

Señor

Director de la Dirección de Nuevas Creaciones

Superintendencia de Industria y Comercio

Ministerio de Comercio, Industria y Turismo

E. S. D.

Re.: Expediente **No. NC2017/0003003**

Solicitud de Patente PCT entrada en Fase Nacional, para:

“MÉTODO PARA PRODUCIR BLASTOPORAS TOLERANTES A LA DESECACION Y COMPOSICION INSECTICIDA QUE LAS COMPRENDE”

Solicitantes: **EMBRAPA Y THE UNITED STATES OF AMERICA AS REPRESENTED BY THE SECRETARY OF AGRICULTURE**

RESPUESTA A EXAMEN DE FONDO

Yo, **MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO**, mayor de edad, identificada y domiciliada como aparece al pie de mi firma, obrando en mi calidad de apoderada de la sociedad solicitante del asunto citado en la referencia, en atención a su oficio **No. 15000** notificado en diciembre 11 de 2018 y para el cual se solicitó prórroga, me permito dar respuesta al mismo de la siguiente manera:

1. Modificación a las Reivindicaciones

De acuerdo con lo establecido en el Artículo 34 de la Decisión 486 y en vista de las observaciones realizadas por el examinador, se presenta en esta oportunidad un nuevo pliego reivindicatorio conformado por 6 reivindicaciones y se aclara lo siguiente:

- En cuanto a la supuesta falta de sustento de los listados de compuestos específicos proporcionados en las presentes reivindicaciones, la Guía Para Examen de Solicitudes de Patente de Invención y Modelo de Utilidad, en su página 91, primer párrafo, señala lo siguiente con respecto a los ejemplos de trabajo que deben incluirse en la memoria descriptiva:

“En referencia a la mejor manera de realizar la invención se considerará que los ejemplos son casos particulares que sirven para ilustrar la mejor manera conocida por el solicitante para ejecutar o llevar a la práctica la invención. Dado que la solicitud está dirigida a la persona del oficio normalmente versada en el ámbito tecnológico, no es necesario, ni deseable, incluir características, ni detalles que sean bien conocidos, sino que deberá divulgar las características esenciales para poner en práctica la invención, sin que ello requiera de un esfuerzo inventivo que sea superior a las habilidades ordinarias de dicha persona. Este requisito se entenderá superado con la

**CALLE 94A No.7 A – 09 / P.O. BOX 6349
TELÉFONO (571) 756 0770 FAX (571) 755 0158
BOGOTÁ D.C. COLOMBIA
castellanos@castellanosyco.co / www.castellanosyco.co**

divulgación de una razonable generalización de los ejemplos más representativos de la invención”.

Una persona con conocimientos en la materia podría reproducir la invención reivindicada en vista de la presente divulgación y del conocimiento general en el arte. Además, una persona normalmente versada en la materia entendería que los vehículos agronómicamente aceptables enumerados, los compuestos depuradores de oxígeno y los compuestos depuradores de la humedad que figuran en las presentes reivindicaciones se consideran una generalización razonable de los ejemplos de trabajo.

Por último, se hace notar al Examinador que de acuerdo con la Guía no hay necesidad de proporcionar un ejemplo de trabajo por cada ejemplo de realización reivindicado ya que se considera cumplido el requisito con la divulgación de una razonable generalización de los ejemplos más representativos de la invención.

- Las reivindicaciones modificadas no incluyen marcas y en consecuencia, la objeción formulada a este respecto se debe tener por superada.
- Con respecto a la objeción del Examinador debido a la presencia de un compuesto de depuración de oxígeno y un compuesto de depuración de la humedad en la composición insecticida de la reivindicación 6 que, en su opinión, solo estarían presentes para el almacenamiento de las blastosporas, el Solicitante señala que una persona experta en la materia entendería que el compuesto de depuración de oxígeno y el compuesto de depuración de humedad pueden estar presentes en la composición insecticida y, de hecho, hacen que la composición sea adecuada para el almacenamiento.

2. Novedad y Nivel Inventivo

El examinador concluye que los requisitos de patentabilidad de la presente solicitud se encuentran afectados de la siguiente manera:

Ítem	Documento	Reivindicaciones afectadas	Requisito que afecta
D2	Art. 3	4	Nivel inventivo
D3	Art. 7	1 – 3, 5 – 6	Novedad
D3	Art. 7	4	Nivel inventivo

A este respecto, se adjunta al presente memorial como Anexo I una declaración del inventor Dr. Mark A. Jackson para referencia del Examinador. Además, adjuntamos la traducción al español de dicha declaración (Anexo II). Teniendo en cuenta dicha declaración, se pone de presente lo siguiente:

En primer lugar, se hace notar que el D3 de esta acción oficial está identificado como "D4" en la solicitud europea equivalente, y que el Dr. Jackson halló diferencias entre la presente solicitud y el D3 en cuanto al método para producir blastosporas tolerantes a la

dsecación como se definen en la presente solicitud y también varias discrepancias técnicas.

Asimismo, el D3 al menos no revela o sugiere la característica actualmente requerida de "b) *incubar dichos propágulos en un cultivo con niveles de oxígeno disuelto del 21 al 100%*" de la presente reivindicación 1, contrario a la opinión del Examinador.

En la presente solicitud, las mediciones de O₂ disuelto en tiempo real mostraron que la tasa de la incubadora con agitador rotatorio de 350 rpm para un volumen de cultivo de 100 ml no proporcionó niveles adecuados de oxígeno disuelto, lo que resultó en un nivel bajo de O₂ disuelto cercano a cero (Ver la solicitud de patente, Fig. 10). Todos los cultivos de *B. bassiana* GHA del D3 se cultivaron con 100 ml a 300 rpm, lo cual proporcionaría un O₂ disuelto aún menor. Por ende, los cultivos del D3 estaban limitados por el O₂ y un experto en la materia no habría obtenido la materia reivindicada en la presente solicitud siguiendo las enseñanzas del D3.

Con respecto al D2, se hace notar al Examinador que las diferencias entre las reivindicaciones pendientes y el D2 tal como se muestran en la Tabla precedente demuestran que las presentes reivindicaciones son novedosas e inventivas frente al D2.

3. Conclusión

Teniendo en cuenta las modificaciones introducidas en esta oportunidad y los argumentos que se presentan, es posible establecer que las reivindicaciones cumplen con los requerimientos de la Decisión 486.

4. Anexos

- Anexo I una declaración del inventor Dr. Mark A. Jackson para referencia del Examinador
- Anexo II traducción al español de la declaración del inventor Dr. Mark A. Jackson para referencia del Examinador

Señor Director,



Margarita Castellanos Abondano

C.C. No. **39.779.654** de Bogotá

T.P.A. No. **70.819** del C.S.J.

Calle 94A No. 7A-09 - Bogotá, D.C.

Teléfono: 7560770

Bogotá, D.C.

MCA/mg

P4600

INVENTOR'S DECLARATION

Dear Examiner:

The undersigned declares that:

1. I, Dr. Mark A. Jackson, a citizen of the United States, hereby declare:
2. That I am an inventor on the captioned application.
3. That in reviewing the reference D4 (CHONG-RODRIGUEZ ET AL: "Study of *Beauveria bassiana* growth, blastospore yield, desiccation-tolerance, viability and toxic activity using different liquid media", AFRICAN JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY, vol. 10, no. 27, 1 January 2011 (2011-01-01), pages 5736 - 5742, XP055419373, DOI: 10.5897/AJB10.2264) cited in the outstanding Office Communication, I have found the following issues with the data presented therein rendering it manifestly erroneous and does not represent the technical reality.

D4 reported alleged blastospore production, desiccation tolerance, and storage stability by *Beauveria bassiana* GHA only. The present application evaluated various *B. bassiana* strains, including *B. bassiana* GHA. Blastospore production and desiccation tolerance is shown to be *B. bassiana* strain and media composition dependent (present application – Figure 1). As such, the general applicability of the results of D4 to applications of other strains would be not appropriate.

Comparison of blastospore production, desiccation tolerance, and biocontrol efficacy

Culture Conditions

Present Application [0073] -12% glucose, 3% nitrogen source
 -50 mL in 250mL baffled flask
 -350 rpm @ 28 °C

D4 (Page 5737) -Medium M1; 8% glucose, 2.5% acid hydrolyzed casein
 -Medium T2; 5% sucrose, 2% corn steep liquor
 -Medium T3; 5% glucose, 5% peptone
All Media -100 mL in 250mL baffled flask
 -300 rpm @ 26 °C

Discrepancies between present application and D4

In the present application, corn steep liquor was shown to be a poor nitrogen source for the production and desiccation tolerance of blastospores of *B. bassiana* GHA (see the present application, Figs. 1C and 1D). In contrast, corn steep liquor was found to be the best nitrogen source in D4.

In the present application, glucose concentrations > 10% were required to produce high concentrations of the blastospore compositions of *B. bassiana* GHA (see the present application, Fig. 9). This is not commensurate with the glucose concentrations and resulting blastospore yields of D4.

In the present application, real-time O₂ measurements showed that shaker incubator rates of 350 rpm for a 100 mL culture volume did not provide adequate dissolved oxygen levels, resulting in a flat line of dissolved O₂ near zero (see the patent application, Fig. 10). All **D4** *B. bassiana* GHA cultures were grown with 100mL at 300 rpm which would provide even less available dissolved O₂. The D4 cultures were O₂ limited.

Desiccation Tolerance

Methods:

Present application – dried blastospore powders were resuspended in 50 mL potato dextrose broth and incubated at 28 °C and 300 rpm on a rotary shaker incubator. Viable or germinated spores were assessed after 7 hours incubation (present application, paragraph [0073])

D4 - dried blastospore powders were resuspended in 50 mL potato dextrose broth and incubated at 26 °C and 300 rpm on a rotary shaker incubator. Viable or germinated spores were assessed after 2, 4, 6, 8, 10, 12 and 14 hours incubation (D4; pg. 5737). D4 germination values were reported after 10 hours incubation

Discrepancies between present application and D4

If germination rates are compared for air-dried blastospores from both studies at 7 hours incubation, the D4 blastospore compositions are all < 50% (D4, Fig. 2, pg. 5739) while germination rates for the present application's blastospore composition are > 70% (present application; Table 4, paragraph [0097]). According to the criteria of the present application, the D4 blastospores are NOT desiccation tolerant.

All **D4** germination rates for stored blastospores are reported after 10 hours incubation.

Storage Stability

D4 shows poor blastospore survival at 4 °C or 26 °C after storage for 6 months.

-Variation in storage data is problematic (don't see how comparisons can be sign different.

-Since germination rate was measured at 10 hours, viability is overstated compared to our results.

Insect Bioefficacy

The blastospore compositions of D4 show less bioefficacy (slower rate of kill) against the insect diamondback moth larvae (*Plutella xylostella*) when compared to the control (aerial conidia; D4; Table 3, Pg. 5741).

Blastospore compositions produced using the **present application** production methods (high aeration/osmotic pressure) were more effective (present application; Table 9, paragraph [0112]) with faster kill (present application; Table 10, paragraph [0113]) when compared to the

same control, aerial conidia, for control of whiteflies (*Bemisia tabaci* biotype B) or when compared to blastospore compositions produced as reported in D4.

8. All statements made herein of my own knowledge are true and that all statements made on information and belief are believed to be true; and further that these statements were made with the knowledge that willful false statements and the like so made are punishable by fine or imprisonment, or both, under Section 1001 of Title 18 of the United States Code, and that such willful false statements may jeopardize the validity of the application or any parent issuing thereon. Further, declarant saith not.

WITNESS my signature below on the indicated date.

March 15, 2019
Date

[Signature]
Signature

MARK JACKSON
Print Name

State of Illinois

County of Peoria

The foregoing document was acknowledged before me on
15th day of March, 20 19 by

Mark Jackson
[Signature]
Illinois Notary Public



DECLARACIÓN DEL INVENTOR

Estimado Examinador,

El abajo firmante declara lo siguiente:

1. Yo, Dr. Mark A. Jackson, ciudadano de los Estados Unidos, por la presente declaro:
2. Que soy uno de los inventores de la solicitud de la referencia.
3. Que al revisar la referencia **D4** (CHONG-RODRIGUEZ ET AL: "Estudio del crecimiento de *Beauveria bassiana*, rendimiento de blastosporas, tolerancia a la desecación, viabilidad y actividad tóxica utilizando diferentes medios líquidos", AFRICAN JOURNAL OF BIOTECHNOLGY, vol. 10, no, 27, 1 de enero de 2011 (2011-01-01), páginas 5736 - 5742, XP055419373, DOI: 10.5897/AJB10.2264), citada en la acción oficial, encontré los siguientes discrepancias con los datos que se presentan en este documento lo cual lo tornan manifiestamente erróneo y no representan la realidad técnica.

El D4 informó la supuesta producción de blastosporas, la tolerancia a la desecación y la estabilidad en almacenamiento solamente para *Beauveria bassiana* GHA. La presente solicitud evaluó varias cepas de *B. bassiana*, incluyendo *B. bassiana* GHA. La producción de blastosporas y la tolerancia a la desecación dependen de la cepa de *B. bassiana* y de la composición del medio (la presente solicitud - Figura 1). Por lo tanto, aplicar de modo general los resultados del D4 a otras cepas no sería apropiado.

Comparación de la producción de blastosporas, tolerancia a la desecación y eficacia del control biológico

Condiciones de cultivo:

- | | |
|--------------------------------|--|
| (La presente solicitud [0073]) | - 12% de glucosa, 3% de fuente de nitrógeno. |
| | - 50 ml en frascos Erlenmeyer reflectados de 250 ml |
| | - 350 rpm a 28°C. |
| D4 (Página 5737) | - Medio M1; 8% de glucosa, 2,5% de caseína hidrolizada por ácido |
| | - Medio T2; 5% de sacarosa y 2% de licor de maíz macerado |
| | - Medio T3; 5% de glucosa, 5% de peptona |
| | - Todos los medios: 100 ml en frascos Erlenmeyer reflectados de 250 ml |
| | - 300 rpm a 26°C. |

Discrepancias entre la presente solicitud y el D4

En la presente solicitud, el licor de maíz macerado demostró ser una escasa fuente de nitrógeno para la producción y la tolerancia a la desecación de las blastosporas de *B. bassiana* GHA (ver la presente solicitud, Figs. 1C y 1D). Por el contrario, el licor de maíz macerado fue la mejor fuente de nitrógeno en el D4.

En la presente solicitud, se requería que las concentraciones de glucosa > 10% produjeran concentraciones elevadas de composiciones de blastosporas de *B. bassiana* GHA (ver la Fig. 9 de la presente solicitud. Esto no resulta proporcional con las concentraciones de glucosa y el rendimiento resultante de las blastosporas del D4.

En la presente solicitud, las mediciones de O₂ en tiempo real mostraron que las tasas de la incubadora con agitador rotatorio a 350 rpm para 100 ml de volumen de cultivo no proporcionaron niveles adecuados de oxígeno disuelto, lo cual dio como resultado un nivel bajo de O₂ disuelto cercano a cero (ver la solicitud de patente, Fig. 10). Todos los cultivos de *B. bassiana* GHA del **D4** se cultivaron con 100 ml a 300 rpm, lo cual habría proporcionado aún menos oxígeno disuelto disponible. Todos los cultivos del D4 estaban limitados por el O₂.

Tolerancia a la desecación

Métodos:

La presente solicitud: los polvos de blastosporas secos se rehidrataron en 50 ml de caldo de dextrosa de papa y se incubaron a 28°C y 300 rpm en una incubadora con agitador rotatorio. Las esporas viables o germinadas se evaluaron después de 7 horas de incubación (la presente solicitud, párrafo [0073])

D4: los polvos de blastosporas secos se rehidrataron en 50 ml de caldo de dextrosa de papa y se incubaron a 26°C y 300 rpm en una incubadora con agitador rotatorio. Las esporas viables o germinadas se evaluaron después de 2, 4, 6, 8, 10, 12 y 14 horas de incubación (D4; pág. 5737). Los valores de germinación del D4 se informaron después de 10 horas de incubación.

Discrepancias entre la presente solicitud y el D4

Si se comparan las tasas de germinación de las blastosporas secadas al aire de ambos estudios a las 7 horas de incubación, las blastosporas de las composiciones del D4 son todas <50% (D4, Fig. 2, pág. 5739), mientras que las tasas de germinación de las blastosporas de la composición de la presente solicitud son > 70 % (la presente solicitud; Tabla 4, párrafo [0097]). De acuerdo con los criterios de la presente solicitud, las blastosporas del D4 **NO** son tolerantes a la desecación.

Todas las tasas de germinación de las blastosporas almacenadas se informaron después de 10 horas de incubación.

Estabilidad en almacenamiento

El D4 muestra una escasa supervivencia de blastosporas a 4°C o 26 C después de 6 meses de almacenamiento.

Eficacia biológica insecticida

Las composiciones de blastosporas del D4 muestran menor eficacia biológica insecticida (tasa de mortalidad más lenta) contra las larvas de polilla de dorso de diamante (*Plutella xylostella*) (en comparación con el control (conidios aéreos; D4; Tabla 3, Pg. 5741).

Las composiciones de blastosporas producidas usando los métodos de producción de la presente solicitud (alta aireación/presión osmótica) fueron más efectivas (la presente solicitud; Tabla 9,

párrafo [0112]) con una mortalidad más rápida (la presente solicitud; Tabla 10, párrafo [0113]) en comparación con el mismo control, conidios aéreos y con el control mosca blanca de la hoja plateada (*Bemisia tabaci* biotipo *B*) o cuando se las comparó con las composiciones de blastosporas producidas como se informa en el D4.

8. Todas las declaraciones efectuadas en el presente documento de mi propio conocimiento son ciertas y todas las declaraciones hechas sobre información y creencias, se cree, son ciertas. Asimismo, estas declaraciones se hicieron con el conocimiento de que las declaraciones falsas voluntarias y similares se castigarán con multa o prisión, o ambas, según la Sección 1001 del Título 18 del Código de los Estados Unidos, y que tales declaraciones falsas voluntarias pueden poner en riesgo la validez de la solicitud o de cualquier patente que se conceda al respecto. El declarante no tiene nada más que agregar.

En fe de lo cual, firmo en la fecha indicada a continuación.

15 de marzo de 2019 - [Firmado] Mark Jackson

Estado de Illinois - Condado de Peoria

El documento que antecede fue firmado ante mí a los 15 días del mes de marzo de 2019 por Mark Jackson. - [Firmado] Notario Público de Illinois - [Sello] Sello Oficial – Gabriel A. Jeffries – Notario Público del estado de Illinois – Mi mandato vence el 28 de septiembre de 2020.

INVENTOR'S DECLARATION

Dear Examiner:

The undersigned declares that:

1. I, Dr. Mark A. Jackson, a citizen of the United States, hereby declare:
2. That I am an inventor on the captioned application.
3. That in reviewing the reference D4 (CHONG-RODRIGUEZ ET AL: "Study of *Beauveria bassiana* growth, blastospore yield, desiccation-tolerance, viability and toxic activity using different liquid media", AFRICAN JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY, vol. 10, no. 27, 1 January 2011 (2011-01-01), pages 5736 - 5742, XP055419373, DOI: 10.5897/AJB10.2264) cited in the outstanding Office Communication, I have found the following issues with the data presented therein rendering it manifestly erroneous and does not represent the technical reality.

D4 reported alleged blastospore production, desiccation tolerance, and storage stability by *Beauveria bassiana* GHA only. The present application evaluated various *B. bassiana* strains, including *B. bassiana* GHA. Blastospore production and desiccation tolerance is shown to be *B. bassiana* strain and media composition dependent (present application – Figure 1). As such, the general applicability of the results of D4 to applications of other strains would be not appropriate.

Comparison of blastospore production, desiccation tolerance, and biocontrol efficacy

Culture Conditions

Present Application [0073] -12% glucose, 3% nitrogen source
 -50 mL in 250mL baffled flask
 -350 rpm @ 28 °C

D4 (Page 5737) -Medium M1; 8% glucose, 2.5% acid hydrolyzed casein
 -Medium T2; 5% sucrose, 2% corn steep liquor
 -Medium T3; 5% glucose, 5% peptone
All Media -100 mL in 250mL baffled flask
 -300 rpm @ 26 °C

Discrepancies between present application and D4

In the present application, corn steep liquor was shown to be a poor nitrogen source for the production and desiccation tolerance of blastospores of *B. bassiana* GHA (see the present application, Figs. 1C and 1D). In contrast, corn steep liquor was found to be the best nitrogen source in D4.

In the present application, glucose concentrations > 10% were required to produce high concentrations of the blastospore compositions of *B. bassiana* GHA (see the present application, Fig. 9). This is not commensurate with the glucose concentrations and resulting blastospore yields of D4.

In the present application, real-time O₂ measurements showed that shaker incubator rates of 350 rpm for a 100 mL culture volume did not provide adequate dissolved oxygen levels, resulting in a flat line of dissolved O₂ near zero (see the patent application, Fig. 10). All **D4** *B. bassiana* GHA cultures were grown with 100mL at 300 rpm which would provide even less available dissolved O₂. The D4 cultures were O₂ limited.

Desiccation Tolerance

Methods:

Present application – dried blastospore powders were resuspended in 50 mL potato dextrose broth and incubated at 28 °C and 300 rpm on a rotary shaker incubator. Viable or germinated spores were assessed after 7 hours incubation (present application, paragraph [0073])

D4 - dried blastospore powders were resuspended in 50 mL potato dextrose broth and incubated at 26 °C and 300 rpm on a rotary shaker incubator. Viable or germinated spores were assessed after 2, 4, 6, 8, 10, 12 and 14 hours incubation (D4; pg. 5737). D4 germination values were reported after 10 hours incubation

Discrepancies between present application and D4

If germination rates are compared for air-dried blastospores from both studies at 7 hours incubation, the D4 blastospore compositions are all < 50% (D4, Fig. 2, pg. 5739) while germination rates for the present application's blastospore composition are > 70% (present application; Table 4, paragraph [0097]). According to the criteria of the present application, the D4 blastospores are NOT desiccation tolerant.

All **D4** germination rates for stored blastospores are reported after 10 hours incubation.

Storage Stability

D4 shows poor blastospore survival at 4 °C or 26 °C after storage for 6 months.

-Variation in storage data is problematic (don't see how comparisons can be sign different.

-Since germination rate was measured at 10 hours, viability is overstated compared to our results.

Insect Bioefficacy

The blastospore compositions of D4 show less bioefficacy (slower rate of kill) against the insect diamondback moth larvae (*Plutella xylostella*) when compared to the control (aerial conidia; D4; Table 3, Pg. 5741).

Blastospore compositions produced using the **present application** production methods (high aeration/osmotic pressure) were more effective (present application; Table 9, paragraph [0112]) with faster kill (present application; Table 10, paragraph [0113]) when compared to the

same control, aerial conidia, for control of whiteflies (*Bemisia tabaci* biotype B) or when compared to blastospore compositions produced as reported in D4.

8. All statements made herein of my own knowledge are true and that all statements made on information and belief are believed to be true; and further that these statements were made with the knowledge that willful false statements and the like so made are punishable by fine or imprisonment, or both, under Section 1001 of Title 18 of the United States Code, and that such willful false statements may jeopardize the validity of the application or any parent issuing thereon. Further, declarant saith not.

WITNESS my signature below on the indicated date.

March 15, 2019
Date

[Signature]
Signature

MARK JACKSON
Print Name

State of Illinois

County of Peoria

The foregoing document was acknowledged before me on
15th day of March, 20 19 by

Mark Jackson
[Signature]
Illinois Notary Public



DECLARACIÓN DEL INVENTOR

Estimado Examinador,

El abajo firmante declara lo siguiente:

1. Yo, Dr. Mark A. Jackson, ciudadano de los Estados Unidos, por la presente declaro:
2. Que soy uno de los inventores de la solicitud de la referencia.
3. Que al revisar la referencia **D4** (CHONG-RODRIGUEZ ET AL: "Estudio del crecimiento de *Beauveria bassiana*, rendimiento de blastosporas, tolerancia a la desecación, viabilidad y actividad tóxica utilizando diferentes medios líquidos", AFRICAN JOURNAL OF BIOTECHNOLGY, vol. 10, no, 27, 1 de enero de 2011 (2011-01-01), páginas 5736 - 5742, XP055419373, DOI: 10.5897/AJB10.2264), citada en la acción oficial, encontré los siguientes discrepancias con los datos que se presentan en este documento lo cual lo tornan manifiestamente erróneo y no representan la realidad técnica.

El D4 informó la supuesta producción de blastosporas, la tolerancia a la desecación y la estabilidad en almacenamiento solamente para *Beauveria bassiana* GHA. La presente solicitud evaluó varias cepas de *B. bassiana*, incluyendo *B. bassiana* GHA. La producción de blastosporas y la tolerancia a la desecación dependen de la cepa de *B. bassiana* y de la composición del medio (la presente solicitud - Figura 1). Por lo tanto, aplicar de modo general los resultados del D4 a otras cepas no sería apropiado.

Comparación de la producción de blastosporas, tolerancia a la desecación y eficacia del control biológico

Condiciones de cultivo:

- | | |
|--------------------------------|--|
| (La presente solicitud [0073]) | - 12% de glucosa, 3% de fuente de nitrógeno. |
| | - 50 ml en frascos Erlenmeyer reflectados de 250 ml |
| | - 350 rpm a 28°C. |
| D4 (Página 5737) | - Medio M1; 8% de glucosa, 2,5% de caseína hidrolizada por ácido |
| | - Medio T2; 5% de sacarosa y 2% de licor de maíz macerado |
| | - Medio T3; 5% de glucosa, 5% de peptona |
| | - Todos los medios: 100 ml en frascos Erlenmeyer reflectados de 250 ml |
| | - 300 rpm a 26°C. |

Discrepancias entre la presente solicitud y el D4

En la presente solicitud, el licor de maíz macerado demostró ser una escasa fuente de nitrógeno para la producción y la tolerancia a la desecación de las blastosporas de *B. bassiana* GHA (ver la presente solicitud, Figs. 1C y 1D). Por el contrario, el licor de maíz macerado fue la mejor fuente de nitrógeno en el D4.

En la presente solicitud, se requería que las concentraciones de glucosa > 10% produjeran concentraciones elevadas de composiciones de blastosporas de *B. bassiana* GHA (ver la Fig. 9 de la presente solicitud. Esto no resulta proporcional con las concentraciones de glucosa y el rendimiento resultante de las blastosporas del D4.

En la presente solicitud, las mediciones de O₂ en tiempo real mostraron que las tasas de la incubadora con agitador rotatorio a 350 rpm para 100 ml de volumen de cultivo no proporcionaron niveles adecuados de oxígeno disuelto, lo cual dio como resultado un nivel bajo de O₂ disuelto cercano a cero (ver la solicitud de patente, Fig. 10). Todos los cultivos de *B. bassiana* GHA del **D4** se cultivaron con 100 ml a 300 rpm, lo cual habría proporcionado aún menos oxígeno disuelto disponible. Todos los cultivos del D4 estaban limitados por el O₂.

Tolerancia a la desecación

Métodos:

La presente solicitud: los polvos de blastosporas secos se rehidrataron en 50 ml de caldo de dextrosa de papa y se incubaron a 28°C y 300 rpm en una incubadora con agitador rotatorio. Las esporas viables o germinadas se evaluaron después de 7 horas de incubación (la presente solicitud, párrafo [0073])

D4: los polvos de blastosporas secos se rehidrataron en 50 ml de caldo de dextrosa de papa y se incubaron a 26°C y 300 rpm en una incubadora con agitador rotatorio. Las esporas viables o germinadas se evaluaron después de 2, 4, 6, 8, 10, 12 y 14 horas de incubación (D4; pág. 5737). Los valores de germinación del D4 se informaron después de 10 horas de incubación.

Discrepancias entre la presente solicitud y el D4

Si se comparan las tasas de germinación de las blastosporas secadas al aire de ambos estudios a las 7 horas de incubación, las blastosporas de las composiciones del D4 son todas <50% (D4, Fig. 2, pág. 5739), mientras que las tasas de germinación de las blastosporas de la composición de la presente solicitud son > 70 % (la presente solicitud; Tabla 4, párrafo [0097]). De acuerdo con los criterios de la presente solicitud, las blastosporas del D4 **NO** son tolerantes a la desecación.

Todas las tasas de germinación de las blastosporas almacenadas se informaron después de 10 horas de incubación.

Estabilidad en almacenamiento

El D4 muestra una escasa supervivencia de blastosporas a 4°C o 26 C después de 6 meses de almacenamiento.

Eficacia biológica insecticida

Las composiciones de blastosporas del D4 muestran menor eficacia biológica insecticida (tasa de mortalidad más lenta) contra las larvas de polilla de dorso de diamante (*Plutella xylostella*) (en comparación con el control (conidios aéreos; D4; Tabla 3, Pg. 5741).

Las composiciones de blastosporas producidas usando los métodos de producción de la presente solicitud (alta aireación/presión osmótica) fueron más efectivas (la presente solicitud; Tabla 9,

párrafo [0112]) con una mortalidad más rápida (la presente solicitud; Tabla 10, párrafo [0113]) en comparación con el mismo control, conidios aéreos y con el control mosca blanca de la hoja plateada (*Bemisia tabaci* biotipo *B*) o cuando se las comparó con las composiciones de blastosporas producidas como se informa en el D4.

8. Todas las declaraciones efectuadas en el presente documento de mi propio conocimiento son ciertas y todas las declaraciones hechas sobre información y creencias, se cree, son ciertas. Asimismo, estas declaraciones se hicieron con el conocimiento de que las declaraciones falsas voluntarias y similares se castigarán con multa o prisión, o ambas, según la Sección 1001 del Título 18 del Código de los Estados Unidos, y que tales declaraciones falsas voluntarias pueden poner en riesgo la validez de la solicitud o de cualquier patente que se conceda al respecto. El declarante no tiene nada más que agregar.

En fe de lo cual, firmo en la fecha indicada a continuación.

15 de marzo de 2019 - [Firmado] Mark Jackson

Estado de Illinois - Condado de Peoria

El documento que antecede fue firmado ante mí a los 15 días del mes de marzo de 2019 por Mark Jackson. - [Firmado] Notario Público de Illinois - [Sello] Sello Oficial – Gabriel A. Jeffries – Notario Público del estado de Illinois – Mi mandato vence el 28 de septiembre de 2020.