de *Bacillus thuringiensis* mediante ensayos de rociado directo, alimentación alternativa, y alimentación no alternativa junto con los controles: blanco de medio 869, control químico ACEPHATE 97UP (A.I. = 97% O,S-dimetil acetilfosforamidotioato), control biológico HD-1, y un control no tratado. Como se preveía, no se observó ninguna mortalidad significativa (ensayos de rociado directo y alimentación no alternativa) ni grado de repelencia (ensayo de alimentación selectiva) para el blanco de medio 869 o tratamientos de HD-1, mientras que el control químico mató (ensayo de rociado directo y de alimentación no alternativa) y produjo una repelencia (ensayo de alimentación selectiva) para el WPB. El RTI545 de *Bacillus thuringiensis* RTI545 no ocasionó ninguna mortalidad significativa al WPB cuando se aplicaba en ensayos tanto de rociado directo como de alimentación no alternativa; sin embargo, de manera imprevista, el RTI545 presentó un comportamiento de repelencia las 124 horas después de haberse colocado WPB en arenas de ensayo con alternativas. Específicamente, cuando los WPB se colocaron en un recipiente que contenía una fuente de alimento tratada y no tratada, se observó que los WPB se alimentaban solamente con la fuente de alimento no tratada (no se muestran los datos).

Para el antagonismo contra las larvas de SCRW, las células de RTI545 de *Bacillus thuringiensis* fueron evaluadas en un ensayo de alimentación alternativa de plántulas de maíz y se compararon con un control agua. Los tratamientos adicionales comparados con el control agua fueron: i) *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 (HD-1); ii) control químico CAPTURE LFR (A.I. = bifentrina al 17,15%), e: iii) el medio 869. Se recordó papel filtro por la mitad y cada sección fue recubierta con cinta

dentro de un plato Petri de 100 mm, asegurándose que ninguna de las dos mitades de papel filtro se tocara. Se aplicó un volumen total de 0,65 ml de tratamiento a la mitad de papel filtro tratado. Se aplicó agua desionizada al lado no tratado. Para el control no tratado, ambas mitades del papel filtro fueron tratadas con agua solamente. Se situó una semilla de maíz terminada sobre cada mitad de papel filtro húmedo. Se colocaron las larvas de segunda etapa de metamorfosis en la línea central entre el papel filtro tratado y el papel filtro no tratado. Hubo tres replicados por tratamiento. Los platos fueron sellados con PARAFILM y se mantuvieron en un entorno oscuro a temperatura ambiente durante seis días antes de la evaluación. La ubicación y cantidad de larvas muertas fueron registradas. La proporción de larvas sobre cada sección del papel filtro fue transformada mediante raíz cuadrada a efectos de normalizar la distribución, y se analizó estadísticamente con ANOVA. Se utilizó el test de HSD Tukey post-hoc Para determinar si las diferencias entre el papel filtro no tratado y el papel filtro tratado eran significativas ($\alpha = 0,10$).

En la Figura 4, se muestra una imagen del ensayo de placa con células RTI545 después de seis días, y los datos procedentes de todos los ensayos de placas se resumen en la siguiente Tabla IV. Como se observó en el ensayo precedente para WPB, el RTI545 produjo una repelencia imprevista, pero no mato las larvas de SCRW. Como puede observarse en la Figura 4 y en la Tabla IV, los cultivos de RTI545 fueron excelentes para repeler las larvas de SCRW; el 100% de las larvas se hallaban presentes sobre la mitad, tratada con agua, del papel filtro y ninguna de las larvas sobre el papel tratado con RTI545. En cambio, las larvas estaban distribuidas estadísticamente de manera uniforme entre tratamiento y control de agua para la cepa HD-1 El control químico bifentrina resultó en que aproximadamente el 19% de las larvas estaban presentes sobre el papel filtro tratado con CAPTURE LFR. Los

resultados muestran que la cepa RTI545 era imprevistamente superior a un insecticida químico para repeler los insectos de la semilla de maíz, pero no mataba los insectos.

Tabla IV. Por ciento de larvas de SCRW vivas situadas en las mitades tratadas con tratamiento y con agua del papel filtro después de seis días en un ensayo de alimentación alternativa sobre el maíz.

Porcentaje vivo sobre papel filtro	Tratamiento				
	RTI545	HD-1	CAPTURE LFR	Medio 896	Agua
Tratado	0,00	46,66	19,44	34,81	56,66
Agua	100,00	53,33	80,55	65,18	43,33
Valor-p	<0,001	0,671	<0,001	0,012	0,350

Nota: se llevaron a cabo análisis estadísticos sobre la proporción, transformada por raíz cuadrada, de larvas sobre mitades tratadas y sin tratar del papel filtro.

El ensayo de alimentación alternativo para las larvas de SCRW utilizándose plántulas de maíz se repitió con la cepa HD-1 y RTI545. A diferencia del HD-1, la RTI545 no contiene genes para la producción de proteínas de cristal (representadas como “Cry”). Se midió el grado de repelencia utilizando un ensayo de alimentación *in vitro* sobre placa por larvas de SCRW sobre plántulas de maíz después de 72 horas como el porcentaje de larvas de SCRW sobre el lado no tratado de la placa. En el caso de no haber una repelencia, se prevería una distribución igual del 50% tanto en la mitad tratada como en la mitad no tratada de la placa, lo que indicaría una

repelencia del 0%. Los resultados de este ensayo se muestran en la siguiente Tabla V. En este experimento, se evaluaron el RTI545 de *Bacillus thuringiensis* y el *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 (HD-1), en comparación con un control agua después de tres días en el ensayo. Nuevamente, los cultivos de RTI545 fueron excelentes para repeler las larvas de SCRW; el 96% de las larvas se hallaban presentes sobre la mitad, tratado con agua, del papel filtro y solamente el 4% se hallaba presente sobre la mitad que contienen las células RTI545. En cambio, las larvas estaban nuevamente distribuidas estadísticamente de manera uniforme entre tratamiento y control de agua para la cepa HD-1 (53% sobre el lado no tratado de la placa).

Tabla V. Por ciento de larvas de SCRW vivas situadas sobre la mitad no tratada del papel filtro después de tres días en un ensayo de alimentación alternativo con maíz.

Cepa bacteriana	Cry	% de larvas en el lado no tratado
<i>Bacillus thuringiensis</i> RTI545	–	96
<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> HD-1	+	53

También se repitió el ensayo de alimentación alternativa para larvas de SCRW usando plántulas de maíz para comparar la RTI545 con otra cepa FD30 de *Bacillus thuringiensis* y kanosamina. En base a los datos de la secuencia del genoma, la trayectoria putativa de la biosíntesis de la kanosamina se encuentra en la RTI545 pero no en la FD30. Se midió la repelencia mediante un ensayo de alimentación alternativo en placa *in vitro* con plántulas de maíz por las larvas de SCRWE y se asignó un

puntaje después de 72 horas como el porcentaje de larvas de SCRW en el lado no tratado de la placa. En el caso de ninguna repelencia, se esperaría una distribución igual del 50% tanto en la mitad tratada como en la mitad no tratada de la placa, lo que indicaría un 0% de repelencia. Los resultados de este ensayo se muestran en la siguiente Tabla VI.

Tabla VI. Porcentaje medio de larvas de SCRW en las porciones sin tratar y tratadas del papel filtro a los tres días después de la introducción en la arena experimental.

Ensayo	Sin tratar	<i>Cepa B. t.</i>		Kanosamina			+ Medio 869
		RTI545	FD30	10 µg/ml	100 µg/ml	100 µg/ml FD30	
Tratado	46,67	16,67	40,00	16,67	16,67	6,67	30,0
Sin tratar	53,33	83,33	60,00	83,33	83,33	93,33	70,0
Valor-p	0,612	<0,001	0,072	0,003	0,003	0,002	0,01

Como se resume en la Tabla VI, la RTI545 proporciona un efecto repelente sobre las larvas de SCRW cuando se los coloca en la línea media entre papeles filtro tratados y no tratados. La FD30 (*Bacillus thuringiensis*) no tiene el mismo efecto global. Se observó una evitación de SCRW cuando la kanosamina se combinó con la cepa FD30. En dos bioensayos separados, se observaron efectos de repelencia causados por la kanosamina, con todos los coeficientes de dilución entre 0,1 µg/ml y 100,0 µg/ml, a las 24 h. En un ensayo, el papel filtro tratado con kanosamina a 10 y 100 µg/ml proporcionó una respuesta de evitación igual o superior al 80% a los

SCRW. A los 3 d, se observó un daño de alimentación mínimo sobre el maíz situado en el lado tratado con kanosamina. Inversamente, la FD30 tuvo una diferencia no estadística del 20% en el número de larvas situadas en el papel de filtro tratado y no tratado a los 3 días; se observó un daño de alimentación notable sobre el maíz en ambos lados del ensayo alternativo con FD30. En un segundo ensayo, el papel filtro tratado con 30,0 µg/ml de kanosamina proporcionó una repelencia completa durante 5 días (datos no mostrados). En base a estos resultados, la capacidad de la RTI545 para repeler especies de insectos tales como WPB y SCRW puede deberse a su producción de kanosamina.

Ejemplo 7

Actividad del aislado RTI545 de *Bacillus thuringiensis* contra los nematodos

Los resultados del Ejemplo 6 sugieren que la actividad repelente de la RTI545 contra especies de insectos puede deberse a la producción de compuestos tales como la kanosamina. De forma similar, la actividad de la RTI545 contra los nematodos también puede ser debida al o a los compuestos producidos por la cepa. Se llevó a cabo un ensayo de quimiotaxis contra nematodos sobre placas de agar como se describe a continuación a efectos de evaluar la respuesta de ejemplares juveniles (J2) de nematodos RKN de los nudos de las raíces a diferentes concentraciones de kanosamina y de RTI545 sobrenadante *in vitro*.

La arena del ensayo se muestra esquemáticamente en la Figura 6. Unos platos Petri de 9 cm de diámetro fueron llenados con 15 ml de Phytigel al 0,75% (incluidos MgSO₄ al 0,1%, 7H₂O). Se utilizó sulfato de magnesio heptahidrato 7H₂O en lugar de agua agar, por lo que fue posible observar las trazas de los nematodos bajo un microscopio. Se prepararon cavidades de 0,5 cm de diámetro que pueden dar cabida

a aproximadamente 50 µl de solución en lados opuestos de los platos a 2 cm desde el centro. Las muestras de ensayo fueron aplicadas en las cavidades y se las dejó difundirse durante 1 hora con tapas sobre los platos, por lo que pudo establecerse un gradiente alrededor de las cavidades. A continuación, 75–100 nematodos de nodos de raíz en etapa J₂ suspendidos en 5 µl de agua destilada estéril fueron colocados mediante pipeta en el círculo central de 1,5 cm de la placa. Cuando se perdió la tensión de superficie de la suspensión acuosa, los platos fueron recubiertos con tapas y sometidos a incubación en la oscuridad sobre una plataforma nivelada a 25 °C durante de 1 a 4 horas. Después de incubación, las placas fueron transferidas a 4 °C para detener el movimiento de los nematodos para la evaluación a las 2 h, 3 h y 5 h después del montaje. Para cada material de ensayo se efectuaron tres replicados.

Para el puntaje, la arena de ensayo fue dividida en 16 zonas, designadas 1–8 para las zonas atractivas y a–h para las zonas repelentes, como se muestra en la Figura 6A. Los nematodos atraídos hacia la sustancia de ensayo tenderían a moverse hacia las zonas numeradas (atractivas), resultando en una aglomeración a lo largo del eje paralelo a la orientación de las cavidades. Los nematodos repelidos tenderían moverse hacia las zonas designadas con letras (repelentes), resultando una numeración a lo largo del eje perpendicular a la orientación de las cavidades. El factor de quimiotaxis (Cf) se calculó dividiendo el número total de nematodos en las zonas atractivas por el número total de nematodos en las zonas repelentes. Un Cf mayor que 2 significaba una atracción para los nematodos, mientras que inferior a 0,5 indicaba una repelencia, y se consideró que de 0,5 a 2 era neutro. Los resultados se muestran en la Tabla VII. En este bioensayo de quimiotaxis se comprobó que el agua destilada era neutra en todos los instantes de evaluación (Cf entre 0,5 y 2,0). El ácido acético al 1% mostró una repelencia al RKN J2 (Cf < 0,5) a las 3 h y 5 h desde la

iniciación del ensayo. El Cf para el ácido acético en un instante del tiempo de evolución temprana de 2 horas era neutro (no se muestran los datos), probablemente como resultado de una difusión lenta del producto químico en el medio Phytigel y/o respuesta retardada de los nematodos al producto químico. La Figura 6B es una fotografía de un ensayo de kanosamina ensayada a 100 µg/ml, en donde los puntos representativos de ubicaciones de nematodos indican una distribución neutra. La Figura 6C es una fotografía de un ensayo de RTI545 sobrenadante ensayado con una fuerza al 100%, en donde los puntos representativas de las ubicaciones de los nematodos indican una distribución repelente.

Tabla VII. La quimiotaxis del nematodo de los nudos de raíz (*Meloidogyne* spp.) en la presencia de la RTI545 sobrenadante

Tratamiento	Cf (factor de quimiotaxis)	
	A las 3 h	A las 5 h
kanosamina 1 µg/ml	1,0	1,0
kanosamina 10 µg/ml	0,6	0,7
kanosamina 100 µg/ml	0,6	0,7
Agua	1,0	1,0
Ácido acético (al 1%)	0,45	0,4
RTI545 sobrenadante al 1%	0,5	0,4
RTI545 sobrenadante al 10%	0,2	0,1
RTI545 sobrenadante al 25%	0,1	0,1
RTI545 sobrenadante al 50%	0,003	0,03

RTI545 sobrenadante 100%	0,003	0,01
medio 869 al 10%	0,1	0,01
medio 869 al 50%	0,1	0,06
medio 869 al 100%	0,03	0,02

Ninguno de las tres concentraciones ensayadas de kanosamina (1, 10 y 100 µg/ml) mostró propiedades repelentes en el ensayo. El factor Cf fue consistentemente mayor que 0,5 para todos los coeficientes de kanosamina probadas y para todos los instantes de tiempo ensayados. Todos los coeficientes ensayados de RTI545 sobrenadante (1%, 10%, 25%, 50% y 100%) y todos los coeficientes del medio 869 (10%, 25%, 50% y 100%) actúan como un repelente ($C_f \leq 0,5$), empezando a las dos horas de la iniciación del ensayo. Esta rápida respuesta de los nematodos J2 sugiere que el factor responsable del comportamiento de los nematodos se difunde fácilmente y establece un gradiente. En el caso del medio 869 no hubo una respuesta clara de la dosis con los coeficientes ensayados. Sin embargo, en el caso de la RTI545 sobrenadante, se observó unas respuestas claras a los coeficientes de ensayados: los coeficientes más elevados de sobrenadante resultaron en una repulsión más fuerte dolor de los nematodos (C_f inferior). Sin embargo, los resultados para la repelencia correspondiente a RTI545 no son concluyentes, debido a la fuerte actividad del medio 869 del ensayo

La ausencia de la repelencia de la kanosamina a los nematodos forma un contraste con la observada para los ensayos con insectos. La repelencia a los nematodos observado para la RTI545 parece deberse a algún otro factor distinto de la kanosamina.

Los compuestos producidos durante el cultivo a lo largo de la noche de la cepa RTI545 de (*Bacillus thuringiensis*) y el compuesto puro kanosamina fueron evaluados *in vitro* para caracterizar su efecto potencial sobre la eclosión de los huevos de los nematodo de nudos de raíz (RKN) (*Meloidogyne incognita/hapla*).

Sobrenadantes bacterianos:

Para obtener material sobrenadante para el ensayo, se hizo crecer un bucle (aproximadamente 10 µl) de la cepa RTI545 durante 16 h en 5 ml de medio 869 a 200 rpm a 30 °C. Al día siguiente, se midió la densidad óptica (DO) de diluciones 1: 100 a 600 nm para estimar el volumen necesario para la inoculación de matraces de fermentación. El cultivo bacteriano se inició en matraces de fermentación de 250 ml en 25 ml de medio 869 a una DO inicial de 0,01. Se cultivaron bacterias durante la noche (durante 16 h) a 200 rpm a 30 °C. Se guardaron 2 ml de cultivo bacteriano para medir la DO y las unidades formadoras de colonias (CFU, colony forming units). El cultivo remanente fue centrifugado (2500 rpm, 15 min) y el material sobrenadante se esterilizó por filtración a través de un filtro de 0,22 µm. El ensayo de eclosión se inició dentro de las 4 h de la recolección del material sobrenadante. El material sobrenadante se mantuvo a 4 °C hasta el inicio del bioensayo.

Se disolvió kanosamina (10 mg) en 1 ml de agua desionizada para obtener 10 mg/ml de solución madre. Para obtener una concentración de 200 µg/ml, se añadieron 20 µl de solución madre concentrada (10 mg/ml) a 990 ml de agua. Se hicieron entonces diluciones en serie para crear concentraciones de 20 µg/ml y de 2 µg/ml de kanosamina, respectivamente.

Se utilizó un cultivo mixto de nematodos de nudos de raíz (*Meloidogyne incognita* y *M. hapla*). Los huevos de nematodo se extrajeron de las raíces de tomate

mediante blanqueo y se limpiaron usando una etapa de centrifugación Opti–prep seguida de dos lavados en agua. Antes de montar el ensayo de eclosión, se determinó el porcentaje de huevos tempranos (huevos con un embrión visible) y huevos tardíos (huevos con juveniles diferenciados en su interior, etapas J1 o J2) contando los huevos bajo un microscopio. Para el bioensayo sólo se utilizaron solamente huevos frescos (tomados el día del inicio del ensayo).

El ensayo se realizó en placas de cultivo de tejidos de 24 cavidades. En cada cavidad se mezclaron 75 µl de solución de huevo en metilcelulosa al 2% (aproximadamente 100 huevos por cavidad) con 75 µl de solución antibiótica (300 mg/l de estreptomicina + 300 mg/l de penicilina) y 150 µl de cada tratamiento. Los antibióticos se suspendieron en agua destilada estéril. La concentración final de los antibióticos en las placas de ensayo fue de 75 mg/l de penicilina y 75 mg/l de estreptomicina. Todos los tratamientos contenían metilcelulosa al 2% (los huevos de RKN se suspendieron en metilcelulosa antes de la exposición al tratamiento). La adición de metilcelulosa aumenta la exactitud de la adición del mismo número de inóculo a cada tratamiento. Los tratamientos se establecieron en 6 repeticiones. Cada placa fue cubierta, envuelta en papel de aluminio y colocada en una incubadora regulada a 25 °C. El número de juveniles eclosionados en cada cavidad se contó bajo un estereomicroscopio a los 7 días y a los 14 días desde el inicio de la eclosión. Para cada instante de tiempo y tratamiento, se calculó el porcentaje de eclosión de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de eclosión} = [(\text{número de J2 en cavidad}) / (\text{número de huevos presentes en la cavidad al inicio del ensayo})] \times 100\%$$

La eclosión porcentual media de los huevos de nematodo de los nudos de raíz después de 7 y 14 días se muestra en la Tabla VIII. Todos los tratamientos fueron complementados con antibióticos (75 mg/L de penicilina y 75 mg/L de estreptomicina) para prevenir una contaminación. Los datos son valores medios de 6 réplicas $\pm$ desviación estándar de la media.

Tabla VIII. Impacto de los tratamientos sobre la eclosión % de los huevos de nematodos

Tratamientos		% de eclosión después de 7 días	% de explosión después de 14 días
1	RTI545 – sobrenadante al 2,5% (v/v)	5,2 $\pm$ 1,5	9 $\pm$ 4
2	RTI545 – Sobrenadante 12,5% (v/v)	6,9 $\pm$ 3,3	9,5 $\pm$ 5,3
3	RTI545 – Sobrenadante al 25% (v/v)	5,6 $\pm$ 1,8	9,6 $\pm$ 5,1
4	RTI545 – Sobrenadante al 50% (v/v)	5,2 $\pm$ 2,5	6,4 $\pm$ 2,3
5	kanosamina–1 μ g/ml	35,9 $\pm$ 5,2	40,1 $\pm$ 6,8
6	kanosamina–10 μ g/ml	39,4 $\pm$ 3	42,1 $\pm$ 12,1
7	kanosamina – 100 μ g/ml	32,4 $\pm$ 4,8	41,6 $\pm$ 6,8
8	Abamectina 0,1 ppm	24,4 $\pm$ 2,9	27,8 $\pm$ 5,7
9	Abamectina 1,0 ppm	4,9 $\pm$ 0,9	8,5 $\pm$ 1,6

10	Medio 869	$22,5 \pm 3,5$	$28,3 \pm 3,7$
11	agua sin antibióticos	$22,2 \pm 2,6$	$30,3 \pm 3,9$
12	agua	$21,3 \pm 1,9$	$30,9 \pm 5,4$

El porcentaje de huevos tempranos y tardíos recogidos para el ensayo fue del 41% y 59%, respectivamente. Los antibióticos, una menor coeficiente de Agrimek® (0,1 ppm) y medio 869 medios en blanco no tuvieron un efecto significativo sobre la eclosión de los huevos. El estándar químico Agrimek® inhibió la eclosión de los huevos *in vitro*. El coeficiente de 1 ppm causó un 72% de inhibición de la eclosión de los huevos después de 14 días. La eclosión con cualquier coeficiente de RTI545 sobrenadante y en el elevado coeficiente de Agrimek® (1 ppm) fue significativamente menor que en el control agua. No se observó una respuesta de dosis entre los coeficientes de RTI545 ensayados (2,5% –50%), y la totalidad de estos coeficientes fueron comparables al estándar químico Agrimek®. En contraste, el coeficiente de eclosión de los huevos expuestos a diversas concentraciones de kanosamina (1, 10 y 100 µg/ml) fue mayor que en el control de agua.

La TI545 sobrenadante del cultivo durante la noche en medio 869 en todos los coeficientes ensayados inhibió de manera significativa la eclosión de huevos. Se observaron resultados similares cuando la RTI545 sobrenadante se recogió a partir de 3 días de cultivo cultivado en el mismo medio (no se muestran los datos). Los compuestos responsables de la inhibición de la eclosión de los huevos están presentes en cultivos que se cultivaron durante la noche y durante 3 días.

La kanosamina tuvo un efecto positivo sobre la eclosión de los huevos. El coeficiente de eclosión de los huevos expuestos a la kanosamina fue hasta un 80%

mayor que el coeficiente de eclosión de huevos incubados en control de agua después de siete días. Estos resultados están de acuerdo con las propiedades bioquímicas de la kanosamina. La kanosamina fue identificada como inhibidor de la síntesis de quitina (Janiak and Milewski, 2001). La cáscara de huevo de nematodo está compuesta de quitina y la eclosión de los huevos | huevo implica una degradación de la quitina– el proceso opuesto a la síntesis de la quitina.

Aunque no se pretende estar limitado por teoría alguna, los resultados de los ensayos sugieren que la actividad antinematodo de la RTI545 no se debe a la kanosamina. El comportamiento diferente de los materiales sobrenadantes de RTI545 y de los extractos de medio 869 en los ensayos de repelencia y de eclosión de huevos sugiere que la RTI545 produce un compuesto aún no identificado que proporciona un comportamiento antinematodo.

EJEMPLO 8

Efectos sobre el crecimiento y rendimiento mediante el tratamiento de las semillas de maíz y de soja con RTI545 de *Bacillus thuringiensis*

Se realizaron experimentos para determinar el efecto sobre el crecimiento y el rendimiento bajo presión de insectos mediante el tratamiento de las semillas de maíz y soja con esporas de RTI5435 de *B. thuringiensis*, en combinación con un insecticida químico.

Los efectos sobre uno o más de los siguientes: crecimiento, rendimiento y control de las plagas del maíz: el gusano de alambre y la larva de las semillas, se midieron en ensayos de campo en Wisconsin. Se realizaron experimentos adicionales en invernadero para medir el efecto sobre el crecimiento temprano de las plantas en

la presencia del gusano de alambre. Los experimentos se realizaron como se describe a continuación.

Formulaciones:

Un concentrado de esporas de RTI545 de *B. thuringiensis* ($1,0 \times 10^{10}$ cfu/ml) en agua fue aplicado en una cantidad de $1,0 \times 10^6$ cfu/semilla.

MAXIM (SYNGENTA CROP PROTECTION, INC) se aplicó a semillas a razón de 0,0064 mg AI/grano (A.I. = fludioxonil).

APRON XL (SYNGENTA CROP PROTECTION, INC) se aplicó a semillas de acuerdo con la etiqueta del fabricante (A.I. = mefenoxam).

PONCHO 250, PONCHO 500 VOTIVO, y PONCHO 1250 VOTIVO (BAYER CROP SCIENCE) se aplicaron, cada uno de ellos, a las semillas de acuerdo con la etiqueta del fabricante (PONCHO A.I. = clotianidina y VOTIVO A.I. = *Bacillus firmus* I-1582).

En el primer experimento en el campo, unas semillas de maíz fueron tratadas con suspensiones que contenían: 1) producto químico de control MAXIM + APRON XL (referido como "FC"); 2) FC + el insecticida bifentrina 0,125 mg/semilla; 3) FC + PONCHO 1250 (clotianidina 1,25 mg/semilla) y VOTIVO (*Bacillus firmus* I-1582); 4) FC+ PONCHO 250 (clotianidina 0,25 mg/semilla); 5) FC+ PONCHO 500 (clotianidina 0,5 mg/semilla y VOTIVO (*Bacillus firmus* I-1582) y ; 6) FC+ bifentrina (0,125 mg/semilla) + esporas de *B. thuringiensis* RTI545.

Las semillas de maíz tratadas se plantaron en ensayos de campo separados en Wisconsin en suelo infestado con las plagas de insectos: el gusano de alambre y gusano de semilla. En un ensayo, se añadió estiércol a parcelas para atraer la puesta de huevos por *Delia spp.* adultos. Las puntuaciones recogidas y analizadas fueron: %

de emergencia, densidad de las plantas por unidad de superficie, % de daño por el gusano de alambre, % de daño por el gusano de las semillas, vigor y rendimiento de la planta. La severidad del daño causado por la alimentación de los insectos se clasificó mediante inspección visual 34 días después de la plantación, y el vigor de la planta se clasificó en una escala de 1 a 5, siendo 1 muy malo y 5 representa un excelente grado de vigor de la planta.

Los resultados se muestran a continuación en la Tabla IX. La inclusión del RTI545 de *B. thuringiensis* en combinación con el insecticida bifentrina dio como resultado mejoras significativas en el porcentaje de emergencia, cantidad de plantas por unidad de superficie, el vigor y el control tanto del gusano de alambre como del gusano de las semillas sobre las semillas tratadas con bifentrina sola. Además, los resultados de la combinación de RTI545 de *B. thuringiensis* y bifentrina fueron estadísticamente equivalentes a los del producto PONCHO 1250 VOTIVO en el control del gusano de alambre y mostraron una mejora con respecto a este producto en el control del gusano de la semilla. Estos datos indican que el tratamiento de las semillas de maíz con una combinación de RTI545 de *B. thuringiensis* con un insecticida químico tal como bifentrina mejora significativamente el control de insectos en comparación con la inclusión de insecticida químico solo y es superior a los productos comercialmente disponibles para algunos tipos de control de insectos.

Tabla IX. Control del gusano de alambre y del gusano de las semillas en ensayos de campo de maíz después del tratamiento de las semillas con una combinación de insecticida químico y esporas de RTI545 en comparación con PONCHO VOTIVO

TRATAMIENTO	%	Emergencia	Número	% de		Vigor		
				daños	daños	por gusano de alambre	por larva de las semillas	1–5
1 FC*	70	78	26	14	3	3	3	
2 FC+Bifentrina	81	85	13	11	3,8	4	4	
3 FC+Poncho 1250	91	93	6,2	5,4	4	4,3	4,5	
Votivo								
4 FC+PONCHO 250	80	89	14	11	3,8	4	4	
5 FC+Poncho 500	85	89	14	7,4	4	4	4	
Votivo								
6 FC+Bifentrina+RTI545	92	96	5,6	3,2	4,5	4,8	5	

*FC es la verificación de fungicida aplicado a todos los tratamientos que contienen fludioxonilo y Mefenoxam para proveer protección contra las enfermedades

En una segunda prueba de campo, las semillas de maíz también fueron tratadas con las mismas suspensiones que el primer ensayo que contenía: 1) control

químico MAXIM + APRON XL (denominado “FC”); 2) FC + bifentrina; 3) FC + PONCHO 1250 VOTIVO; 4) FC + PONCHO 250; y 5) FC + bifentrina + esporas de RTI545. Las semillas de maíz tratadas se plantaron en un ensayo de campo separado en Wisconsin con el gusano de alambre presente y no se añadió estiércol por lo que el gusano de la semilla no fue un problema. El daño de las raíces del maíz debido a la alimentación del gusano de alambre se evaluó a los 41 días después de la plantación.

Los resultados se muestran a continuación en la Tabla X y muestran resultados similares a los de la Tabla IX anterior. Específicamente, la inclusión del RTI545 de *B. thuringiensis* en combinación con el insecticida bifentrina dio como resultado mejoras significativas en el porcentaje de emergencia, población de plantas por unidad de área, vigor y el control del gusano de alambre con respecto a las semillas tratadas con bifentrina sola. Además, los resultados de la combinación de RTI545 de *B. thuringiensis* con bifentrina fueron estadísticamente equivalentes o superiores a los del producto PONCHO 1250 VOTIVO en el control del gusano de alambre.

Tabla X. Control del gusano de alambre en ensayo en campo de maíz después del tratamiento de las semillas con una combinación de insecticida químico y esporas de RTI545 en comparación con PONCHO VOTIVO.

		% de daño por	
Emergencia	Población	gusano	de Vigor
		alambre	

TRATAMIENTO	%	%		1–5
1 FC*	68	76	32	3
2 FC + Bifentrina	79	85	21	4
3 FC + Poncho 1250 Votivo	89	93	11	4,3
4 FC + PONCHO 250	79	86	17	4
5 FC + Bifentrina+RTI545	91	95	4	4,5

*FC es la verificación de fungicida aplicada a todos los tratamientos que contienen fludioxonilo y mefenoxam para proveer protección contra las enfermedades

También se determinó el rendimiento promedio en las pruebas de campo de maíz después del tratamiento de las semillas con una combinación de insecticida químico y esporas de RTI545 en comparación con PONCHO VOTIVO. Los resultados se muestran a continuación en la Tabla XI. La inclusión del RTI545 de *B. thuringiensis* en combinación con el insecticida bifentrina dio lugar a mejoras significativas en el rendimiento en comparación con las semillas tratadas con bifentrina sola. Además, la combinación de RTI545 y bifentrina superó a PONCHO 500 VOTIVO y PONCHO 1250 VOTIVO al aumentar el rendimiento de 13 bushels/acre (de 180,5 a 193,7 y de 185,5 a 193,7 bushels/acre, respectivamente), lo que representa un aumento de 6,8% y 4,2% rendimiento de grano, respectivamente. Estos datos indican que el tratamiento de las semillas de maíz con una combinación de RTI545 y un insecticida químico tal como la bifentrina mejora significativamente el rendimiento en comparación con la inclusión de insecticida químico solo, y que reduce la necesidad de aplicación en surco de cantidades mayores de insecticidas químicos para controlar el daño causado por los insectos.

Tabla XI. Rendimiento promedio en ensayo de campo de maíz después de tratamiento de las semillas con una combinación de insecticida químico y esporas de RTI545 de *B. thuringiensis* en comparación con PONCHO VOTIVO

TRATAMIENTO	Bushels/acre			Kg/hectárea		
	LB02	LB01	N promedio=2	LB02	LB01	N promedio= 2
1 FC	130,2	149, 1	139,7	8.173	9359	8.767
2 FC+Bifentrina	159,8	173, 9	166,9	10.031	10.91 6	10.476
3 FC+PONCHO 250	171,4	174, 2	172,8	10.759	10.93 5	10.847
4 FC+PONCHO VOTIVO	500 177	184	180,5	11.111	11.55 0	11.330
5 FC+PONCHO VOTIVO	1250 183,4	187, 5	185,5	11.512	11.76 9	11.644
6 FC+Bifentrina + RTI545	191,9	195, 4	193,7	12.,04 6	12.26 5	12.159

Se evaluó adicionalmente el efecto sobre el crecimiento bajo presión de insectos mediante el tratamiento de las semillas de maíz con esporas de RTI545. En un conjunto de estudios en invernadero, las semillas de maíz fueron tratadas por primera vez con las suspensiones de tratamiento de semillas como se describen a

continuación y luego se la planta en un suelo infestado con el gusano de alambre (10 gusanos de alambre por maceta con una semilla), junto con un conjunto de control donde el suelo no contenía gusanos de alambre. Las suspensiones para el tratamiento de semillas fueron las siguientes: 1) control químico MAXIM + APRON XL (denominado "FC"); 2) FC; 3) FC + bifentrina (0,125 mg/semilla para todos los tratamientos tratados); 4) FC + bifentrina + RTI545 $5,0 \times 10^6$; 5) FC + bifentrina + RTI545 $5,0 \times 10^6$ y tratado térmicamente; 6) FC + bifentrina + RTI545 $1,0 \times 10^6$; 7) FC + RTI545 $5,0 \times 10^6$; y 8) FC + PONCHO 1250. Se evaluó la emergencia porcentual de las semillas tratadas.

Los resultados se muestran a continuación en la Tabla XII. La inclusión del RTI545 de *B. thuringiensis* en combinación con el insecticida bifentrina dio como resultado una emergencia del 100%, lo que supuso una mejora con respecto a la inclusión de bifentrina sola y proporcionó resultados equivalentes al control sin gusano de alambre y al tratamiento químico FC + PONCHO 1250. La alimentación de los gusanos de alambre con las raíces podadas causó el retraso en el crecimiento de la planta de maíz, y la RTI545 solo o la bifentrina con RTI545 redujo el retraso de la planta en las plantas sobrevivientes. La RTI545 sola mostró una actividad en la prevención de la pérdida de plantas, pero fue inferior al insecticida bifentrina en proporcionar protección temprana contra el retraso del crecimiento. Sin embargo, la RTI545 fue más eficaz en la prevención del retraso de plantas a medida que las plantas crecieron (datos no presentados). Estos datos indican que la inclusión de esporas de RTI545 en el tratamiento de las semillas de maíz, solas o en combinación con un insecticida químico tal como la bifentrina, mejora significativamente la salud de las plantas en presencia de la plaga gusano de alambre.

Tabla XII. Emergencia y crecimiento en estudios de invernadero con maíz en la presencia del gusano de alambre después del tratamiento de las semillas con insecticida químico y RTI545.

Tratamiento		Emergencia 1=100%	% de plantas que sobreviven sin atraso (basado en las plantas sembradas)
1	FC sin gusano de alambre	1,00	100
2	FC	0,17	0
3	FC+ Bifentrina	0,75	58
4	FC+ Bifentrina + RTI545 5x10 ⁶	0,83	75
5	FC+ Bifentrina + RTI545 5 x10 ⁶ calor	0,83	83
6	FC+ Bifentrina + RTI545 1 x10 ⁶	1,00	92
7	FC+ RTI545 5 x10 ⁶	0,50	50
8	FC+ PONCHO 1250	1,00	100
<i>Desviación estándar</i>		0,175389044	
CV		23,13	

Se realizaron experimentos para determinar el efecto sobre el rendimiento tratando semilla de soja con una combinación fungicida estándar de ingredientes químicamente activos además de esporas de RTI545 de *B. thuringiensis*, en

combinación con un insecticida químico. Los experimentos se realizaron como se describe a continuación.

Formulaciones:

Un concentrado de esporas de RTI545 ($1,0 \times 10^{10}$ cfu/ml) en agua fue aplicado en una cantidad de $1,0 \times 10^6$ cfu/semillas.

El FC es una formulación que contiene fludioxonilo, TPM, y mefenoxam que fue aplicado a semillas a razón de 2,5 g/100g semillas (fludioxonil), 10 g/100g (TPM), y 7,5 g/100 g de semillas (mefenoxam).

El tiometoxamo fue aplicado a las semillas a razón de 50 g/100 g de semillas.

En el experimento, unas semillas de soja se mezclaron con una solución que contenía: 1) control químico fludioxonil/TPM/mefenoxam ("FC"); 2) FC + insecticida tiametoxam; y 3) FC + tiametoxam + esporas de RTI545 de *B. thuringiensis*. Las semillas de soja tratadas fueron plantadas en tres sitios (N = 3) que presentaban una infestación de gusanos de alambre, y se analizó el rendimiento.

Los resultados se muestran a continuación en la Tabla XIII. La inclusión de las esporas RTI545 en combinación con el tiametoxam dio lugar a mejoras significativas en el rendimiento en comparación con las semillas tratadas con tiametoxam solo, aumentándose el rendimiento en 1,6 bushels/acre (de 68,2 a 69,8), lo que representa un aumento del rendimiento del 2,3%. Estos datos indican que el tratamiento de las semillas de soja con una combinación de RTI545 y un insecticida químico mejora significativamente el rendimiento en comparación con la inclusión de insecticida solo, y reduce la necesidad de una aplicación en surco de cantidades mayores de insecticidas químicos para controlar el daño causado por los insectos.

Tabla XIII. Rendimiento promedio de soja después de tratamiento de las semillas con insecticida químico y esporas de RTI545 además de un tratamiento de las semillas mediante un fungicida estándar (FC).

Tratamiento	Bu/A (N=3)	Kg/hectárea
FC	60,8	4089
FC + Tiametoxam	68,2	4586
FC + Tiametoxam + RTI545	69,8	4694

Una explicación posible para el control mejorado de los insectos mediante el tratamiento de las semillas o en surcos con esporas de RTI545 en combinación con un insecticida químico se ilustra en la FIG. 1. Específicamente, la FIG. 1A es un diagrama esquemático que muestra el control de insectos con un insecticida químico solo, (es decir, sin RTI545). La figura 1A muestra en su extremo izquierdo semillas de planta (círculo interior) revestidas con un insecticida químico (banda oscura que rodea el círculo interior), que está rodeada de plagas de insectos de planta en la rizosfera de la planta representada mediante marcas horizontales. La parte media del diagrama muestra las semillas de planta germinada con insecticida difuso que protege las raíces de las semillas de las plantas contra las plagas de insectos (protección representada por las marcas "X"). La extrema derecha del diagrama muestra una protección disminuida de las raíces de las semillas de las plantas contra las plagas de insectos a medida que las raíces crecen más allá de la zona de difusión del insecticida químico. La Figura 1B muestra cómo la adición de las esporas de RTI545 de *Bacillus thuringiensis* al revestimiento de las semillas de plantas (o en la aplicación en surco de esporas RTI545 alrededor del momento de la planta) mejora el control de los

insectos en comparación con el uso del revestimiento insecticida solo. Específicamente, el extremo derecho de la Figura 1B muestra la protección continua de las raíces de las semillas de planta contra las plagas de insectos, incluso cuando las raíces crecen más allá de la zona de difusión del insecticida químico como resultado del establecimiento de la RTI545 de *Bacillus thuringiensis* en la rizosfera de la planta.

EJEMPLO 9

Control de nematodos mediante el aislado RTI545 de *Bacillus thuringiensis* en suelo infestado

La capacidad de la cepa RTI545 de *Bacillus thuringiensis* para reducir la infestación de nematodos en la soja y en la papa se determinó como se describe a continuación.

Se llevó a cabo un estudio en invernadero con plantas de soja plantadas en un suelo infestado con nematodos de nudos de raíz del Sur para determinar el efecto del tratamiento con esporas RTI545 aplicadas a razón de $1,00 \times 10^6$ cfu/semillas. Unas plantas de soja fueron plantadas en macetas con tierra infectada con huevos vivos de nematodos de nudos de raíz del Sur (*Meloidogyne incognita*). Unas semillas tratadas con cada uno de los productos PONCHO VOTIVO (BAYER CROPS SCIENCE LP; A.I. = 40,3% de clotianidina, 8,1% de *Bacillus firmus* I-1582) y AVICTA COMPLETE (SYNGENTA; A.I. = 11,7% de tiametoxam, 10,3% de abamectina, 2,34% de tiabendazol, 0,3% de fludioxonilo, 0,23% de mefenoxam, 0,12% de azoxistrobina), por separado, que contenían ingredientes químicamente activos en las concentraciones designadas sobre las etiquetas de los productos. Los datos se muestran en la siguiente Tabla XIV. En el día 63 después de la iniciación, no hubo diferencia

estadística en el número de huevos de nematodos/maceta para el tratamiento de las semillas con las células RTI545 y la combinación química AVICTA COMPLETE, sin embargo, el número de huevos de nematodos/maceta para las semillas tratadas con RTI545 era inferior al de las semillas tratadas con PONCHO VOTIVO. No hubo una diferencia estadística en el número de juveniles/maceta para ninguno de los tratamientos después de 63 días. Estos datos demuestran el efecto positivo sobre el control de los nematodos sobre la soja provisto por RTI545 de *Bacillus thuringiensis*.

Tabla XIV. Infestación de nematodos a lo largo del tiempo en sojas después del tratamiento de las semillas con esporas de RTI545.

Nematodo de los nudos de raíz del Sur					
	35 DP-1			63 DP-1	
	Masa	de	Huevos/ma	Juveniles/ma	Huevos/ma
	huevos/ma	ceta	ceta	ceta	Juveniles/ma
	ceta				ceta
Sin nematodos	0	0	0	0	0
Control	57	6434	2	7880	463,2
RTI545	41	6340	0	2795	268,8

PONCH	43	5540	0	6720	427,2
O					
VOTIVO					
AVICTA	7	1377	0	2455,1	79,2
COMPLE					
TE					
CV	29,83	35,75	349,6	29,41	130,09

Se realizó un estudio de invernadero con plantas de papa en maceta en suelo naturalmente infestado con nematodos *Globodera sp.* para determinar el efecto del tratamiento del suelo con células RTI545 de *Bacillus thuringiensis*. En este experimento, se determinó el efecto de la mejora del suelo con células RTI545 sobre el número de quistes por gramo de biomasa de raíz a los 60 días después del inicio del estudio. Se sembraron papas (variedad sensible al nematodo "Bintje") en el suelo infestado con *Globodera sp.* (Control) y mejorado con $10E^9$ cfu de esporas por litro de suelo de *Bacillus thuringiensis* RTI545 (RTI545). Los resultados se muestran en el gráfico de la Figura 5. Tratamientos adicionales del suelo fueron incluidos en el estudio: producto VYDATE (Vydate, DUPONT, AI = Oxamil [Methoil N'N'-dimetil-N-[(metilcarbamoil) oxil) oxi]-1-tiooxamimidato), producto BIOACT, BAYER CROPS SCIENCES LP, AI = cepa 251 de *Paecilomyces lilacinus*), producto CAREX (CAREX, NUFARM, piridaben) y *Bacillus thuringiensis* spp. *kurstaki* HD-1). Los productos se aplicaron con los coeficientes indicados en las etiquetas del producto. Como puede verse en la Figura 5, el número de quistes por gramo de biomasa de raíz para el suelo tratado con células RTI545 se redujo significativamente en

comparación con todos los tratamientos, inclusive los productos que contienen ingredientes químicamente activos.

EJEMPLO 10

Tratamiento de las semillas de algodón con RTI545 de *Bacillus thuringiensis* inoculado con *Rhizoctonia*

Se realizaron experimentos para investigar el efecto sobre la emergencia, la enfermedad de las raíces y el rendimiento en el algodón en presencia de la presión de la enfermedad de *Rhizoctonia* cuando las semillas fueron tratadas con una cepa RTI545 además de agentes químicamente activos para el control de agentes patógenos.

Específicamente, se estableció un experimento en algodón como sigue: 1) semillas no tratadas (UTC); 2) semillas tratadas con una combinación de base de Fludioxonil + Mefenoxam + Imidacloprid según la etiqueta del fabricante (denominada "B"); 3) semillas tratadas con base más 5×10^5 cfu/semillas de RTI545 (B + RTI545); y 4) semillas tratadas con base más VIBRANCE (ingrediente activo sedaxano, SYNGENTA CROP PROTECTION, INC) según las instrucciones de la etiqueta (B + VIBRANCE). Se realizaron ensayos de campo en Georgia. Los ensayos se inocularon con *Rhizoctonia* mezclando el inóculo seco con las semillas en el momento de la plantación en una dosis prescrita para proporcionar una infección cuando las semillas comenzaron a crecer. El porcentaje promedio de la emergencia del algodón se presenta en la siguiente Tabla XV.

Los resultados en la Tabla XV muestran que el tratamiento con esporas RTI545 además de la base dio como resultado una mejora significativa en el porcentaje de emergencia sobre el de la base química sola (67% frente a 45% para la base sola).

Además, se realizó el tratamiento con RTI545 así como con la base más producto comercial VIBRANCE con producto químicamente activo. Por lo tanto, el tratamiento de las semillas RTI545 puede proporcionar una mejora significativa en la emergencia, incluso en condiciones de una severa presión de agentes patógenos.

Tabla XV. Emergencia del algodón en suelo inoculado con *Rhizoctonia* a partir de semillas tratadas con RTI545.

Tratamiento		% de emergencia
1	Controles no tratados	23
2	B	45
3	B + RTI545 (5×10^5 CFU/semillas)	67
4	B + VIBRANCE	63

EJEMPLO 11

Efectos sobre el crecimiento y rendimiento mediante el tratamiento de las semillas de trigo con RTI545 de *Bacillus thuringiensis*

Se realizaron experimentos para determinar el efecto sobre el crecimiento y el rendimiento bajo presión de insectos por semillas de trigo tratadas con esporas de RTI545 de *B. thuringiensis* solamente, o en combinación con uno o ambos de fungicidas químicos y un insecticida químico. Más específicamente, se midieron los efectos sobre el crecimiento, el rendimiento y el control de las plagas de trigo gusano de alambre y larva blanca en ensayos de campo en Wisconsin. Los experimentos se realizaron como se describe a continuación, comparando la adición de esporas de

RTI545 de *B. thuringiensis* con semillas y con semillas más base fungicida, y adición de esporas RTI545 en combinación con 2 concentraciones del insecticida, bifentrina, además de la base fungicida.

En el experimento de ensayo de campo, unas semillas de trigo se trataron con suspensiones que contenían: 1) fungicida base química difenoconazol/tebuconazol/TPM/mefenoxano (denominado “FC”); 2) FC + esporas de RTI545 de *B. thuringiensis* (RTI545 10^6 cfu/g semillas); 3) FC + Bifentrina (20 g/semillas); 4) FC + Bifentrina (20 g/semillas) + RTI545 10^6 cfu/g semillas; 5) FC + bifentrina (50 g/semillas); y 6) FC + bifentrina (50 g/semillas) + RTI545 10^6 cfu/g semillas

Las semillas de trigo tratadas se plantaron en ensayos de campo en Wisconsin en suelo infestado con plagas de insectos gusano de alambre y larva blanca. Las calificaciones recolectadas y analizadas fueron: % de emergencia, % de daño por gusano de alambre, % de daño por larva, vigor y rendimiento de la planta. La gravedad del daño por la alimentación de los insectos se evaluó mediante inspección visual 35 días después de la plantación, y el vigor de la planta se clasificó en una escala de 1 a 5, siendo 1 bajo y 5 sumamente vigoroso.

Los resultados se muestran a continuación en la Tabla XVI. El tratamiento de las semillas con cada una de las esporas de los siguientes: esporas RTI545 de *B. thuringiensis*, y el tratamiento con las esporas RTI545 con sea la base de fungicida solamente o en combinación con el insecticida, bifentrina, resultó en mejoras significativas en el porcentaje de emergencia, vigor, control de gusano de alambre y de la larva, y rendimiento. En todos los casos probados, la inclusión de las esporas

RTI545 en el tratamiento de las semillas de trigo resultó en mejoras significativas en crecimiento, vigor, control de plagas, y rendimiento.

Tabla XVI. Control del gusano de alambre y de la larva en ensayos de campo con trigo después del tratamiento de las semillas con una combinación de insecticida química y esporas de RTI545.

TRATAMIENTO	Emerge ncia (21 DAP)	Vigor (35 DAP)	% de daño		Rendimiento	
	%	1–5	Gusano de alambre	Larva	Bu/Acr e	Kg/H a
1 FC*	59	3,5	26	7,5	70	4708
2 FC* + RTI545	72	5	10	4	82	5514
3 FC + Bifentrina (20 g)	64	4	19	6,5	77	5178
4 FC + Bifentrina (20 g) + RTI545	74	5	8	3	81	5472
5 FC + Bifentrina (50 g)	70	4,8	14	3,3	82	5514
6 FC + Bifentrina (50 g) + RTI545	76	5	6	1,8	86	5784

*FC es la verificación de fungicida aplicada a todos los tratamientos que contienen Difenconazol + TPM + Tebuconazol + Mefenoxam para proveer protección contra las enfermedades.

EJEMPLO 12

Impacto del tratamiento de la semillas con RTI545 de *Bacillus thuringiensis* sobre el crecimiento y rendimiento de soja inoculada con *Rhizoctonia*

Se realizó un ensayo de campo en Quitman, GA, para probar la eficacia de la adición de RTI545 a un tratamiento de base químico fungicida/insecticida para proporcionar protección de *Rhizoctonia* en comparación con las semillas no tratadas o esta base o el control positivo comprometiendo la base sintética más sedaxano.

Unas semillas de soja de la variedad de soja cv. Pioneer 93Y92 se trataron con suspensiones separadas preparadas para los tratamientos químicos y biológicos que se aplicaron simultáneamente a las semillas. Las semillas se colocaron en un frasco que se agitó sobre un agitador de pintura modificado hasta que el producto quedó uniformemente revestido sobre las semillas. El tratamiento químico base comprendía cuatro principios activos que comprendían 1) 12,8 g/l de fludioxonil, 2) 38,4 g/l de mefenoxam, 3) 38,4 g/l de tiofanato–metilo (TPM) y 4) 256 g/l de tiametoxam como formulación única y se aplicó a razón de 41,4 ml/140,000 semillas. Se aplicó Vibrance (500 g/l de sedaxano) por separado como un tratamiento de semillas al tratamiento de control positivo. Se utilizó técnica seca de la cepa RTI545 y se diluyó en agua para obtener un coeficiente de aplicación de 5×10^5 cfu/semillas. Los productos se suspendieron con agua hasta por lo menos 65 ml/140,000 semillas para asegurar una aplicación uniforme. El ensayo incluyó pruebas de bloques completos al azar (4 repeticiones) en parcelas de 1,8 metros por 9 metros de parcelas. Semillas de la

variedad de soja cv. Las semillas tratadas y no tratadas se plantaron en suelo arenoso utilizando un plantador de cono con una plantación de 13 semillas/metro a una profundidad de 2,5 cm y una separación entre filas de 90 cm. El inóculo de *Rhizoctonia* fue mezclado y plantado junto con las semillas. Las parcelas y plantas de soja fueron tratadas en condiciones agronómicas generalmente aceptadas para la soja, incluyendo la labranza convencional y con riego suplementario de acuerdo con necesidad. Las plantas se evaluaron durante el período de crecimiento en cuanto a su emergencia, vigor (en una escala cualitativa de 1–5, siendo 5 el mejor valor) y luego se cosecharon para evaluar el rendimiento convertido en bu/acre y kg/hectárea. Los resultados se resumen en la siguiente Tabla XVII.

Tabla XVII. Impacto del tratamiento de las semillas con RTI545 sobre el crecimiento y rendimiento de sojas inoculadas con *Rhizoctonia*

Descripción	Emergencia			Vigor			Rendimiento	
	%			1–5			BU/Acre	Kg/Ha
Unidad de evaluación							e	
Intervalo Planta Eval (DAP)	6	14	18	6	14	18	131	
								2004
Semillas no tratadas	22	20	16	1,8	8	1,3	29,8	
								3289
Base sintética (Base)	71	57	50	2,8	3	2,8	48,9	
								3336
Base + RTI545 5×10^5 cfu/semillas	86	60	60	3,8	8	4,5	49,6	

					4,		3551
Base + Vibrance	83	65	62	4,0	3	4,3	52,8

El impacto de Rhizoctonia es el de reducir la población de plantas por unidad de área, reducir el vigor y disminuir los rendimientos. La inoculación fue efectiva en vista de que el tratamiento de base se mejoró significativamente en comparación con las semillas no tratadas para todos los recuentos de plantas, evaluaciones de vigor y rendimiento.

La adición de RTI545 a la base química dio lugar a un aumento significativo en la población de plantas por unidad de área en la totalidad de los 3 momentos de evaluación, el vigor aumento significativamente en 2 momentos de evaluación y se obtuvo un rendimiento numéricamente mayor en comparación con la base química. La disminución de los valores población y de vigor puede deberse a que las plantas mueren. La adición de sedaxano a la base sintética, que es un activo registrado para el control de Rhizoctonia, dio como resultado un aumento de la emergencia, un vigor y un rendimiento numéricamente mayor que la base sintética. La adición de RTI545 fue similar al tratamiento con sedaxano para todas las valoraciones lo que demuestra que está cepa es efectiva para reducir los daños causados por Rhizoctonia en este ensayo.

Ejemplo 13

Impacto del tratamiento de las semillas con RTI 545 de *Bacillus thuringiensis* sobre el crecimiento y rendimiento del maíz plantado en un campo infestado con gusanos de alambres y gusanos de las semillas

Se llevó a cabo un ensayo de campo en Wisconsin para probar la eficacia de la RTI545, además de un fungicida de base (Maxim y XL Apron, ambos aplicados a 5,2 ml/100 kg) o esta base fungicida y clotianidina (0,25 mg/semillas) o esta base fungicida más bifentrina (0,125 mg/semillas) o esta base fungicida más clorantraniliprol (2 dosis evaluadas para 0,25 y 0,5 mg/semillas) o bifentrina (0,125 mg/semilla) combinado con clorantranilipol (0,25 mg/semillas) Como control positivo para demostrar un elevado nivel de protección, la clotianidina se aplicó a razón de 1,25 mg/semillas combinado con el fungicida base, evaluándose también esta elevada base que representa 5 veces la carga del bajo coeficiente de clotianidina.

Se trataron semillas de maíz (variedad cv. Ag Venture G5891) preparándose suspensiones separadas para los tratamientos químicos y biológicos que se aplicaron simultáneamente a las semillas. Unas semillas se colocaron en un frasco que se agitó sobre un agitador de pintura modificado hasta que el producto se revistió uniformemente sobre las semillas. El tratamiento químico base comprendía tres formulaciones comerciales que comprendían: 1) 40,3% de fludioxonilo, 2) 33,3% de mefenoxam, 3) 18,4% de clorantraniliprol, 4) 600 g/l de clotianidina y 5) 400 g/l de bifentrina. Se utilizó técnica seca de la cepa RTI545 y se diluyó en agua de manera de obtener un coeficiente de aplicación 1×10^6 cfu/semillas. Los productos se suspendieron hasta por lo menos 600 ml/100 kg para asegurar una aplicación uniforme. El tratamiento 13 es Base + Clotianidina 1,25 mg/semillas como un control positivo para un elevado nivel de protección contra el gusano de alambre. El ensayo incluyó ensayos de bloques completos aleatorizados (4 repeticiones) de parcelas de 3 metros por 15 metros. Las semillas de maíz fueron plantadas en suelo limo arcilloso limoso de Milford usando un plantador de cono con un coeficiente de semillas de 93,900 semillas/hectárea, una profundidad de 6,25 cm y espaciamiento entre filas de

75 cm. Se distribuyó estiércol sobre la parte superior de las parcelas después de atraer los gusanos para que pongan huevos en las parcelas. Las parcelas y las plantas de maíz fueron tratadas bajo condiciones agronómicas generalmente aceptadas para el maíz, lo que incluye labranza (arado) mínima siendo la precipitación pluvial de promedio a arriba de promedio para el área. Las plantas fueron evaluadas durante el período de crecimiento para establecer: emergencia, vigor (en una escala cualitativa 1–5 con 1 = vigor bajo y 5 = alto vigor–plenitud de las parcelas calificadas), daño causado por la alimentación de los gusanos de alambres y gusanos de semillas (clasificado por muestreo de 50 plantas y evaluar el daño experimentado en las raíces por el gusano de alambre o por el gusano de las semillas), y la continuación se cosecha para evaluar el rendimiento. Los resultados se resumen en la Tabla XVIII.

Tabla XVIII. Impacto del tratamiento de las semillas mediante RTI545 sobre el crecimiento y rendimiento del maíz en un campo infestado con gusanos de alambre y larva de las semillas

															Gusan		Larva																					
															o		de		de las																			
															alamb		semill																					
															re		as																					
															% de		% de		Rendimie																			
Descripción															a		ón		Vigor		daño		daño		nto Bu/A													
Intervalo de																																						
evaluación de la																																						
planta																																						
(Días después de															1		2		4		1		2		4													
la plantación)															8		8		2		164		9		8		2		8		2		164					
																					3		3		3		1		3		2		2					
1. MAXIM+															4		6		6				,		,		,		7,		3,		3,		2,			
APRON XL (Base)															9		0		2		57		0		0		0		4		6		6		5		149,3	
2. Base +																							3		3		3		1		2		1		2			
RTI545 1x 10 ⁶															5		6		6				,		,		,		1,		3,		8,		1,			
cfu/semillas															2		5		9		63		3		3		3		2		7		7		3		170,9	
																							3		4		4						1		1			
															6		7		8				,		,		,		8,		1		2,		2,			
3. Base+															3		7		2		72		5		0		0		6		7		4		5		210,4	

Clotianidina 0,25

mg/semillas

4. Tratamiento 3 +

4 4 4

RTI545 a 1×10^6 7 9 9 , , , 4, 4, 3,

cfu/semillas 6 1 1 80 5 5 8 5 2 2 8 225,8

4 4 4 1 1

5. Base +

6 8 8 , , , 7, 0, 8, 2,

Bifentrina 8 1 2 72 0 0 0 3 8 3 5 211,1

6. Tratamiento 5 +

4 4 4

RTI545 a 1×10^6 7 8 9 , , , 7, 9, 6, 7,

cfu/semillas 4 8 0 79 3 3 5 3 7 1 5 226

7. Base +

3 4 4 1 1 1

Clorrantraniliprol 6 7 7 , , , 1 6, 2, 2,

0,25 mg/semillas 3 6 8 69 5 0 0 0 2 4 5 198,6

8. Tratamiento 7 +

4 4 4 1

RTI545 a 1×10^6 7 8 8 , , , 8, 2, 8, 1

cfu/semillas 0 2 3 73 0 0 0 6 4 3 0 213,4

9. Base +

4 4 4 1 1

Clorrantraniliprol 6 8 8 , , , 8, 0, 8, 1,

0,5 mg/semillas 9 2 2 72 0 0 0 6 8 3 3 209,7

10. Tratamiento 9

+					4	4	5												
RTI545 a 1×10^6	8	9	9									6,	7,	3,	3,				
cfu/semillas	0	3	5	83	8	8	0	1	3	2	8								235,6

11. Base +

					4	4	4		1										
Clorantraniliprol	7	8	8									1	1,	7,	8,				
0,25/Bifentrina	2	4	6	76	0	0	0	0	2	3	8								217,3

12. Tratamiento 11

+					5	5	5												
RTI545 a 1×10^6	6	8	9	9									7,	3,	2,				
cfu/semillas	2	4	5	83	0	0	0	5	3	2	5								237,7

13. Base +

					4	4	4												
Clotianidina 1,25	7	9	9										4,	6,	3,				
mg/semillas	6	1	3	81	5	5	8	5	2	1	8								229,2

El impacto de la alimentación del gusano de alambre es el reducir la población de plantas por unidad de área, reducir el vigor y retrasar el crecimiento de las planta por la poda de las raíces, dañar las raíces y reducir los rendimientos. Los gusanos de las semillas también pueden la población de plantas por unidad de área, y alimentarse de semillas, causando atrofia.

La adición de RTI545 a la base fungicida (tratamiento 2 versus tratamiento 3) dio lugar a conteos de emergencia que fueron significativamente mayores a los 42 y 164 días después de la plantación, redujeron el daño causado por la alimentación de

gusano de alambre y aumentaron significativamente el rendimiento con respecto al fungicida base. Aunque la RTI545 proporcionó una protección contra insecticidas, el nivel de protección fue menor que el de los productos sintéticos evaluados, lo que demuestra el beneficio de agregar este producto a un insecticida para asegurar un rendimiento satisfactorio.

La adición de RTI545 a clotianidina (tratamientos 3 y 4 respectivamente) aplicada a 0,25 mg/semillas aumentó significativamente la emergencia en los 4 tiempos de evaluación, aumentó significativamente el vigor en los 3 tiempos de evaluación, redujo el daño de alimentación causado por larva de las semillas y por el gusano de alambre y proporcionó un rendimiento significativamente superior. La adición de RTI545 a la baja tasa de clotianidina dio como resultado un rendimiento similar a la alta tasa de clotianidina aplicada a razón de 1,25 mg/semillas.

La adición de RTI545 a bifentrina (01,25 mg/semillas para los tratamientos 5 y 6 respectivamente) aumentó significativamente la emergencia en 1 momento de evaluación, aumentó significativamente el vigor en un momento de evaluación, redujo significativamente el daño alimentario causado por la larva de las semillas en el último momento de evaluación y aumentó significativamente el rendimiento.

La adición de RTI545 al clorantraniliprol (0,25 mg/semillas para los tratamientos 7 y 8 respectivamente) aumentó significativamente la emergencia en 3 momentos de evaluación y aumentó significativamente el rendimiento.

La adición de RTI545 a clorantraniliprol (0,5 mg/semillas para los tratamientos 9 y 10 respectivamente) incrementó significativamente la emergencia en los 4 tiempos de evaluación, aumentó significativamente el vigor en los 3 tiempos de evaluación, redujo significativamente el daño alimentario causado por el gusano de las semillas,

redujo numéricamente el daño causado por el gusano de alambre y aumentó significativamente el rendimiento. La adición de RTI545 a clorantraniliprol (0,5 mg/semillas) dio como resultado que este producto se comportara de forma similar al elevado coeficiente de clotianidina (1,25 mg/semillas).

La adición de RTI545 a una combinación de clorantraniliprol y bifentrina (tratamientos 9 y 10, respectivamente) aumentó significativamente la emergencia en los 4 tiempos de evaluación, aumentó significativamente el vigor en los 3 tiempos de evaluación, redujo significativamente el daño alimentario causado por la larva de las semillas y por el gusano de alambre y aumentó significativamente el rendimiento. La adición de RTI545 a esta combinación dio como resultado que este producto funcionara de manera similar o mejorada al elevado coeficiente de clotianidina (1,25 mg/semillas), siendo el rendimiento final de este tratamiento superior en 8 bu/acre al elevado coeficiente de clotianidina.

Estos resultados demuestran que la protección insecticida proporcionada por la RTI545 mejora la protección proporcionada por tres clases únicas de IRAC de insecticidas sintéticos. Estos resultados demuestran que la RTI545 proporciona protección por sí misma; sin embargo, la combinación con un insecticida eficaz ayuda a asegurar un nivel mucho más elevado de beneficios que son evidentes.

Ejemplo 14

Aplicación en surco de RTI545 de *Bacillus thuringiensis* en ensayos en campo de maíz

Se estudiaron tratamientos en surco de maíz con RTI545 en múltiples ensayos de campo en varios lugares de América del Norte para evaluar la eficacia contra el gusano de alambre (*Melanotus spp.*) y contra el gusano de las raíces del maíz

(*Diabrotica* spp.). Los efectos sobre el rendimiento y el daño a los cultivos de varios tratamientos en comparación con los controles no tratados para los ensayos individuales de América del Norte se agregaron y se resumieron como un promedio para el ensayo en las siguientes tablas como % de aumento de rendimiento y % de reducción en el daño en comparación con los controles no tratados. Se evaluaron siete ensayos para el gusano de alambre. Se evaluaron dieciocho ensayos para el gusano de las raíces del maíz. Cinco ensayos con daño importante causados por el gusano de las raíces del maíz se promediaron por separado.

Tabla XIX. Efecto sobre el rendimiento de tratamientos con RTI545 sobre parcelas de campo infestadas con gusano de alambre

Tratamiento	Coeficiente	% de incremento del rendimiento
Bifentrina	56 g ai/Ha	5
RTI545	3×10^{11} CFU/Ha	1
	3×10^{12} CFU/Ha	2
	56 g ai/Ha + 3×10^{11} CFU/Ha	6
Bifentrina + RTI545	56 g ai/Ha + 3×10^{12} CFU/Ha	7
Teflutrina	168 g ai/Ha	5

Tabla XX. Efecto sobre el rendimiento y sobre el daño infligido por el gusano de las raíces de los tratamientos con RTI545 en parcelas de campo infestadas con el gusano de las raíces del maíz

		Elevada presente por el CWR			
	Coeficiente	% de incremento del rendimiento	% de reducción del daño	% de incremento del rendimiento	% de reducción del daño
Bifentrina	112 g ai/Ha	4	42	11	45
RTI545	1,24x10 ¹² CFU/Ha	3	28	11	35
	6,18x10 ¹² CFU/Ha	4	37	11	44
	112 g ai/Ha + 1,24x10 ¹² CFU/Ha	4	49	9	51
	+ RTI545 112 g ai/Ha + 6,18x10 ¹² CFU/Ha	6	55	22	62
Teflutrina	168 g ai/Ha	3	46	16	52

Los datos de rendimiento de 7 ensayos de gusano de alambre indican que los tratamientos que contienen RTI545 muestran una ligera ventaja sobre la bifentrina sola y la teflutrina comercial estándar en su coeficiente más elevado. Los datos de 18 ensayos para el gusano de las raíces del maíz indican rendimientos de tratamientos

que contienen RTI545 muestran rendimientos iguales o ligeramente superiores a los de la bifentrina sola, y teflutrina en su coeficiente más elevado. Los datos de estos 18 ensayos también indican que el maíz tratado con RTI545 en combinación con un insecticida dio como resultado menos daño en las raíces del maíz en el suelo infestado de gusano de las raíces del maíz que el estándar industrial de teflutrina en su coeficiente máxima o bifentrina en su coeficiente más elevado o cuando se aplicó RTI545 solo como un tratamiento. Cuando hubo una fuerte presión del gusano de las raíces del maíz, la reducción en los índices de daño fue similar a la de los tratamientos bajo la presión típica del gusano de las raíces, pero el aumento del porcentaje de rendimiento fue mejor. En general, los datos de estos ensayos indican que el RTI545 combinado con bifentrina puede mejorar el rendimiento del maíz y disminuir el daño causado por los insectos a las raíces del maíz en comparación con las áreas no tratadas o áreas tratadas con la teflutrina estándar en la industria.

También se realizaron ensayos de campo con tratamientos en surco de maíz con RTI545 en Europa para evaluar la eficacia contra el gusano de alambre (*Agriotes* spp.)—Datos no mostrados.

Ejemplo 15

Impacto de RTI545 de *Bacillus thuringiensis* sobre el crecimiento y rendimiento del maní con *Rhizoctonia*

Se llevó a cabo un ensayo de campo en Georgia para probar la eficacia de la combinación biológica de la invención como un tratamiento para semillas de maní inoculado con *Rhizoctonia solani*.

Unas semillas de maní se trataron con una formulación de polvo seco con un coeficiente de aplicación final de 200 g/100 kg de semillas que contenían RTI545,

dando lugar a una aplicación de RTI545 a $3,0 \times 10^6$ CFU/g de semillas y simultáneamente se aplicó con DYNASTY PD, un producto de maní registrado en los Estados Unidos que contenía fludioxonilo (2%), mefenoxam (0,4%) y azoxistrobina (3,2%) con una aplicación de 195 g/100 kg de semillas. Las semillas se colocaron en un frasco y se agitaron hasta que el producto se revistió uniformemente sobre las semillas.

El ensayo incluyó pruebas de bloques completas aleatorizados utilizando parcelas de 6 pies por 30 pies (aproximadamente 1,8 metros por 9,1 metros). Se sembraron semillas de maní tratados y no tratados (*Arachis hypogaea*, var. GA 06). Utilizando un dispositivo plantador cónico, se plantaron semillas a 1,25 pulgadas de profundidad (3 cm) con un espaciamiento de filas de 36 pulgadas (0,9 m) en suelo limoso arenoso. Las parcelas se inocularon con *Rhizoctonia* sp. para asegurar la infestación. Las parcelas y las plantas de maní fueron tratadas bajo condiciones agronómicas generalmente aceptadas para el maní incluyendo la labranza convencional y el riego de acuerdo con necesidad hasta que estaban listos para la cosecha. Las plantas fueron evaluadas durante el período de crecimiento para establecer su emergencia, el vigor (en una escala cualitativa 1–5), y luego se cosecharon para evaluar el rendimiento. Los resultados se resumen en la Tabla XXI.

Tabla XXI. Resultados del ensayo en campo de semillas de maní tratadas con RTI545

vs *Rhizoctonia*

evaluación	Momento DAP	Semillas tratadas	no Producto químico de base	Producto químico de base + RTI545
Recuentos de planta	8	3	10	12
	11	11	27	39
	16	15	41	45
Vigor (1–5)	8	1,8	3,0	3,3
	11	2,3	2,8	4,0
	16	1,8	2,5	3,5
Rendimiento				
lb/Acre	135	1277	3231	3733
Kg/Hectárea		1434	3628	4191

Todos los tratamientos de semillas tuvieron una población más elevada que el control no tratado (UTC, sin tratar control) en los 3 momentos de evaluación. En la totalidad de los tres tiempos de evaluación, el tratamiento que incluya RTI545 proporcionó la mejor emergencia. Las semillas no tratadas tuvieron el menor vigor en los 3 momentos de evaluación. El tratamiento que incluya RTI545 proporcionó un vigor más fuerte que el UTC y que el tratamiento químico base. Todos los productos proporcionaron un rendimiento significativamente más elevado que el UTC. El tratamiento que incluya RTI545 superó el tratamiento químico base.

Ejemplo 16

Impacto del tratamiento de semillas con RTI545 de *Bacillus thuringiensis* sobre el nematodo de lesiones

Se llevaron a cabo ensayos de suelo en el maíz obtenido con semillas tratadas para evaluar la actividad contra el nematodo de lesiones (*Pratylenchus penetrans*) en un invernadero. Unas semillas de maíz (Viking) fueron tratadas con un tratamiento base se semillas de fludioxonilo (1,1 ml/SU) y metalaxil-M (1,1 ml/SU) (todas semillas). Algunas semillas también se trataron con PONCHO/VOTIVO (clotianidina + *B. firmus* I-1582 a 80 ml/SU), RTI545 a 5×10^5 CFU/semillas, RTI545 a 1×10^6 CFU/semillas o una mezcla de RTI545 (5×10^5 CFU/semillas) + *Bacillus subtilis* cepa CH201 ($2,5 \times 10^6$ CFU/semillas) + *Bacillus licheniformis* cepa CH200 ($2,5 \times 10^6$ CFU/semillas) o RTI545 (5×10^5 CFU/semillas) + *Bacillus velezensis* cepa RTI301 (5×10^5 CFU/semillas) + cepa CH200 de *Bacillus licheniformis* ($2,5 \times 10^6$ CFU/semillas).

En un tipo de ensayo, las semillas tratadas se plantaron en recipientes en forma de cono en 90 ml de suelo (80,4% de arena, 14,8% de limo, 4,8% de arcilla, materia orgánica 1,1%, pH 6,9). Después de la plantación, el suelo fue inoculado el mismo día con 4000 nematodos (etapas mixtas: J2-adultos) por semillas en 200 μ l de vehículo (metilcelulosa al 2%). Un control utilizó semillas con el tratamiento base de semillas en suelo no inoculado. Las plantaciones de ensayos fueron regadas desde arriba usando un rociador de niebla. El ensayo se evaluó a los 2 (datos no mostrados) y 7 días después de la emergencia para la longitud total de las raíces utilizando el software WinRhizo™. Los datos de longitud de raíz y los datos de reducción de nematodos en porcentaje se transformaron usando la transformación de

raíz cuadrada de arcoseno antes del análisis de ANOVA usando un ensayo de ANOVA Fisher en $\alpha = 0,1$

Tabla XXII. El efecto del tratamiento de las semillas con RTI545 en el maíz sobre la longitud total de las raíces de plántulas cultivadas bajo presión de nematodos de lesión.

Tratamiento	% de incremento de longitud de raíz vs. control inoculado
Tratamiento de base de semillas, inoculadas	0
Tratamiento de base de semillas, no inoculadas	18
Tratamiento de base de semillas + PONCHO/VOTIVO	19
Tratamiento de base de semillas+ RTI545 (5×10^5 CFU/semillas)	30
Tratamiento de base de semillas + RTI545 (1×10^6 CFU/semillas)	34

La inoculación de plántulas de maíz con nematodos de lesión redujo numéricamente la longitud total de la raíz. La longitud total de raíz de las plántulas tratadas con PONCHO/VOTIVO (estándar comercial) fue mayor que la de las plántulas inoculadas no tratadas y similares a la de las plántulas no inoculadas no tratadas. La longitud total de la raíces de las plántulas tratadas con RTI545 aumentó

significativamente en comparación con la longitud total de las raíces de las plántulas inoculadas no tratadas (30–34%) y fue estadísticamente similar pero numéricamente mayor que la longitud total de las raíces de las plántulas tratadas con PONCHO/VOTIVO.

Se llevaron a cabo ensayos similares utilizando 2000 nematodos/semillas para inoculación en 130 ml de suelo y se midieron el número de nematodos por raíz y el peso máximo fresco de las plantas a las 8 semanas después de la inoculación de nematodos. Los resultados se presentan en la Tabla XXIII. La infestación por nematodos de lesiones resultó en una reducción severa del peso máximo fresco (FTW, fresh top weight) de las plantas de maíz. El FTW de plantas de control inoculadas se redujo en un 50% en comparación con plantas no inoculadas. El elevado coeficiente de RTI545 proporcionó mayor FTW estadísticamente comparado con los estándares PONCHO/VOTIVO y con el control de nematodos inoculado. Estos resultados indican que el tratamiento de las semillas con RTI545 aumenta la tolerancia de las plantas a la infestación de nematodos al sostener el crecimiento de las plantas en presencia de plagas de nematodos. Además, se observaron efectos positivos similares en el crecimiento de la planta/FTW cuando se usó RTI545 con el coeficiente más bajo en combinación con otras cepas: RTI545 (1×10^5 CFU/semillas) + cepa CH201 de *Bacillus subtilis* ($2,5 \times 10^6$ CFU/semillas) + *Bacillus licheniformis* cepa CH200 ($2,5 \times 10^6$ CFU/semillas), o RTI545 (1×10^5 CFU/semillas) + RTI301 (5×10^5 CFU/semillas) + cepa CH200 de *Bacillus licheniformis* ($2,5 \times 10^6$ CFU/semillas). Por otra parte, el tratamiento de las semillas con RTI545 con un elevado coeficiente ($1,0 \times 10^6$ CFU/semillas, proporcionó un muy buen control de los nematodos de lesión (una reducción del 50% de los números de nematodos en las raíces). El PONCHO/VOTIVO no redujo el número de nematodos en las raíces.

Tabla XXIII. El efecto del tratamiento de semillas con RTI545 en el maíz sobre el peso superior fresco y los recuentos de nematodos en las raíces después de la inoculación con nematodo de lesión.

Tratamiento	% de reducción de la penetración	Peso superior fresco (g)
Tratamiento base de semillas, inoculado	—	6,5
Tratamiento base de semillas , no inoculado	0	12,8
Tratamiento base de semillas + PONCHO/VOTIVO	No control	8,5
Tratamiento base de semillas + RTI545 (5×10^5 CFU/semillas)	8	11,6
Tratamiento base de semillas + RTI545 (1×10^6 CFU/semillas)	49	13,3
Tratamiento base de semillas + RTI545 (5×10^5 CFU/semillas) + CH200($2,5 \times 10^6$ CFU/semillas) + CH201 ($2,5 \times 10^6$ CFU/semillas)	12	13,2
Tratamiento base de semillas + RTI545 (5×10^5 CFU/semillas) + RTI301 (5×10^5 CFU/semillas) + CH200 ($2,5 \times 10^6$ CFU/semillas)	6	12,1

Ensayos similares en los que se aplicó RTI545 como un drenaje de suelo a un coeficiente de $2,5 \times 10^{11}$ CFU/ha proporcionaron una reducción del 71% en el número de nematodos de lesión por raíz comparado con un 95% para la abamectina. En

ensayos de drenaje de suelos aplicados a macetas en el invernadero con suelo infestado con huevos de nematodos de lesión y adultos (2000 individuos/maceta), la RTI545 con un coeficiente de $2,5 \times 10^{13}$ CFU/ha proporcionó una reducción del 80% en el número de nematodos por raíz comparado con una reducción del 86% por cadusafos.

Ejemplo 17

Impacto de RTI545 de *Bacillus thuringiensis* sobre el nematodo de quistes en la soja en ensayos de drenaje de suelos

La actividad de RTI545 contra el nematodo de los quistes de la soja (*Heterodera glycines*) se investigó en ensayos de drenaje de suelos en un invernadero. Unas semillas de soja individuales (cv. AG4730) fueron sembradas en 120 ml de suelo (80,4% de arena, 14,8% de lodo, 4,8% de arcilla, materia orgánica 1,1, pH 6,9) en recipientes en forma de cono y se regó con regado individual en el fondo. Los envases fueron inoculados con huevos de nematodos a razón de 4000 huevos en 1 mL de metilcelulosa al 2% por envase 21 días después de la plantación. El drenaje de suelo (en 10 ml de volumen por 100 ml de suelo) de RTI545 y de AGRI-MEK 0,15 EC (ai abamectina al 2%) y de VENERATE XC (células A386 de cepa *Burkholderia* al 94,46% muertas por calor y medio de fermentación agotados) fueron aplicados a los 7 y 21 días después de la plantación. Los coeficientes ensayados fueron esporas lavadas con RTI545 a $2,5 \times 10^{12}$ CFU/ha, $2,5 \times 10^{13}$ CFU/ha y $2,5 \times 10^{14}$ CFU/ha; abamectina a 1 ppm (0,01 mg a.i./plante) y 10 ppm (0,1 mg a.i./planta) correspondiente al coeficiente de etiquetas del tratamiento de semillas, y VENERATE XC al 5% v/v (500 mg/planta), lo que corresponde a 4,5 x el coeficiente en surco. Los ensayos se evaluaron al día 70 (7 semanas después de la inoculación). Las

evaluaciones se realizaron mediante la extracción de quistes de raíces y suelos y el recuento del número total de quistes bajo un estereomicroscopio.

Tabla XXIV. Número de quistes de nematodo de quistes de soja extraídos de raíces y suelo.

Tratamiento	Número de quistes extraídos	% de reducción de quistes
Sin tratar, non-inoculado	0	—
Sin tratar, inoculado	147	na
RTI545 ($2,5 \times 10^{12}$ CFU/ha)	50	66
RTI545 ($2,5 \times 10^{13}$ CFU/ha)	93	37
RTI545 ($2,5 \times 10^{14}$ CFU/ha)	66	55
Abamectina (0,01 ppm)	31	79
Abamectina (0,1 ppm)	7	96
VENERATE XC (500 mg/planta)	43	71

Los datos muestran que la RTI545 redujo el número de quistes de nematodos hasta el 66%. No hubo una respuesta de dosis clara entre los coeficientes ensayados y la actividad. La actividad de la RTI545 no fue estadísticamente diferente del estándar biológico VENERATE XC. La abamectina estándar química tenía la actividad más elevada. El coeficiente de 0,01 mg/planta proporcionó un 79% de reducción y 0,1 mg/planta proporcionó un 96% de reducción.

Ejemplo 18**Formulaciones concentradas que comprenden RTI545 de *Bacillus thuringiensis***

Los concentrados de suspensión representativos que comprenden RTI545 de *Bacillus thuringiensis* se resumen en la Tabla XXV. Se prepararon mezclando esporas de RTI545 con los otros componentes en un recipiente de mezcla o homogeneizador adecuado.

Tabla XXV. Formulaciones concentradas de suspensiones

		Ejemplo	
		18A	18B
Componente	Función	% (peso/peso)	
RTI545 3x10 ¹¹ cfu/g	Ingrediente activo	5,25	9,59
Sulfato de amonio	Anticongelante	9,5	
Glicerol (86,5%)	Anticongelante		48
Atapulgita (suspensión acuosa al 20–35 %)	Espesante	9,0	
Alquil poliglicósidos, mezcla	Dispersante	8,0	
Tensioactivos de este de fosfato aniónico, mezcla	Dispersante	7,0	
Dispersión de copolímero de etileno acetato de vinilo	Dispersante		0,89
Emulsión de silicona	Antiespumante	0,3	

Sorbato de potasio	Agente de conservación	0,1	0,2
Agua	Diluyente	59,54	38,82

Ejemplo 19

Formulaciones concentradas de suspensiones que comprenden RTI545 de *Bacillus thuringiensis* y Bifentrina

Los concentrados de suspensión representativos que comprenden RTI545 de *Bacillus thuringiensis* y el insecticida bifentrina se resumen en las Tablas XXVI y XXVII. Se prepararon mezclando esporas de RTI545 con los otros componentes en un recipiente de mezcla o homogeneizador adecuado. Ejemplo 19C es una composición espumable que se puede aplicar como una espuma a semillas o en surco en el momento de la plantación. La composición espumable 19C puede diluirse opcionalmente con agua y mezclarse con un gas presurizado tal como aire en una cámara de formación de espuma que comprende un medio espumante tal como una pluralidad de perlas de vidrio para preparar una espuma.

Tabla XXVI. Formulaciones de SC de RTI545 y bifentrina

Componente	Función	Ejemplo		
		19A	19B	19C
		% (peso/peso)		

	Ingrediente activo (99%)	15,81		
Bifentrina técnica	Ingrediente activo (98,2 %)		15,92	15,96
RTI545 3x10 ¹¹ cfu/g	Ingrediente activo	3,62	5,25	5,0
Sulfato de amonio	Anticongelante	10,75	9,5	
Glicerina	Anticongelante	12,7		
	Espesante	2,15		
Atapulgita	Espesante, suspensión acuosa al 20–35 %		9,0	
Goma xantano	Espesante, suspensión al 2 %			12
Alquil poliglicósidos, mezcla	Agente de dispersión	6,00	8,0	1,25
Tensioactivos de éster de fosfato aniónico, mezcla	Agente de dispersión	1,57	7,0	1,25
Dodecilsulfato de sodio, 35–40 % en agua	Agente espumante			20
Emulsión de silicona	Antiespumante	0,1	0,3	
	Agente de conservación, solución alcalina al 20%	0,15		
1,2-benzisotiazolin-3-ona	Agente de conservación, solución acuosa al 20%			0,1

Kathon® CG–ICP	Agente de conservación	0,1		
o–fenilfenato de sal sódica	Agente de conservación	0,1		
Sorbato de potasio	Agente de conservación	0,1		
Benzoato de sodio	Agente de conservación	0,1		
Ácido acético	Diluyente	0	1,21	0
Agua	Diluyente	59,85	43,62	31,54

Tabla XXVII.

Componente	Función	Ejemplo	
		19D	19E
		%	
		(peso/peso)	
Bifentrina técnica	Ingrediente activo (99%)	17,4	16,6
RTI545 3x10 ¹¹ cfu/g	Ingrediente activo	5,0	10
Sulfato de amonio	Anticongelante	11,2	10,6
Alquil poliglicósidos, mezcla	Agente de dispersión	12,9	12,3
Tensioactivo de éster de fosfato aniónico, mezcla	Agente de dispersión	1,3	1,2
emulsión de silicona	Antiespumante	0,3	0,3
Sorbato de potasio	Agente de conservación	0,1	0,1

Componente	Función	Ejemplo	
		19D	19E
		%	
		(peso/peso)	
Benzoato de sodio	Agente de conservación	0,1	0,1
Ácido cítrico	Diluyente	0,8	0,7
H ₃ PO ₄	Diluyente	0,4	0,5
Agua	Diluyente	50,4	47,5

La estabilidad de la espora durante el almacenamiento a temperaturas elevadas fue muy buena, como se muestra a continuación en la Tabla XXVIII, en la que la formulación 18D se almacenó a 54 °C durante dos semanas, observándose pocos cambios en la concentración de RTI545 Ssores.

Tabla XXVIII. Estabilidad de las esporas durante su almacenamiento

Estabilidad de las esporas

Inicial 2 Semanas de
almacenamiento a
54 °C

1,36 x 10 ¹⁰ cfu	1,30 x 10 ¹⁰ cfu
-----------------------------	-----------------------------

Todas las publicaciones, solicitudes de patentes, patentes y otras referencias mencionadas en la memoria descriptiva son indicativas del nivel de los expertos en la técnica al que pertenece la materia objeto de la presente descripción. Todas las publicaciones, solicitudes de patentes, patentes y otras referencias se incorporan en la presente por referencia en la misma medida que si cada publicación individual, solicitud de patente, patente y otra referencia estuviera específicamente e individualmente indicada para incorporarse como referencia. Se entenderá que, aunque se hace referencia a un número de solicitudes de patente, patentes y otras referencias, dicha referencia no constituye una admisión de que alguno de estos documentos forme parte del conocimiento general común en la técnica.

Si bien el tema precedente ha sido descrito con algún detalle a modo de ilustración y ejemplo con fines de claridad de entendimiento, los expertos en la técnica entenderán que es posible implementar determinados cambios y modificaciones sin salir de los alcances de las reivindicaciones adjuntas.