AGENTES DE CONTROL BIOLÓGICOS MODIFICADOS Y SUS USOS

Referencia a solicitudes relacionadas

La presente solicitud reivindica prioridad respecto de la Solicitud de Patente Estadounidense Precaucional Número 61/933,954, presentada en Enero 31, 2014 y la Solicitud de Patente Estadounidense Precaucional Número 62/104,122, presentada en Enero 16, 2015, las cuales se incorporan por completo a la presente como referencia.

Campo de la invención

La invención se refiere a agentes de biocontrol modificados y poblaciones que poseen propiedades mejoradas.

Antecedentes

Las enfermedades y plagas de las plantas deben controlarse para mantener la calidad y cantidad del alimento, nutrientes y fibra que producen los agricultores en todo el mundo. Las enfermedades de las plantas fundamentalmente son causadas por hongos, bacteria, virus y nemátodos. Las plagas de las plantas incluyen insectos masticadores, chupadores y perforadores de los géneros Lepidópteros, Coleópteros y Hemípteros, entre otros. Los pesticidas químicos son ampliamente usados en agricultura para proteger los cultivos de tales plagas y enfermedades. Estos productos químicos combaten las plagas, enfermedades y malezas lo cual mejora el rendimiento. Sin la protección de los cultivos y control de plagas, la producción de alimentos así como su calidad declinaría. Sin embargo, el uso de pesticidas químicos genera un riesgo dado que muchas propiedades pueden poner en peligro la salud y el ambiente en caso que no se usen adecuadamente.

Un problema asociado con el uso continuo de pesticidas, herbicidas, u otros químicos protectores de cultivos es el desarrollo de resistencia al agente de control. La resistencia a los pesticidas es la menor susceptibilidad de una plaga a un agente de control a dosis que una vez eliminaron la mayoría de los individuos de la especie. En consecuencia, se necesitan nuevos productos con distintos modos de acción para ayudar a controlar la resistencia.

Se sabe desde hace mucho tiempo que microorganismos filogenéticamente diversos pueden actuar como antagonistas naturales de varios patógenos y plagas de plantas. Las interacciones entre huéspedes y microorganismos que conducen al biocontrol pueden incluir antibiosis, competencia, inducción de resistencia en el huésped, y depredación. La clasificación y ensayo de aislados ha dado como resultado cierto número de candidatos para la comercialización. Los biopesticidas microbianos representan una opción importante para la gestión de enfermedades y plagas en las plantas. Se necesitan agentes de control biológicos que sean capaces de competir en condiciones de campo particularmente en presencia de herbicidas y fungicidas comúnmente utilizados en la agricultura comercial y que puedan tener efectos antibióticos sobre microorganismos.

Resumen de la invención

Se proveen composiciones y métodos para mejorar la capacidad de una población de agentes biológicos o agentes de biocontrol para competir y sobrevivir en campo. Mejorando la población de agentes biológicos, la población modificada de agentes puede crecer, competir con otras cepas microbianas y hongos, y proteger las plantas contra los patógenos. Además, los agentes de control biológicos modificados estimulan el crecimiento y rendimiento de las plantas. En particular, se seleccionan o diseñan agentes biológicos modificados y poblaciones modificadas de tales agentes que son tolerantes o resistentes a los biocidas, tolerantes o resistentes a los herbicidas; tolerantes o resistentes a los hongos; o tolerantes o resistentes a los químicos para la protección de cultivos. De esta forma, se mejora la protección de los cultivos contra los agentes o plagas causantes de enfermedades.

Los agentes biológicos modificados pueden crecer en presencia de por lo menos un herbicida, fungicida, pesticida, u otro químico protector de cultivos que se use en la agricultura comercial. Estos agentes biológicos modificados pueden crecer y reproducirse en suelos donde tales herbicidas, fungicidas, pesticidas, u otros químicos protectores de cultivos han sido aplicados. Los agentes biológicos modificados tornan a los suelos supresivos o resistentes a los patógenos o plagas causantes de enfermedades. Tales poblaciones

modificadas de agentes biológicos pueden agregarse a los sueltos para anular los patógenos fungales y las enfermedades que causan, o inhibir la alimentación de plagas insectos o nemátodos, estimulando el crecimiento vegetal y aumentando el rendimiento del cultivo. En consecuencia, la presente invención resulta de utilidad para mejorar la competitividad de agentes biológicos modificados particularmente sobre otros agentes microbianos que no son resistentes a los herbicidas, fungicidas, pesticidas, u otros químicos protectores de cultivos. En consecuencia, las composiciones de la invención incluyen agentes biológicos seleccionados o diseñados y poblaciones modificadas de agentes de biocontrol. Estos agentes biológicos modificados pueden ser usaros como un inoculante o revestimiento de semilla para plantas y semillas. Además pueden ser rociados directamente a las partes aéreas de las plantas, y mezclarse con el herbicida u otro químico al cual han modificado para tornarlo tolerante. Según se ha indicado, la presencia de los agentes biológicos modificados bajo condiciones de campo mejora la resistencia de las plantas a los patógenos y estimula el crecimiento vegetal. Tales agentes biológicos modificados de la invención pueden ser usados con otros agentes para estimular el crecimiento y rendimiento de la planta.

Las realizaciones de la invención incluyen:

1. Un método para mejorar un agente de biocontrol, dicho método comprende modificar dicho agente de biocontrol para que sea resistente a por lo menos un herbicida, fungicida, pesticida, u otro químico protector de cultivos.

2. El método de la realización 1, en el cual dicho agente de biocontrol se modifica por crecimiento en presencia de un herbicida, fungicida, pesticida, u otro químico protector de cultivos para seleccionar una cepa resistente.

3. El método de la realización 1, en el cual dicho agente de biocontrol se modifica transformando dicho agente de biocontrol con un gen que confiere resistencia a dicho herbicida, fungicida, pesticida, u otro químico protector de cultivos.

4. El método de cualquiera de las realizaciones 1-3, en el cual dicho agente de biocontrol es un agente de biocontrol bacteriano.

5. El método de cualquiera de las realizaciones 1-3, en el cual dicho agente de biocontrol es seleccionado del grupo integrado por los géneros *Pseudomonas, Bacillus, Agrobacterium, Lysobacter, Trichoderma, Paecilomyces, Gliocladium, Ampelomyces, Pythium, Metschnikowia, Chromobacterium, Penicillium, Coniothyrium, Chaetomium, Myrothecium, Aureobasidium, Pantoea, Burkholderia, Streptomyces, Variovorax, Pasteuria, Lactobacillus, Paenibacillus, Xanthomonas*.

6. El método de la realización 5, en el cual dicho agente de biocontrol bacteriano es una bacteria *Pseudomonas*.

7. El método de la realización 6, en el cual dicha *Pseudomonas* es *Pseudomonas fluorescens* o *Pseudomonas clororaphis.*

8. El método de cualquiera de las realizaciones 1-7, en el cual dicho herbicida es seleccionado del grupo integrado por glifosato, glufosinato (inhibidor de glutamina sintasa), herbicidas de sulfonilurea e imidazolinona (inhibidores de la síntesis de aminoácidos de cadena ramificada).

9. Un agente de biocontrol modificado en el cual dicho agente de biocontrol ha sido seleccionado bajo presión de un herbicida, fungicida, pesticida, u otro químico protector de cultivos y es resistente a dicho herbicida, fungicida, pesticida, u otro químico protector de cultivos.

10. El agente de biocontrol modificado de la realización 9, en el cual dicho agente de biocontrol modificado es un agente de biocontrol bacteriano.

11. El agente de biocontrol modificado de la realización 9, en el cual dicho agente de biocontrol es seleccionado del grupo integrado por los géneros *Pseudomonas, Bacillus, Agrobacterium, Lysobacter, Trichoderma, Paecilomyces, Gliocladium, Ampelomyces, Pythium, Metschnikowia, Chromobacterium, Penicillium, Coniothyrium, Chaetomium, Myrothecium, Aureobasidium, Pantoea, Burkholderia, Streptomyces, Variovorax, Pasteuria, Xanthomonas*.

12. El agente de biocontrol modificado de la realización 10, en el cual dicho agente de biocontrol bacteriano es una bacteria *Pseudomonas*.

13. El agente de biocontrol modificado de la realización 12, en el cual dicha *Pseudomonas* es *Pseudomonas fluorescens o Pseudomonas clororaphis*.

14. El agente de biocontrol modificado de cualquiera de las realizaciones 9-13, en el cual dicho herbicida es seleccionado del grupo integrado por glifosato, glufosinato (inhibidor de glutamina sintasa), herbicidas de sulfonilurea e imidazolinona (inhibidores de la síntesis de aminoácidos de cadena ramificada).

15. Un agente de biocontrol recombinante en el cual dicho agente de biocontrol ha sido transformado con un gen de resistencia a los herbicidas que torna al agente de biocontrol resistente a los herbicidas

16. El agente de biocontrol recombinante de la realización 15, en el cual dicho agente de biocontrol modificado es un agente de biocontrol bacteriano.

17. El agente de biocontrol recombinante de la realización 16, en el cual dicho agente de biocontrol bacteriano es seleccionado del grupo integrado por los géneros *Pseudomonas, Bacillus, Agrobacterium, Lysobacter, Gliocladium, Pythium, Chromobacterium, Penicillium, Pantoea, Burkholderia, Streptomyces, Variovorax, Pasteuria, y Xanthomonas*.

18. El agente de biocontrol recombinante de la realización 17, en el cual dicho agente de biocontrol bacteriano es una bacteria *Pseudomonas*.

19. El agente de biocontrol recombinante de la realización 18, en el cual dicha *Pseudomonas* es *Pseudomonas fluorescens o Pseudomonas clororaphis*.

20. El agente de biocontrol recombinante de cualquiera de las realizaciones 15-19, en el cual dicho herbicida es seleccionado del grupo integrado por glifosato, glufosinato (inhibidor de glutamina sintasa), herbicidas de sulfonilurea e imidazolinona (inhibidores de la síntesis de aminoácidos de cadena ramificada).

21. Una población modificada de agentes de biocontrol en el cual la población sustancialmente comprende el agente de biocontrol de cualquiera de las realizaciones 1-20.

22. Una formulación para controlar un patógeno de planta, dicha formulación comprende una población modificada de agentes de biocontrol, en tanto dichos agentes de biocontrol son resistentes a los herbicidas, y un soporte adecuado.

23. La formulación de la realización 22, en la cual dicha población comprende agentes de biocontrol modificados bacterianos.

24. La formulación de la realización 22, en la cual dicha población comprende agentes de biocontrol recombinantes.

25. La formulación de cualquiera de las realizaciones 22-24, en la cual dicho agente de biocontrol está presente en una cantidad efectiva suficiente para mejorar la salud, crecimiento o rendimiento de la planta en presencia de cierta velocidad de aplicación al campo agrícola de un biocida.

26. La formulación de la realización 25, en la cual el agente de biocontrol comprende la cepa AIP050999 depositada como NRRL Nro. B-50999 y el biocida es glufosinato.

27. Un método para mejorar la capacidad de un agente de biocontrol para competir en el campo dicho método comprende modificar dicho agente biológico de manera tal que dicho agente de biocontrol modificado pueda cultivarse en presencia de un herbicida.

28. Un método para estimular el crecimiento vegetal, dicho método comprende aplicar una composición que comprende una población modificada de agentes de biocontrol al suelo donde dicha planta está creciendo.

29. El método de la realización 28, en el cual dichos agentes de biocontrol han sido modificados para ser resistentes a glifosato o glufosinato.

30. Un método para hacer crecer una planta que comprende aplicar a un cultivo, semilla o un área de cultivo una combinación de una cantidad efectiva de a biocida y una cantidad efectiva de un agente de biocontrol modificado en tanto

(a) la cantidad efectiva del biocida es tal como para controlar selectivamente un organismo de interés en tanto el cultivo no se daña significativamente; y,

(b) la cantidad efectiva del agente de biocontrol modificado es suficiente como para generar un aumento estadísticamente significativo de la salud, rendimiento y/o crecimiento de la planta respecto de la salud, rendimiento y/o crecimiento de la planta que se logra cuando la

misma concentración de un agente de biocontrol no modificado se aplica en combinación con la cantidad efectiva del biocida.

31. El método de la realización 30, en el cual el agente de biocontrol modificado y el biocida se aplican en forma simultánea.

32. El método de la realización 31, en el cual el agente de biocontrol modificado y el biocida se aplican en forma secuencial.

33. El método de cualquiera de las realizaciones 31-32, en el cual dicho agente de biocontrol comprende la cepa AIP050999 depositada como NRRL Nro. B-50999 y el biocida es glufosinato.

34. El método de la realización 33, donde el biocida es glufosinato, y en el cual la cantidad efectiva de glufosinato es tal como para controlar selectivamente malezas en tanto el cultivo no se daña significativamente.

35. Una población cultivada de un agente de biocontrol en la cual dicha población cultivada se produce cultivando una población de agentes bajo presión de un herbicida, fungicida, pesticida o un químico protector de cultivos para seleccionar un cultivo purificado de agentes de biocontrol que son resistentes a dicho herbicida, fungicida, pesticida u otro químico protector de cultivos.

36. La población cultivada del agente de biocontrol de la realización 35, en la cual dicho agente de biocontrol está presente en una cantidad efectiva suficiente para mejorar la salud, crecimiento o rendimiento de la planta en presencia de cierta velocidad de aplicación al campo agrícola de un biocida.

37. Un cultivo puro biológicamente aislado de un agente de biocontrol en el cual dicho agente de biocontrol es resistente a un biocida seleccionado entre un herbicida, un fungicida, un pesticida o un químico protector de cultivos en el cual dicho cultivo se produce creciendo en presencia de dicho biocida.

38. El cultivo puro biológicamente aislado del agente de biocontrol de la realización 37, en el cual dicho agente de biocontrol está presente en una cantidad efectiva suficiente para mejorar la salud, crecimiento o rendimiento de la planta en presencia de cierta velocidad de aplicación al campo agrícola de un biocida.

39. El método de la realización 35, en el cual dicha composición comprende un soporte adecuado.

40. Un cultivo bacteriano que crece a partir de la cepa AIP050999 depositada como NRRL Nro. B-50999, en el cual dicho cultivo bacteriano posee actividad antifungal y puede cultivarse en presencia de glufosinato.

41. El cultivo bacteriano de la Reivindicación 40, en el cual la cepa AIP050999 depositada como NRRL Nro. B-50999 está presente en una cantidad efectiva suficiente para mejorar la salud, crecimiento o rendimiento de la planta en presencia de cierta velocidad de aplicación en un campo agrícola de glufosinato.

Breve descripción de las Figuras

La Figura 1 provee una curva de crecimiento de las varias cepas en presencia de glifosato.

Descripción detallada

Se proveen composiciones y métodos para mejorar agentes de control biológicos. Un agente biológico o agente de biocontrol a los fines de la presente invención es un término que describe un microorganismo que se emplea para controlar un patógeno causante de enfermedades en plantas y plagas de plantas. Los agentes de control biológicos de la invención han sido modificados de manera tal que puedan cultivarse en presencia de por lo menos un biocida. Un biocida es una sustancia química que puede ejercer un efecto de control sobre un organismo por medios químicos o biológicos. Los biocidas incluyen pesticidas, tales como fungicidas; herbicidas; insecticidas, u otros químicos protectores de cultivos, y similares. Las composiciones de la invención incluyen uno o más agentes de biocontrol aislados que han sido seleccionados por sus resistencia a los biocidas como un herbicida, fungicida, pesticida, u otro químico protector de cultivos; un agente de biocontrol recombinante que ha sido transformado para contener un herbicida, fungicida, pesticida, u otro gen de resistencia química de protección de cultivos; una población modificada de agentes de biocontrol en la cual la población es resistente a por lo menos un herbicida, fungicida, pesticida, u otro químico protector de cultivos; y las que composiciones comprenden estas poblaciones

modificadas de agentes de biocontrol. La población modificada puede comprender microorganismos que han sido seleccionados por su resistencia a un herbicida, fungicida, pesticida, u otro químico protector de cultivos o que han sido transformados con un gen que confiere resistencia o tolerancia a tal herbicida, fungicida, pesticida, u otro químico protector de cultivos. Así, la invención comprende cultivos sustancialmente puros, o biológicamente puros, de tales agentes de biocontrol o agentes biológicos modificados. Un "cultivo bacteriano biológicamente puro" se refiere a un cultivo de bacterias que no contiene otras especies bacterianas en cantidades como para ser detectadas por técnicas bacteriológicas normales. Dicho de otra forma, se trata de un cultivo en el cual prácticamente todas las células bacterianas presentes son de la cepa seleccionada. Un agente de biocontrol modificado incluye agentes de biocontrol que han adquirido un rasgo debido a la presión de selección y los agentes de biocontrol recombinantes que han sido transformados con un gen que confiere resistencia o tolerancia a por lo menos un herbicida, fungicida, pesticida, u otro químico protector de cultivos.

AIP050999 fue depositado por ante el Depósito de Patentes del National Center for Agricultural Utilization Research Agricultural Research Service, U.S. Department of Agriculture, 1815 North University Street, Peoria, Illinois 61604 U.S.A. en Enero 23, 2015 y le fue asignado el NRRL Nro. B-50999. Cada uno de estos depósitos será conservado conforme lo dispuesto por el Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósitos de Microorganismos a los fines del Procedimiento en materia de Patentes. Este depósito fue realizado meramente para facilitar el trabajo del experto en el arte y no constituye una admisión de su obligatoriedad conforme 35 U.S.C. §112.

La expresión “tolerancia a un herbicida, fungicida, pesticida, u otro químico protector de cultivos o resistencia a un herbicida, fungicida, pesticida, u otro químico protector de cultivos” hace referencia a la capacidad de un organismo (es decir, la planta, el agente de biocontrol, el agente bacteriano de biocontrol, etc.) de sobrevivir y reproducirse luego de la exposición a una dosis del herbicida, fungicida, pesticida, u otro químico protector de cultivos que normalmente es letal para el organismo salvaje.

Los agentes biológicos o agentes de biocontrol de la invención incluyen microorganismos y hongos que controlan los patógenos que provocan enfermedades en las plantas y estimulan su salud, crecimiento, y rendimiento. Cualquiera de estos agentes biológicos o de biocontrol puede ser modificado por selección o transformación y producir un agente biológico o de biocontrol modificado o agente biológico o de biocontrol recombinante. Así, la invención contempla un agente de biocontrol modificado aislado. Los agentes de biocontrol modificados pueden ser desarrollados para producir una población de agentes de biocontrol. La expresión "población de agentes biológicos o de biocontrol modificados" hace referencia a una población de agentes que sustancialmente comprende un cultivo del agente seleccionado o del agente recombinante que posee el rasgo de interés como resistencia a un herbicida, fungicida, pesticida, u otro químico protector de cultivos. La expresión comprende sustancialmente se refiere a que la población se ha desarrollado y producido a partir del agente de biocontrol modificado o recombinante. Es decir, los agentes de biocontrol modificados o recombinantes pueden ser desarrollados para producir un cultivo biológicamente puro. Se reconoce que tales cultivos biológicamente puros pueden ser utilizados en conjunto para mejorar la salud, crecimiento o rendimiento de la planta.

Cualquier agente biológico o de biocontrol puede ser empleado en los métodos de la invención. Los microorganismos específicos de interés incluyen cepas de las bacterias *Pseudomonas, Bacillus, Agrobacterium, Lysobacter, Gliocladium, Pythium, Chromobacterium, Penicillium, Pantoea, Lactobacillus, Paenibacillus, Burkholderia, Streptomyces, Variovorax, Pasteuria, Xanthomonas*, etc. Los hongos de interés incluyen *Aureobasidium, Ampelomyces, Beauveria, Metarhizium, Metschnikowia, Myrothecium, Lecanicillium, Chaetomium, Cordyceps, Coniothyrium, Dactylella, Gliocladium, Aspergillis, Paecilomyces, Trichoderma, Pisolithus, Glomus*, etc. Véanse, por ejemplo, las Patentes Estadounidenses Números 5,348,742; 5,496,547; 5,756,087; 5,955,348; 6,060,051; 6,635,425; y la Publicación de Patente Estadounidense 20130142759; todas las cuales se incorporan a la presente como referencia. Muchos agentes de biocontrol son comercializados en el

mercado y cualquiera de ellos puede ser modificado de acuerdo a la presente invención. Tales agentes incluyen: *Agrobacterium radiobacter* K84; *Trichoderma atroviride; Bacillus subtilis* GB03; *Bacillus firmus* I-1582; *Trichoderma asperellum* (ICC 012); *T. gamsii* (ICC 080); *Bacillus pumilus* cepa QST 2808; *Bacillus subtilis* cepa QST 713; *B. subtilis* cepa MBI 600; *Paecilomyces fumosoroseus*; *Gliocladium catenulatum; Trichoderma harzianum rifai* cepa KRL-AG2; *Trichoderma harzianum* T-22; *Trichoderma harzianum* T-22; *Trichoderma virens* cepa G-41; *Trichoderma harzianum* T-22; *Bacillus subtilis* QST 713; *Bacillus amyloliquefaciens* cepa D747; *Trichoderma (Gliocladium) virens* GL-21; *Paecilomyces lilacinus*; *Paecilomyces fumosoroseus*; *Ampelomyces quisqualis*; *B. subtilis* DSM 17231; *B. licheniformis* DSM 17236; *Pythium oligandrum* DV 74; *Bacillus subtilis* GB03; *Trichoderma asperellum*; *T. gamsii*; *Pseudomonas syringae* ESC-10; *Metschnikowia fructicola; Trichoderma harzianum* T-22; *Pseudomonas clororaphis* MA 342; *B. amyloliquifaciens*; *Chrombacterium subtsugae* cepa PRAA4-1; *B. subtilis amyloliquefaciens* FZB24; *Penicillium bilaii*; *Paecilomyces fumosoroseus* FE 9901; *Streptomyces lydicus* WYEC 108; *P. syringae* A506; *Coniothyrium minitans; Paecilomyces lilacinus* cepa 251; *Streptomyces lydicus* WYEC-108; Bacillus *amyloliquifaciens*; *Trichoderma virens*; *Trichoderma viride; Ampelomyces quisqualis*; *Chaetomium globosum*; *Pseudomonas fluorescens*; *Bacillus subtilis*; *Bacillus pumulis*; *Myrothecium verrucaria* AARC-0255; *Streptomyces actinobacterium* cepa K61; *Gliocladium catenulatum* J1446; *Aureobasidium pullulans* cepa DSM 14940; y *A. pullulans* cepa DSM 14941. Otros productos de control de enfermedades biológicos pueden encontrarse en la web en: nevegetable.org/table-22-biological-disease-control-products.

Los patógenos que provocan enfermedades incluyen hongos, bacteria, virus y nemátodos. Los agentes de biocontrol de la invención son aquellos que atacan cualquiera de los patógenos de plantas. Los patógenos blanco incluyen entre otros *Alternaria, Botrytis*, *Fusarium*, *Erwinia, Pseudomonas, Xanthomonas, Cercospora, Colletotrichum, Cladosporium, -Erisyphae* spp., *Microsphaera syringae, Peronospora* spp., *Plasmopara spp., Phytophthora, Pythium, Rhizoctonia, Diplocarpon, Venturia, Mycosphaerella, Phomopsis,*

Taphrina, Elsinoe, Sclerotinia, Verticillum, Gnomonia, Fusicladium, Nectria, Phyllosticta, Diplocarpon, Albugo, Guignardia, Botrytis, Exobasidium, Entomosporium, Exobasidium, Pestalotia, Phoma, Cristulariella, Phakopsora, Thelaviopsis, Puccinia, Peronospora, Bremia, Pantoea, Clavibacter.

La resistencia a los herbicidas, fungicidas, pesticidas, u otro químico protector de cultivos es la capacidad de un organismo de sobrevivir y reproducirse luego de la exposición a una dosis del herbicida, fungicida, pesticida, u otro químico protector de cultivos que normalmente sería letal para el organismo salvaje o reduciría sustancialmente su crecimiento. La resistencia puede ser inducida o identificada por selección o puede ser inducida por ingeniería genética. Para identificar y producir una población modificada de agentes de biocontrol por selección, los agentes de biocontrol crecen en presencia del herbicida, fungicida, pesticida, u otro químico protector de cultivos como la presión de selección. Los agentes susceptibles son eliminados mientras que los resistentes sobreviven para reproducirse sin competencia. A medida que los agentes de biocontrol se desarrollan en presencia del herbicida, fungicida, pesticida, u otro químico protector de cultivos, los agentes de biocontrol resistentes se reproducen con éxito y se transforman en dominantes en la población que se torna en una población modificada de agentes de biocontrol. Los métodos de selección de cepas resistentes son conocidos e las incluyen Patentes Estadounidenses Números 4,306,027 y 4,094,097, que se incorporan a la presente como referencia. En consecuencia, la invención incluye un cultivo biológicamente puro de una cepa de biocontrol resistente. Las cepas resistentes de la invención tienen las mismas características de identificación que la original sensible con la diferencia que son significativamente más tolerantes al herbicida, fungicida, pesticida, u otro químico protector de cultivos en particular. Así, su identificación es sencilla por comparación contra las características de la cepa sensible conocida.

Los herbicidas incluyen glifosato, inhibidores de ACCase (Arloxifenoxi propionato (FOPS)); inhibidores de ALS (Sulfonilurea (SU)), Imidazonlinona (IMI), Pirimidinas (PM)); inhibidor de proteínas microtubulares (Dinitroanilina

(DNA)); auxinas sintéticas (Fenoxi (P)), Acido benzoico (BA), Acido carboxílico (CA)); inhibidor de Photosystem II (Triazina (TZ)), Triazinono (TN), Nitrilos (NT), Benzotiadiazinonas (BZ), Ureas (US)); inhibidor de EPSP sintasa (glicinas (GC)); inhibidor de la síntesis de Glutamina (Acido fosfínico (PA)); DOXP inhibidor de sintasa (Isoxazolidinona (IA)); inhibidor de HPPD (Pirazol (PA)), Triketona (TE)); inhibidores de PPO (Difeniléter (DE), N-fenilftalamida (NP) (Ari triazinona (AT)); inhibidores de VLFA (cloracetamida (CA)), Oxiacetamida (OA)); inhibidor de Photosystem I (Bipiridilios (BP)); y similares.

Los pesticidas incluyen imidacloprid clotianidin, compuestos de arilpirazol (WO2007103076); organofosfatos, fenil pirazol, piretroides caramoiloximas, pirazols, amidinas, hidrocarburos halogenados, carbamatos y sus derivados, terbufos, clorpirifos, fipronil, cloretoxifos, telfuthrin, carbofurano, imidacloprid, tebupirimfos (5,849,320).

Los fungicidas incluyen fungicidas de nitrógeno alifático (butilamina, cimoxanil, dodicin, dodina, guazatina, iminoctadina); fungicidas de amida (benzovindiflupir, carpropamid, cloraniformetan, ciflufenamid, diclocimet, diclocimet, dimoxistrobin, fenaminstrobin, fenoxanil, flumetover, furametpir, isofetamid, isopirazam, mandestrobin, mandipropamid, metominostrobin, orisastrobin, pentiopirad, procloraz, quinazamid, siltiofam, triforine); fungicidas de acil amino (benalaxil, benalaxil-M, furalaxil, metalaxil, metalaxil-M, pefurazoato, valifenalato); fungicidas de anilida (benalaxil, benalaxil-M, bixafen, boscalid, carboxin, fenhexamid, fluxapiroxad, isotianil, metalaxil, metalaxil-M, metsulfovax, ofurace, oxadixil, oxicarboxin, penflufen, piracarbolid, sedaxano, tifluzamida, tiadinil, vanguard); fungicidas de benzanilida (benodanil, flutolanil, mebenil, mepronil, salicilanilida, tecloftalam); fungicidas de furanilida (fenfuram, furalaxil, furcarbanil, metfuroxam); fungicidas de sulfonanilida (flusulfamida); benzamida fungicidas (ácido benzohidroxámico, fluopicolide, fluopiram, tioximid, triclamida, zarilamid, zoxamida); fungicidas de furamida (ciclafuramid, furmeciclox); fenilsulfamida fungicidas (diclofluanid, tolilfluanid); sulfonamida fungicidas (amisulbrom, ciazofamid); valinamida fungicidas (bentiavalicarb, iprovalicarb); fungicidas antibióticos (aureofungin, blasticidin-S, cicloheximida, griseofulvin, kasugamicina, moroxidina, natamicina, polioxinas, polioxorim,

estreptomicina, validamicina); fungicidas de estrobilurina (fluoxastrobin, mandestrobin); fungicidas de estrobilurina metoxiacrilato (azoxistrobin, bifujunzhi, coumoxistrobin, enoxastrobin, flufenoxistrobin, jiaxiangjunzhi, picoxistrobin, piraoxistrobin); fungicidas de estrobilurina metoxicarbanilato (piraclostrobin, pirametostrobin, triclopiricarb); fungicidas de estrobilurina metoxiiminoacetamida (dimoxistrobin, fenaminstrobin, metominostrobin, orisastrobin); fungicidas de estrobilurina metoxiiminoacetato (kresoxim-metil, trifloxistrobin); fungicidas aromáticos (bifenil, clorodinitronaftalenos, cloroneb, clorotalonil, cresol, dicloran, fenjuntong, hexaclorobenceno, pentaclorofenol, quintozenp, sodio pentaclorofenóxido, tecnazeno, triclorotrinitrobencenos); fungicidas arsenicales (asomato, urbacida); fungicidas de aril fenil cetona (metrafenona, piriofenona); fungicidas de benzimidazol (albendazolp, benomil, carbendazim, clorfenazol, cipendazol, debacarb, fuberidazol, mecarbinzid, rabenzazol, tiabendazol); fungicidas de precursores de benzimidazol (furofanato, toiofanato, tiofanato-metilo); fungicidas de benzotiazol (bentaluron, bentiavalicarb, bentiazol, clobentiazona, probenazol); fungicidas botanicos (alicina, berberina, carvacrol, carvona, ostol, sanguinarina, santonin); fungicidas de difenilo ramificado (bitionol, diclorofeno, difenilamina, hexaclorofeno, parinol); fungicidas de carbamato (bentiavalicarb, furofanato, yodocarb, iprovalicarb, picarbutrazox, propamocarb, piribencarb, tiofanato, tiofanato-metilo, tolprocarb); fungicidas de benzimidazolilcarbamato (albendazol, benomil, carbendazim, cipendazol, debacarb, mecarbinzid); fungicidas de carbanilato (dietofencarb, piraclostrobin, pirametostrobin, triclopiricarb); fungicidas de conazol, fungicidas de conazol (imidazols) (climbazol, clotrimazol, imazalil, oxpoconazol, procloraz, triflumizol); fungicidas de conazol (triazoles) (azaconazol, bromuconazol, ciproconazol, diclobutrazol, difenoconazol, diniconazol, diniconazol-M, epoxiconazol, etaconazol, fenbuconazol, fluquinconazol, flusilazol, flutriafol, furconazol, furconazol-cis, hexaconazol, imibenconazol, ipconazol, metconazol, myclobutanil, penconazol, propiconazol, protioconazol, quinconazol, simeconazol, tebuconazol, tetraconazol, triadimefon, triadimenol, triticonazol, uniconazol, uniconazol-P); fungicidas de cobre (acypetacs-cobre, mezcla de Bordeaux, mezcla de Burgundy, mezcla de

Cheshunt, acetato de cobre, carbonato de cobre, básico, hidróxido de cobre, naftenato de cobre, oleato de cobre, oxicloruro de cobre, silicato de cobre, sulfato de cobre, sulfato de cobre, básico, cromato de cobre y zinc, cufraneb, cuprobam, óxido cuproso, mancopper, oxina-cobre, saisentong, tiodiazol-cobre); fungicidas de ciano acrilato (benzamacril, penamacril); fungicidas de dicarboximida (famoxadona, fluoroimida); fungicidas de diclorofenil dicarboximida (clozolinato, diclozolina, iprodiona, isovalediona, miclozolin, procimidona, vinclozolin); fungicidas de ftalimida (captafol, captan, ditalimfos, folpet, tioclorfenfim); fungicidas de dinitrofenol (binapacril, dinobuton, dinocap, dinocap-4, dinocap-6, meptildinocap, dinocton, dinopenton, dinosulfon, dinoterbon, DNOC); fungicidas de ditiocarbamato (amobam, asomato, azitiram, carbamorf, cufraneb, cuprobam, disulfiram, ferbam, metam, nabam, tecoram, tiram, urbacida, ziram); fungicidas de ditiocarbamato cíclico (dazomet, etem, milneb); fungicidas de ditiocarbamato polimérico (mancopper, mancozeb, maneb, metiram, policarbamato, propineb, zineb); fungicidas de ditiolano (isoprotiolano, saijunmao); fungicidas fumigantes (dilsulfuro de carbono, cianogen, ditioéter, bromuro de metilo, yoduro de metilo, tetratiocarbonato de sodio); fungicidas de hidrazida (benquinox, saijunmao); fungicidas de imidazol (ciazofamid, fenamidona, fenapanil, gliodin, iprodiona, isovalediona, pefurazoato, triazóxido); fungicidas de conazol (imidazoles) (climbazol, clotrimazol, imazalil, oxpoconazol, procloraz, triflumizol); fungicidas inorgánicos (azida de potasio, tiocianato de potasio, azida de sodio, azufre, véanse además fungicidas de cobre, véanse además fungicidas de mercurio inorgánicos); fungicidas de mercurio; fungicidas de mercurio inorgánicos (cloruro de mercurio, óxido de mercurio, cloruro mercurioso); fungicidas de organo mercurio ((3-etoxopropil) mercurio bromuro, etilmercurio acetato, etilmercurio bromuro, etilmercurio cloruro, etilmercurio 2,3-dihidroxipropil mecapturo, etilmercurio fosfato, *N*-(etilmercurio)-*p*-toluensulfoanilida, hidrargafen, 2-metoxietilmercurio cloruro, metilmercurio benzoato, metilmercurio diciandiamida, metilmercurio pentaclorofenóxido, 8-fenilmercurioxiquinolina, fenilmercuriurea, fenilmercurio acetato, fenilmercurio cloruro, derivado de fenilmercurio de pirocatecol, fenilmercurio nitrato, fenilmercurio salicilato,

tiomersal, tolilmercurio acetato); fungicidas de morfolina (aldimorph, benzamorph, carbamorph, dimethomorph, dodemorph, fenpropimorph, flumorph, tridemorph); fungicidas organofosforosos (ampropylfos, ditalimfos, EBP, edifenphos, fosetyl, hexiltiofos, inezin, iprobenfos, izopamfos, kejunlin, fosdifen, pirazofos, tolclofos-metil, triamifos); fungicidas de organoestaño (decafentin, fentin, óxido de tributil estaño); fungicidas de oxathiin (carboxin, oxicarboxin); fungicidas de (clozolinato, diclozolina, drazoxolon, famoxadona, himexazol, metazoxolon, miclozolin, oxadixil, oxatiapiprolin, pirisoxazol, vinclozolin); fungicidas de polisulfuros (polisulfuro de bario, polisulfuro de calcio, polisulfuro de potasio, polisulfuro de sodio), fungicidas de pirazol (benzovindiflupir, bixafen, fenpirazamina, fluxapiroxad, furametpir, isopirazam, oxatiapiprolin, penflufen, pentiopirad, piraclostrobin, pirametostrobin, piraoxistrobin, rabenzazol, sedaxano); fungicidas de piridina (boscalid, butiobato, dipiritiona, fluazinam, fluopicolida, fluopiram, parinol, picarbutrazox, piribencarb, piridinitril, pirifenox, pirisoxazol, piroxiclor, piroxifur, triclopiricarb); fungicidas de pirimidina (bupirimato, diflumetorim, dimetirimol, etirimol, fenarimol, ferimzona, nuarimol, triarimol); fungicidas de anilinopirimidina (ciprodinil, mepanipirim, pirimetanil); fungicidas de pirrol (dimetaclona, fenpiclonil, fludioxonil, fluoroimida); fungicidas de amonio cuaternario (berberina, sanguinarina); fungicidas de quinolina (etoxiquina, halacrinato, 8-hidroxiquinolina sulfato, quinacetol, quinoxifen, tebufloquin); fungicidas de quinona (cloranil, diclona, ditianon); fungicidas de quinoxalina (quinometionato, clorquinox, tioquinox); fungicidas de tiadiazol (etridiazol, saisentong, tiodiazol-cobre, zinc tiazol); fungicidas de tiazol (etaboxam, isotianil, metsulfovax, octilinona, oxatiapiprolin, tiabendazol, tifluzamida); fungicidas de tiazolidina (flutianil, tiadifluor); fungicidas de tiocarbamato (metasulfocarb, protiocarb); fungicidas de tiofeno (etaboxam, isofetamid, siltiofam); fungicidas de triazina (anilazina); fungicidas de triazol (amisulbrom, bitertanol, fluotrimazol, triazbutil); fungicidas de conazol (triazoles) (azaconazol, bromuconazol, ciproconazol, diclobutrazol, difenoconazol, diniconazol, diniconazol-M, epoxiconazol, etaconazol, fenbuconazol, fluquinconazol, flusilazol, flutriafol, furconazol, furconazol-cis, hexaconazol, huanjunzuo, imibenconazol, ipconazol,

metconazol, miclobutanil, penconazol, propiconazol, protioconazol, quinconazol, simeconazol, tebuconazol, tetraconazol, triadimefon, triadimenol, triticonazol, uniconazol, uniconazol-P); fungicidas de triazolopirimidina (ametoctradina); fungicidas de urea (bentaluron, pencicuron, quinazamid); fungicidas de zinc (acipetacs-zinc, cromato de cobre zinc, cufraneb, mancozeb, metiram, policarbamato, polyoxorim-zinc, propineb, naftenato de zinc, zinc tiazol, zinc triclorofenóxido, zineb, ziram); fungicidas sin clasificar (acibenzolar, acypetacs, alcohol alílico, cloruro de benzalconio, betoxazin, bromotalonil, quitosán, cloropicrin, DBCP, ácido dehidroacético, diclomezina, dietil pirocarbonato, etilicin, fenaminosulf, fenitropan, fenpropidin, formaldehído, furfural, hexaclorobutadieno, metil isotiocianato, nitroestirano, nitrotal-isopropilo, OCH, pentaclorofenil laurato, 2-fenilfenol, ftalida, piperalin, propamidina, proquinazid, piroquilon, ortofenilfenóxido de sodio, espiroxamina, sultropen, ticiofen, triciclazol) o mefenoxam.

Según se ha indicado, los agentes de biocontrol recombinantes que poseen resistencia a un herbicida, fungicida, pesticida, u otro químico protector de cultivos pueden ser preparados por técnicas de ingeniería genética y tales agentes de biocontrol recombinantes cultivados para obtener una población modificada de agentes de biocontrol. Un agente de biocontrol recombinante se produce introduciendo polinucleótidos en la célula huésped de biocontrol por transformación. Los métodos de transformación de microorganismos son conocidos y están disponibles en la técnica. Véase, en general, Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids *J. Mol. Biol.* 166, 557–77; Seidman, C.E. (1994) In: *Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel, F.M. *et al.* eds., John Wiley and Sons, NY; Choi et al. (2006) J. Microbiol. Methods 64:391-397; Wang et al. 2010. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 85:775–778. La transformación puede producirse por absorción natural de ADN desnudo por células competentes a partir de su entorno en el laboratorio. Alternativamente, las células pueden hacerse competentes por exposición a cationes divalentes bajo condiciones frías, por electroporación, por exposición a polietilen glicol, por tratamiento con nanopartículas fibrosas, u otros métodos muy conocidos en arte.

Los genes de resistencia a los herbicidas para uso en la transformación de un agente de biocontrol recombinante incluyen, entre otros, genes de detoxificación de fumonisin (Patente Estadounidense Nro. 5,792,931); mutantes de acetolactato sintasa (ALS) que conducen a resistencia a los herbicidas, en particular herbicidas tipo sulfonilurea, como las mutaciones S4 y/o Hra; inhibidores de glutamina sintasa como fosfinotricina o basta (por ejemplo, gen bar); y resistencia al glifosato (gen EPSPS)); y resistencia a HPPD (WO 96/38576, Patentes Estadounidenses Números 6,758,044; 7,250,561; 7,935,869; y 8,124,846), o otros genes conocidos en arte. Estas divulgaciones se incorporan a la presente como referencia. El gen bar codifica resistencia al herbicida basta, el gen nptII codifica resistencia a los antibióticos kanamicina y geneticina, y los mutantes del gen ALS codifican resistencia a los herbicidas de sulfonilurea que incluyen clorsulfuron, metsulfuron, sulfometuron, nicosulfuron, rimsulfuron, flazasulfuron, sulfosulfuron, y triasulfuron, y los herbicidas de imadizolinona que incluyen imazetapir, imazaquin, imazapir, y imazametabenz.

Las poblaciones modificadas de agentes de control biológicos de la invención pueden formularse como polvos humectables, polvos, gránulos, productos líquidos acuosos o a base de aceite, y similares. Estas formulaciones comprenderán los agentes de control biológicos modificados además de portadores y otros agentes. Las formulaciones pueden ser usadas como inoculantes de campo para biocontrol, recubrimientos de semillas, etc. Es decir, las poblaciones de biocontrol modificadas pueden ser utilizadas de cualquier forma conocida en el arte, incluso para recubrir semillas con una cantidad efectiva de los agentes modificados, aplicando de manera directa al surco en la tierra las poblaciones de biocontrol modificadas, aplicación foliar, mezcla en una mezcla para siembra, y en el control de enfermedades post-cosecha. Estos métodos son conocidos en el arte y están descriptos, por ejemplo, en la Patente Estadounidense Nro. 5,348,742 y en la Solicitud de Patente Europea publicada EP0472494 A2, las cuales se incorporan a la presente como referencia. Biocontrol incluye la gestión de poblaciones residentes de

organismos e introducciones de organismos específicos para reducir la enfermedad.

El agente de biocontrol provisto en la presente puede mezclarse con un fungicida, insecticida, o herbicida para mejorar su actividad o la actividad del químico al cual se agrega. En algunos casos la combinación del agente de biocontrol y químico puede tener una actividad sinergística, donde la mezcla de los dos excede lo esperado de su simple efecto aditivo.

Los agentes de control biológicos modificados de la invención pueden ser utilizados para reducir significativamente la enfermedad, promover el crecimiento y rendimiento de la planta, y reducir la dependencia de pesticidas adicionales. Los agentes modificados de la invención pueden ser utilizados con otros pesticidas para un programa de gestión de plagas integrado efectivo. En una realización, las poblaciones de biocontrol modificadas pueden mezclarse en formulación con pesticidas conocidos según lo descripto en WO 94/10845, la cual se incorpora a la presente como referencia.

Las poblaciones de biocontrol modificadas se aplican en una cantidad efectiva. Una cantidad efectiva de una población de biocontrol modificada es una cantidad suficiente como para controlar o inhibir el patógeno. En otras realizaciones, la cantidad efectiva del agente de biocontrol modificado es una cantidad suficiente como para promover o incrementar la salud, crecimiento o rendimiento de la planta en presencia de cierta velocidad de aplicación al campo agrícola de un biocida. La tasa de aplicación del agente de biocontrol modificado y/o el biocida puede variar de acuerdo al patógeno atacado, al cultivo a proteger, la eficacia de las poblaciones de biocontrol modificadas, la severidad de la enfermedad, las condiciones climáticas, y similares. En general para una inoculación en campo, la proporción de aplicación de agente de biocontrol modificado oscila entre 10^{12} y 10^{16} unidades formadoras de colonia (CFU) por hectárea. (Esto corresponde a aproximadamente 10 g y 10 kg de ingrediente activo por hectárea si a.i. es 100 billones de CFU por g). En otras realizaciones, para una inoculación en campo, la proporción de aplicación de agente de biocontrol modificado oscila entre 3×10^{15} y 1×10^{17} unidades formadoras de colonia (CFU) por hectárea. (Esto corresponde a

aproximadamente 30 kg y 1000 kg de ingrediente activo por hectárea si a.i. es 100 billones de CFU por g). En otras realizaciones, para una inoculación en campo, la proporción de aplicación de agente de biocontrol modificado oscila entre 3 x 10^{15} y 1 x 10^{17} unidades formadoras de colonia (CFU) por hectárea; aproximadamente entre 1x10^{12} y aproximadamente 1x10^{13} unidades formadoras de colonia (CFU) por hectárea, aproximadamente entre 1x10^{13} y aproximadamente 1x10^{14} unidades formadoras de colonia (CFU) por hectárea, aproximadamente entre 1x10^{14} y aproximadamente 1x10^{15} unidades formadoras de colonia (CFU) por hectárea, aproximadamente entre 1x10^{15} y aproximadamente 1x10^{16} unidades formadoras de colonia (CFU) por hectárea o aproximadamente entre 1x10^{16} y aproximadamente 1x10^{17} unidades formadoras de colonia (CFU) por hectárea. En otras realizaciones, para una inoculación en campo, la proporción de aplicación de agente de biocontrol modificado es de por lo menos aproximadamente 1x10^{13}, aproximadamente 1x10^{14}, 1x10^{15}, aproximadamente 1x10^{16} o aproximadamente 1x10^{17} unidades formadoras de colonia (CFU) por hectárea. En aún otras realizaciones, la proporción de aplicación de agente de biocontrol modificado oscila entre 10g y 50kg, 50kg y 100kg, 100kg y 200kg, 200kg y 300kg, 300kg y 400kg, 400kg y 500kg, 500kg y 600kg, 600kg y 700kg, 700kg y 800kg, 800kg y 900kg, 900kg y 1000kg de ingrediente activo por hectárea si a.i. es 100 billón de CFU por g. En aún otras realizaciones, la proporción de aplicación de agente de biocontrol modificado es de por lo menos 10g, 50kg, 100kg, 200kg, 300kg, 400kg, 500kg, 600kg, 700kg, 800kg, 900kg, 1000kg de ingrediente activo por hectárea si a.i. es 100 billones de CFU por g. En realizaciones específicas, el agente de biocontrol modificado aplicado comprende la cepa AIP050999 depositada como NRRL Nro. B-50999.

Es posible usar cualquier tasa de aplicación agrícola adecuada de un biocida al cultivo, por ejemplo, una cantidad efectiva del biocida que controle un organismo dado (es decir, una plaga de interés, como un hongo, insectos, malezas, enfermedad, etc.). Los métodos para determinar la cantidad efectiva del agente de biocontrol modificado incluyen, por ejemplo, cualquier aumento estadísticamente significativo en la salud, rendimiento y/o crecimiento de la

planta que se produce ante la aplicación de una cantidad efectiva del agente de biocontrol y una proporción de aplicación en campo de un biocida respecto de la salud, rendimiento y/o crecimiento de la planta que se logra cuando la misma concentración de un agente de biocontrol no modificado se aplica en combinación con la cantidad efectiva del biocida.

En consecuencia, una realización adicional de la invención provee un método de control o inhibición del crecimiento de un patógeno de planta mediante la aplicación de la población de agentes de control biológicos modificados de la invención a un ambiente donde el patógeno de planta puede crecer. La aplicación puede realizarse sobre la planta, partes de la planta, las semillas de las plantas a proteger, o el suelo donde la planta a proteger crece o crecerá. La aplicación a la planta o partes de la misma puede realizarse antes o después de la cosecha. La aplicación a las semillas será anterior a su siembra.

En otras realizaciones, un cultivo, área de cultivo, semilla y/o maleza pueden tratarse con una combinación de una cantidad efectiva del agente de control modificado y una cantidad efectiva de un biocida. La expresión “tratado con una combinación de” o “aplicación de una combinación de” agente de biocontrol modificado y un biocida a un cultivo, área de cultivo o campo se refiere al tratamiento de un campo, cultivo, semilla y/o maleza con uno o más de los agentes de biocontrol modificados y uno o más biocidas con el fin de lograr un efecto deseado. Además. La aplicación del agente de biocontrol modificado y/o el biocida puede producirse antes de sembrar el cultivo (por ejemplo, al suelo, la semilla, o la planta). Por otra parte, la aplicación del agente de biocontrol modificado y el biocida puede ser simultánea o las aplicaciones pueden realizarse en distintos momentos (secuenciales) en la medida en que se logre el efecto deseado.

En una realización no limitativa, el agente de biocontrol modificado es resistente a glifosato y además incrementa la salud, rendimiento o crecimiento de la planta al aplicarse en una cantidad efectiva, y el biocida comprende glifosato o un derivado activo del mismo. En tales métodos, una semilla, planta o área de cultivo se trata con una combinación de una cantidad efectiva del agente de biocontrol modificado que es resistente a glifosato y una cantidad

efectiva de glifosato, donde la cantidad efectiva de glifosato es tal como para controlar selectivamente malezas en tanto el cultivo no se daña significativamente. En tales realizaciones, la cantidad efectiva del agente de biocontrol modificado es suficiente como para generar un aumento estadísticamente significativo de la salud, rendimiento y/o crecimiento de la planta respecto de la salud, rendimiento y/o crecimiento de la planta que se logra cuando la misma concentración de un agente de biocontrol no modificado se aplica en combinación con la cantidad efectiva del glifosato o derivado activo del mismo.

En otra realización no limitativa, el agente de biocontrol modificado es resistente a glufosinato y además incrementa la salud, rendimiento o crecimiento de la planta al aplicarse en una cantidad efectiva, y el biocida comprende glufosinato o un derivado activo del mismo. En tales métodos, una semilla, planta o área de cultivo se trata con una combinación de una cantidad efectiva del agente de biocontrol modificado que es resistente a glufosinato y una cantidad efectiva de glufosinato, donde la cantidad efectiva de glufosinato es tal como para controlar selectivamente malezas en tanto el cultivo no se daña significativamente. En tales realizaciones, la cantidad efectiva del agente de biocontrol modificado es suficiente como para generar un aumento estadísticamente significativo de la salud, rendimiento y/o crecimiento de la planta respecto de la salud, rendimiento y/o crecimiento de la planta que se logra cuando la misma concentración de un agente de biocontrol no modificado se aplica en combinación con la cantidad efectiva del glufosinato o derivado activo del mismo. En una realización adicional, el agente de biocontrol comprende una cantidad efectiva de AIP050999.

De acuerdo a la presente, el término “planta” incluye células vegetales, protoplastos de plantas, cultivos de tejidos de células vegetales de los cuales se pueden regenerar las plantas, callos de la planta, matas de plantas y células vegetales intactas en las plantas o partes de las plantas tales como embriones, polen, óvulos, semillas, hojas, flores, ramas, frutos, semillas, espigas, mazorcas, cáscaras, tallos, raíces, nervaduras, anteras, y similares. Grano hace referencia a la semilla madura producida por los agricultores comerciales

con fines distintos al cultivo y cruza de las especies. La progenie, variantes y mutantes de las plantas regeneradas también están incluidas dentro del alcance de la invención, siempre que esas partes comprendan los polinucleótidos introducidos.

El agente de biocontrol modificado puede ser empleado con cualquier tipo de planta, que incluyen, entre otras, monocotiledóneas y dicotiledóneas. Los ejemplos de especies de plantas de interés incluyen, entre otros, maíz (*Zea mays*), *Brassica* sp. (*por ejemplo*, *B. napus, B. rapa, B. juncea*), particularmente aquellas especies *Brassica* de utilidad como fuentes de aceite de semilla, alfalfa (*Medicago sativa*), arroz (*Oryza sativa*), centeno (*Secale cereale*), sorgo (*Sorghum bicolor, Sorghum vulgare*), mijo (por ejemplo, mijo perlado (*Pennisetum glaucum*), mijo proso (*Panicum miliaceum*), mijo cola de zorro (*Setaria italica*), mijo africano (*Eleusine coracana*)), girasol (*Helianthus annuus*), azafrán (*Carthamus tinctorius*), trigo (*Triticum aestivum*), soja (*Glycine max*), tabaco (*Nicotiana tabacum*), papa (*Solanum tuberosum*), maní (*Arachis hypogaea*), algodón (*Gossypium barbadense*, *Gossypium hirsutum*), batata (*Ipomoea batatus*), mandioca (*Manihot esculenta*), café (*Coffea* spp.), coco (*Cocos nucifera*), ananá (*Ananas comosus*), árboles cítricos (*Citrus* spp.), cacao (*Theobroma cacao*), té (*Camellia sinensis*), banana (*Musa* spp.), palta (*Persea americana*), higo (*Ficus casica*), guayaba (*Psidium guajava*), mango (*Mangifera indica*), olivo (*Olea europaea*), papaya (*Carica papaya*), castaña (*Anacardium occidentale*), macadamia (*Macadamia integrifolia*), almendra (*Prunus amygdalus*), remolachas azucareras (*Beta vulgaris*), caña de azúcar (*Saccharum* spp.), avenas, cebada, verduras, ornamentales, y coníferas.

Las verduras incluyen tomates (*Lycopersicon esculentum*), lechuga (por ej., *Lactuca sativa*), judías verdes (*Phaseolus vulgaris*), chauchas (*Phaseolus limensis*), arvejas (*Lathyrus* spp.), y miembros del género *Cucumis* tales como pepino (*C. sativus*), cantalope (*C. cantalupensis*), y melón almizcleño (*C. melo*).

Las plantas ornamentales incluyen azalea (*Rhododendron* spp.), hortensia (*Macrophylla hydrangea*), hibisco (*Hibiscus rosasanensis*), rosas (*Rosa* spp.), tulipanes (*Tulipa* spp.), narcisos (*Narcissus* spp.), petunias (*Petunia hybrida*),

claveles (*Dianthus caryophyllus*), flor de Pascua (*Euphorbia pulcherrima*), y crisantemo.

Las coníferas que pueden emplearse incluyen, por ejemplo, pinos tales como pino taeda (*Pinus taeda*), pino de incienso (*Pinus elliotii*), pino ponderoso (*Pinus ponderosa*), pino poste-huésped (*Pinus contorta*), y pino Monterrey (*Pinus radiata*); abeto douglas (*Pseudotsuga menziesii*); tsuga del pacífico (*Tsuga canadensis*); picea de sitka (*Picea glauca*); secoya (*Sequoia sempervirens*); abetos reales como abeto blanco (*Abies amabilis*) y abeto balsámico (*Abies balsamea*); y cedros tales como tuya gigante (*Thuja plicata*) y ciprés amarillo (C*hamaecyparis nootkatensis*). En ciertas realizaciones, las plantas de la presente invención son cultivos (por ejemplo, maíz, alfalfa, girasol, *Brassica*, soja, algodón, azafrán, maní, sorgo, trigo, mijo, tabaco, etc.). En otras realizaciones, se emplean plantas de maíz o soja

Los siguientes ejemplos tienen carácter ilustrativo y no pretenden limitar el alcance del invento.

EXPERIMENTAL

Ejemplo 1: Producción de mutantes resistentes al glifosato de AIP0069.

Introducción

Los agentes biológicos están siendo utilizados en la agricultura para reducir el riesgo y mejorar el rendimiento. Una característica importante de estos agentes biológicos es que deben ser compatibles con los productos químicos que también se pueden aplicar en la práctica de la agricultura comercial. El glifosato es un herbicida químico que representa aproximadamente el 25% del mercado global de herbicidas y que se aplica a una tasa aproximada de 200 millones de libras por año. Este herbicida inhibe la enzima, 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato (EPSP) sintasa (EPSPS) que cataliza una etapa en la biosíntesis de aminoácidos aromáticos en las plantas y muchas bacterias. El glifosato reduce la viabilidad de organismos incluso los agentes de biocontrol a base de EPSPS, se ha reportado que altera la comunidad microbiana de la planta. Este reporte describe la introducción exitosa de tolerancia al glifosato en una cepa de *Pseudomonas fluorescens* usada en el control biológico de varios patógenos de plantas fungales

importantes, que incluyen Pythium y Rhizoctonia, los agentes causales del complejo de enfermedades agrícolamente importantes “Marchitamiento Fúngico”. Además de mejorar la compatibilidad química de este agente de biocontrol, la introducción de resistencia al glifosato ofrece beneficios adicionales en la producción comercial.

Además del ejemplo de glifosato provisto en la presente, otros químicos agrícolas pueden inhibir el crecimiento de bacterias de estimulación de control biológico o crecimiento de la planta. Los ejemplos incluyen los herbicidas de glufosinato (inhibidor de glutamina sintasa), herbicidas de sulfonilurea e imidazolinona (inhibidores de la síntesis de aminoácidos de cadena ramificada) y los antibióticos estreptomicina, oxitetraciclina y kasugamicina.

Materiales y Métodos y Resultados

La cepa de control biológico *Pseudomonas fluorescens* AIP0069 se sembró en placas de agar conteniendo 0 o 5 mM de glifosato. El medio basal estaba compuesto por 11.3 g $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$, 3 g KH_2PO_4, 1 g NH_4Cl, 10 g monosodio glutamato, 31 g molasas, 493 mg $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 50 mg $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 5 mg $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, y 0.3 g tiamina por litro de agua desionizada. En ausencia de glifosato numerosas colonias bacterianas fueron visibles luego de incubar durante una noche a 25C. En presencia de 5 mM glifosato no se observaron colonias luego de una incubación similar, sin embargo, luego de una incubación prolongada de varios días se observaron unas pocas colonias. Estas colonias fueron aisladas y se desarrollaron en medio líquido a múltiples concentraciones de glifosato. Un aislado, denominado GlyphR1, fue diez veces más resistente al glifosato que la cepa madre AIP0069 (Figura 1). Se espera que esta cepa mejorada sea más competitiva y así más efectiva como biocontrol, que AIP0069 o cepas sensibles al glifosato similares en los sistemas agrícolas donde el glifosato está presente en el suelo y los cultivos. Además, el glifosato puede ser utilizado como un agente selector durante la producción, formulación y/o almacenamiento de esta cepa con el fin de impedir la contaminación con otras bacterias.

Ejemplo 2: Actividad de control biológico de mutantes resistentes al glifosato.

Las bacterias fueron inoculadas en 50 ml de medio de caldo compuesto de 11.3 g $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$, 3 g KH_2PO_4, 1 g NH_4Cl, 10 g Monosodio glutamato, 30 g molasas, 493 mg $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 50 mg $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, y 5 mg $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ por litro de agua desionizada. Los cultivos se cultivaron en 250 ml frascos divididos en una incubadora con agitación a 28C, 250 rpm durante 2 días. Las células fueron colectadas por centrifugación a 3500 xg durante 10 minutos. Los supernatantes del cultivo fueron descartados y las células fueron resuspendidas en agua desionizada estéril a los volúmenes de los cultivos originales. AIP0323, un mutante de AIP0069 que no posee actividad antifungal, fue incluido como control negativo.

Arroz *Rhizoctonia solani* infectado fue producido según lo descripto previamente (K.A. Holmes and D.M. Benson, 1994. *Evaluation of Phytophthora parasitica var. nicotianae as a biocontrol for Phytophthora parasitica on Catharanthus roseus*. Plant Disease 78:193-199.) El arroz infectado fue pulverizado en un mezclador y pasado por una malla #10 (orificio de 2 mm). El grano pulverizado fue mezclado con medio de germinación a una tasa de 2 g por litro.

Se plantaron semillas de impatiens en el medio de germinación infectado en bandejas de germinación tamaño 402, se trataron con 0.3 ml de bacterias resuspendidas por bandeja y se cultivaron bajo condiciones de producción de invernadero estándar. Hubo 2 réplicas por cada tratamiento experimental con 20 bandejas por réplica. El número de plántulas sanas fue determinado luego de dos semanas. Los datos indicados a continuación en la Tabla 1 demuestran que las variantes resistentes al glifosato AIP0404 retienen toda la actividad antifungal, con respecto a la cepa progenitora, AIP0069.

Tabla 1

Tratamiento	% de plántulas sanas		
	Réplica 1	Réplica 2	Promedio
Control no inoculado	90	90	90
Control inoculado	15	20	17.5
Inoculado + AIP0069	75	80	77.5

Inoculado + AIP0323	10	15	12.5
Inoculado + AIP0404	75	80	77.5

La cepa de biocontrol puede ser utilizada para controlar *Fusariosis de la espiga*, Roya de la soja asiática, *Rhizoctonia*, *Botrytis*, *Pythium*, enfermedades del césped, y similares.

Ejemplo 3:

Los genes que codifican enzimas EPSPS tolerantes al glifosato pueden ser obtenidos de varias bacterias (A. Schulz et al, 1985. Differential sensitivity of bacterial 5-enolpyruvylshikimate-3-fosfato synthases to the herbicide glifosate. FEMS Microbiology Letters, 28:297-301). En particular, los genes de EPSPS de *Agrobacterium tumefaciens* CP4 (G.F. Barry et al, 1992. Inhibitors of amino acid biosynthesis: Strategies for imparting glyphosate tolerance to crop plants. p. 139–145. *In* B.K. Singh et al. (e.) Biosynthesis and molecular regulation of amino acids in plants. Am. Soc. Plant Physiologists, Rockville, MD), y *Arthrobacter globiformis* (C.L. Peters et al, 2010, GRG23 and GRG51 genes conferring herbicide resistance. Patente Estadounidense 7,674,958), son altamente resistentes.

Un gen adecuado es amplificado por PCR o se prepara sintéticamente usando técnicas muy conocidas en el arte. El marco de lectura abierto es clonado en el vector de plásmido pKK223-3 (Pharmacia) entre el promotor *tac*I y el terminado transcripcional *rrn*B. El promotor *tacI* provee una fuerte expresión constitutiva de genes en *Pseudomonas*. Las secuencias de ADN genómico de la cepa AIP0069 se incorporan a cada lado del promotor – gen – cassette terminador para dirigir la recombinación homóloga en el cromosoma AIP0069.

El plásmido resultante es movilizado de E. coli a *Pseudomonas fluorescens* AIP0069 por conjugación, una técnica muy conocida en el arte, y selección en un medio definido conteniendo 100 mM glifosato. El plásmido contiene el origen de replicación colE1 de rango de huésped estrecho y por ello no puede replicarse en *Pseudomonas*. Las colonias resistentes a glifosato

serán obtenidas cuando el promotor - gen - cassette terminador se integra en el cromosoma de *Pseudomonas* por recombinación homóloga. Eventos individuales de cruza (donde todo el plásmido se integra al cromosoma) se distinguen de los eventos de cruza dobles (donde solamente el promotor – gen-cassette terminador deseado se integra) por PCR, Southern blot, u otras técnicas muy conocidas en el arte.