



**República Federativa do Brasil**

Ministério do Desenvolvimento, Indústria,  
Comércio e Serviços

Instituto Nacional da Propriedade Industrial

**(11) BR 122022010122-4 B1**

**(22) Data do Depósito:** 29/01/2015

**(45) Data de Concessão:** 16/05/2023

**(54) Título:** COMPOSIÇÃO, USO DA COMPOSIÇÃO, MÉTODO PARA CONTROLAR UM PATÓGENO VEGETAL, FORMULAÇÃO PARA O CONTROLE DE UM PATÓGENO VEGETAL, USO DA FORMULAÇÃO, MÉTODO PARA CULTIVAR UMA PLANTA E USO DE UM AGENTE DE CONTROLE BIOLÓGICO NRRL Nº B-50897

**(51) Int.Cl.:** A01N 63/00; A01N 57/20; A01P 3/00; C12N 1/00; C12N 1/20.

**(30) Prioridade Unionista:** 16/01/2015 US 62/104,122; 31/01/2014 US 61/933,954.

**(73) Titular(es):** AGBIOME, INC..

**(72) Inventor(es):** JANICE C. JONES; MICHAEL G. KOZIEL; SCOTT JOSEPH UKNES; AMY ELIZABETH SHEKITA.

**(86) Pedido PCT:** PCT US2015013564 de 29/01/2015

**(87) Publicação PCT:** WO 2015/116838 de 06/08/2015

**(85) Data do Início da Fase Nacional:** 24/05/2022

**(62) Pedido Original do Dividido:** BR112016017858-0 - 29/01/2015

**(57) Resumo:** São fornecidos métodos que melhoram a capacidade de uma população de agentes biológicos para competir e sobreviver em um ambiente de campo. Ao melhorar a população de agentes biológicos, a população de agentes modificada é capaz de crescer, competir com outras cepas microbianas e fúngicas, bem como proporcionar uma proteção às plantas contra patógenos. Em particular, são selecionados ou manipulados agentes biológicos modificados e populações modificadas desses agentes que apresentem tolerância ou resistência a herbicidas. Dessa maneira, reforça-se a proteção dos cultivos contra agentes ou pragas causadores de doenças. As populações modificadas de agentes biológicos podem ser adicionadas aos solos para evitar patógenos fúngicos e as doenças que eles causam, estimulando o crescimento das plantas. Portanto, a presente invenção é útil para aumentar a competitividade de agentes biológicos modificados, particularmente em relação a outros agentes microbianos que não são resistentes a herbicidas. As composições da invenção incluem agentes biológicos selecionados ou manipulados, bem como populações modificadas de agentes de biocontrole. Os agentes biológicos modificados podem ser utilizados como um inoculante ou como um revestimento de sementes para plantas e sementes.

**"COMPOSIÇÃO, USO DA COMPOSIÇÃO, MÉTODO PARA CONTROLAR UM PATÓGENO VEGETAL, FORMULAÇÃO PARA O CONTROLE DE UM PATÓGENO VEGETAL, USO DA FORMULAÇÃO, MÉTODO PARA CULTIVAR UMA PLANTA E USO DE UM AGENTE DE CONTROLE BIOLÓGICO NRRL N° B-50897"**

O presente pedido é um pedido de patente divisional do pedido de patente BR 11 2016 017858 0, depositado em 29 de janeiro de 2015.

#### **REFERÊNCIA CRUZADA A PEDIDOS RELACIONADOS**

[0001] Este pedido reivindica o benefício do Pedido Provisório dos EUA de n° de série 61/933.954, depositado em 31 de janeiro de 2014, bem como o do Pedido Provisório dos EUA de n° de série 62/104.122, depositado em 16 de janeiro de 2015. Os conteúdos de ambos os pedidos são aqui incorporados por referência em sua totalidade.

#### **CAMPO DA INVENÇÃO**

[0002] A invenção se refere a agentes e populações de biocontrole modificados que possuem propriedades melhoradas.

#### **ANTECEDENTES**

[0003] Doenças e pragas vegetais precisam ser controladas para preservar a qualidade e a quantidade dos alimentos, rações e fibras cultivados por produtores de todo o mundo. As doenças vegetais são causadas principalmente por fungos, bactérias, vírus e nemátodos. As pragas vegetais, por outro lado, são insetos mastigadores, sugadores e perfuradores das ordens Lepidoptera, Coleoptera, Hemiptera, entre outras. Os pesticidas químicos são amplamente utilizados na agricultura para proteger os cultivos de pragas e doenças. Esses produtos químicos combatem pragas, doenças e ervas daninhas dos cultivos, resultando em um melhor rendimento. Sem a proteção dos cultivos e o controle de

pragas, a produção de alimentos e a qualidade dos alimentos produzidos decairia. No entanto, o uso de pesticidas químicos representa certo risco, já que muitos possuem propriedades que podem pôr em perigo a saúde e o meio ambiente se não forem usados corretamente.

[0004] Um dos problemas associados ao uso contínuo de pesticidas, herbicidas ou de outros produtos químicos para a proteção dos cultivos é o desenvolvimento de resistência ao agente de controle. A resistência aos pesticidas se refere à diminuição da suscetibilidade de uma população de pragas em relação a um agente de controle em doses que alguma vez mataram a maioria dos indivíduos da espécie. Portanto, são necessários novos produtos que possuam diferentes modos de ação para auxiliar na gestão da resistência.

[0005] Sabe-se há já bastante tempo que os micro-organismos podem agir como antagonistas naturais de vários patógenos e pragas vegetais. As interações entre plantas hospedeiras e microorganismos que levam ao biocontrole são a antibiose, a competitividade, a indução da resistência do hospedeiro e a predação. Rastreios e ensaios isolados produziram vários candidatos para a comercialização. Os biopesticidas microbianos representam uma opção importante para a gestão de doenças e pragas vegetais. Existe uma demanda por agentes de controle biológico que sejam capazes de competir em condições de campo, particularmente na presença de herbicidas e fungicidas que são comumente utilizados na agricultura comercial e que podem ter efeitos antibióticos sobre os micro-organismos.

## **RESUMO**

[0006] São fornecidas composições e métodos que melhoram a capacidade de uma população de agentes biológicos ou agentes de biocontrole para competir e sobreviver em um ambiente de

campo. Ao melhorar a população de agentes biológicos, a população de agentes modificada é capaz de crescer, competir com outras cepas microbianas e fúngicas, bem como proporcionar uma proteção às plantas contra agentes patógenos. Além disso, os agentes de controle biológico modificados estimulam o crescimento e o rendimento das plantas. Em particular, foram selecionados ou manipulados agentes biológicos modificados e populações modificadas desses agentes que apresentassem tolerância ou resistência a biocidas; tolerância ou resistência a herbicidas; tolerância ou resistência a fungicidas; tolerância ou resistência a pesticidas; ou tolerância ou resistência a produtos químicos para a proteção de cultivos. Dessa maneira, reforça-se a proteção dos cultivos contra agentes ou pragas causadores de doenças.

[0007] Os agentes biológicos modificados são capazes de crescer na presença de pelo menos um herbicida, fungicida, pesticida ou de outros produtos químicos para a proteção de cultivos utilizados na agricultura comercial. Esses agentes biológicos modificados são capazes de crescer e de se reproduzir em solos onde os herbicidas, fungicidas, pesticidas ou outros produtos químicos para a proteção de cultivos tenham sido aplicados. Os agentes biológicos modificados tornam os solos supressivos ou resistentes aos patógenos ou pragas que causam doenças. As populações modificadas de agentes biológicos podem ser adicionadas aos solos para evitar patógenos fúngicos e as doenças que eles causam, ou ainda para inibir a alimentação por insetos que sejam pragas ou nemátodos, estimulando o crescimento das plantas e aumentando o rendimento dos cultivos. Portanto, a presente invenção é útil para aumentar a competitividade de agentes biológicos modificados, particularmente em relação a outros agentes microbianos que não são resistentes a herbicidas,

fungicidas, pesticidas ou a outros produtos químicos para a proteção dos cultivos. Por conseguinte, as composições da invenção incluem agentes biológicos selecionados ou manipulados, bem como populações modificadas de agentes de biocontrole. Os agentes biológicos modificados podem ser utilizados como um inoculante ou como um revestimento de sementes para plantas e sementes. Eles também podem ser aplicados em forma de pulverização diretamente sobre as partes aéreas das plantas, ou podem, ainda, ser misturados com o herbicida ou com outro produto químico aos quais tenham se tornado tolerantes como resultado de uma modificação. Tal como indicado, a presença dos agentes biológicos modificados sob condições de campo aumenta a resistência das plantas aos patógenos e estimula o crescimento da planta. Os agentes biológicos modificados da invenção podem ser utilizados com outros agentes para estimular o crescimento e o rendimento das plantas.

[0008] As configurações da invenção incluem:

[0009] 1. Um método para melhorar um agente de biocontrole, o qual consiste em modificar o referido agente de biocontrole de modo que ele se torne resistente a pelo menos um herbicida, fungicida, pesticida ou outro produto químico para a proteção de cultivos.

[0010] 2. O método da configuração 1, em que o referido agente de biocontrole é modificado ao ser cultivado na presença de um herbicida, fungicida, pesticida ou outro produto químico para a proteção de cultivos, de modo a selecionar uma cepa resistente.

[0011] 3. O método da configuração 1, em que o referido agente de biocontrole é modificado ao transformar o referido agente de biocontrole com um gene que confere resistência ao

referido herbicida, fungicida, pesticida ou outro produto químico para a proteção de cultivos.

[0012] 4. O método de qualquer uma das configurações 1 a 3, em que o referido agente de biocontrole é um agente de biocontrole bacteriano.

[0013] 5. O método de qualquer uma das configurações 1 a 3, em que o referido agente de biocontrole é selecionado do grupo composto pelos gêneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Agrobacterium*, *Lysobacter*, *Trichoderma*, *Paecilomyces*, *Gliocladium*, *Ampelomyces*, *Pythium*, *Metschnikowia*, *Chromobacterium*, *Penicillium*, *Coniothyrium*, *Chaetomium*, *Myrothecium*, *Aureobasidium*, *Pantoea*, *Burkholderia*, *Streptomyces*, *Variovorax*, *Pasteuria*, *Lactobacillus*, *Paenibacillus* e *Xanthomonas*.

[0014] 6. O método da configuração 5, em que o referido agente de biocontrole bacteriano é uma bactéria *Pseudomonas*.

[0015] 7. O método da configuração 6, em que a referida *Pseudomonas* é *Pseudomonas fluorescens* ou *Pseudomonas chlororaphis*.

[0016] 8. O método de qualquer uma das configurações 1 a 7, em que o herbicida é selecionado do grupo composto por glifosato, glufosinato (inibidor da glutamina sintase), herbicidas de sulfonilureia e de imidazolinona (inibidores da síntese de aminoácidos de cadeia ramificada).

[0017] 9. Um agente de biocontrole modificado, em que o referido agente de biocontrole foi selecionado sob a pressão de um herbicida, fungicida, pesticida ou outro produto químico para a proteção de cultivos e possui resistência ao referido herbicida, fungicida, pesticida ou outro produto químico para a proteção de cultivos.

[0018] 10. O agente de biocontrole modificado da configuração 9, em que o referido agente de biocontrole modificado é um agente de biocontrole bacteriano.

[0019] 11. O agente de biocontrole modificado da configuração 9, em que o referido agente de biocontrole é selecionado do grupo composto pelos gêneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Agrobacterium*, *Lysobacter*, *Trichoderma*, *Paecilomyces*, *Gliocladium*, *Ampelomyces*, *Pythium*, *Metschnikowia*, *Chromobacterium*, *Penicillium*, *Coniothyrium*, *Chaetomium*, *Myrothecium*, *Aureobasidium*, *Pantoea*, *Burkholderia*, *Streptomyces*, *Variovorax*, *Pasteuria* e *Xanthomonas*.

[0020] 12. O agente de biocontrole modificado da configuração 10, em que o referido agente de biocontrole bacteriano é uma bactéria *Pseudomonas*.

[0021] 13. O agente de biocontrole modificado da configuração 12, em que a referida *Pseudomonas* é *Pseudomonas fluorescens* ou *Pseudomonas chlororaphis*.

[0022] 14. O agente de biocontrole modificado de qualquer uma das configurações 9 a 13, em que o referido herbicida é selecionado do grupo composto por glifosato, glufosinato (inibidor da glutamina sintase), herbicidas de sulfonilureia e de imidazolinona (inibidores da síntese de aminoácidos de cadeia ramificada).

[0023] 15. Um agente de biocontrole recombinante, em que o referido agente de biocontrole foi transformado com um gene de resistência a herbicidas que torna o agente de biocontrole resistente a herbicidas.

[0024] 16. O agente de biocontrole recombinante da configuração 15, em que o referido agente de biocontrole modificado é um agente de biocontrole bacteriano.

[0025] 17. O agente de biocontrole recombinante da configuração 16, em que o referido agente de biocontrole bacteriano é selecionado do grupo composto pelos gêneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Agrobacterium*, *Lysobacter*, *Gliocladium*, *Pythium*, *Chromobacterium*, *Penicillium*, *Pantoea*, *Burkholderia*, *Streptomyces*, *Variovorax*, *Pasteuria* e *Xanthomonas*.

[0026] 18. O agente de biocontrole recombinante da configuração 17, em que o referido agente de biocontrole bacteriano é uma bactéria *Pseudomonas*.

[0027] 19. O agente de biocontrole recombinante da configuração

18, em que a referida *Pseudomonas* é *Pseudomonas fluorescens* ou *Pseudomonas chlororaphis*.

[0028] 20. O agente de biocontrole recombinante de qualquer uma das configurações 15 a 19, em que o referido herbicida é selecionado do grupo composto por glifosato, glufosinato (inibidor da glutamina sintase), herbicidas de sulfonilureia e de imidazolinona (inibidores da síntese de aminoácidos de cadeia ramificada).

[0029] 21. Uma população modificada de agentes de biocontrole, em que a população compreende substancialmente o agente de biocontrole de qualquer uma das configurações 1 a 20.

[0030] 22. Uma formulação para controlar um patógeno vegetal, em que a referida formulação compreende uma população modificada de agentes de biocontrole, os quais são resistentes a herbicidas, e um transportador adequado.

[0031] 23. A formulação da configuração 22, em que a referida população compreende agentes de biocontrole bacterianos modificados.



[0032] 24. A formulação da configuração 22, em que a referida população compreende agentes de biocontrole recombinantes.

[0033] 25. A formulação de qualquer uma das configurações 22 a 24, em que o referido agente de biocontrole está presente em uma quantidade eficaz suficiente para melhorar a saúde, o crescimento ou o rendimento da planta na presença de uma taxa de aplicação em campo agrícola de um biocida.

[0034] 26. A formulação da configuração 25, em que o agente de biocontrole compreende a cepa depositada como NRRL n° B-50897 e o biocida é o glifosato.

[0035] 27. A formulação da configuração 25, em que o agente de biocontrole compreende a cepa AIP050999 depositada como NRRL n° B50999 e o biocida é o glufosinato.

[0036] 28. Um método para melhorar a capacidade de um agente de biocontrole para competir em um ambiente de campo, em que o referido método compreende modificar o referido agente biológico de tal modo que o referido agente de biocontrole modificado seja capaz de crescer na presença de um herbicida.

[0037] 29. Um método para estimular o crescimento das plantas, o qual consiste em aplicar uma composição que compreende uma população modificada de agentes de biocontrole ao solo no qual a referida planta está sendo cultivada.

[0038] 30. O método da configuração 29, em que os referidos agentes de biocontrole foram modificados para desenvolver resistência ao glifosato ou ao glufosinato.

[0039] 31. Um método para cultivar uma planta que consiste em aplicar a um cultivo, uma semente ou uma área de cultivo uma combinação de uma quantidade eficaz de um biocida e uma quantidade eficaz de um agente de biocontrole modificado, considerando que:

(a) a quantidade eficaz do biocida permite controlar seletivamente um organismo de interesse, sem danificar o cultivo de forma significativa; e,

(b) a quantidade eficaz do agente de biocontrole modificado é suficiente para provocar um aumento estatisticamente significativo da saúde, do rendimento e/ou do crescimento da planta, em comparação com a saúde, o rendimento e/ou o crescimento que ocorrem quando a mesma concentração de um agente de biocontrole não modificado é aplicada em combinação com a quantidade eficaz do biocida.

[0040] 32. O método da configuração 31, em que o agente de biocontrole modificado e o biocida são aplicados simultaneamente.

[0041] 33. O método da configuração 32, em que o agente de biocontrole modificado e o biocida são aplicados sequencialmente.

[0042] 34. O método de qualquer uma das configurações 31 a 33, em que o referido agente de biocontrole compreende a cepa depositada como NRRL n° B-50897.

[0043] 35. O método da configuração 34, em que o biocida é o glifosato, e em que a quantidade eficaz de glifosato permite controlar seletivamente as ervas daninhas sem danificar o cultivo de forma significativa.

[0044] 36. O método de qualquer uma das configurações 31 a 33, em que o referido agente de biocontrole compreende a cepa AIP050999 depositada como NRRL n° B-50999 e o biocida é o glufosinato.

[0045] 37. O método da configuração 36, em que o biocida é o glufosinato, e em que a quantidade eficaz de glufosinato permite controlar seletivamente as ervas daninhas sem danificar o cultivo de forma significativa.

[0046] 38. Uma população cultivada de um agente de biocontrole, em que a referida população cultivada é produzida ao plantar uma população de agentes sob a pressão de um herbicida, fungicida, pesticida ou outro produto químico para a proteção de cultivos, a fim de selecionar um cultivo purificado de agentes de biocontrole com resistência ao referido herbicida, fungicida, pesticida ou outro produto químico para a proteção de cultivos.

[0047] 39. A população cultivada do agente de biocontrole da configuração 38, em que o referido agente de biocontrole está presente em uma quantidade eficaz suficiente para melhorar a saúde, o crescimento ou o rendimento da planta na presença de uma taxa de aplicação em campo agrícola de um biocida.

[0048] 40. Um cultivo isolado e biologicamente puro de um agente de biocontrole, em que o agente de biocontrole é resistente a um biocida selecionado dentre um herbicida, um fungicida, um pesticida ou um produto químico para a proteção de cultivos, em que o referido cultivo é produzido ao ser plantado na presença do referido biocida.

[0049] 41. O cultivo isolado e biologicamente puro do agente de biocontrole da configuração 40, em que o referido agente de biocontrole está presente em uma quantidade eficaz suficiente para melhorar a saúde, o crescimento ou o rendimento da planta na presença de uma taxa de aplicação em campo agrícola de um biocida.

[0050] 42. O método da configuração 38, em que a referida composição compreende um transportador adequado.

[0051] 43. Um cultivo bacteriano derivado da cepa depositada como NRRL nº B-50897, em que o referido cultivo bacteriano possui atividade antifúngica e é capaz de crescer na presença de glifosato.

[0052] 44. O cultivo bacteriano da reivindicação 43, em que a cepa depositada como NRRL nº B-50897 está presente em uma quantidade eficaz suficiente para melhorar a saúde, o crescimento ou o rendimento da planta na presença de uma taxa de aplicação em campo agrícola de glifosato.

[0053] 45. Um cultivo bacteriano derivado da cepa AIP050999 depositada como NRRL nº B-50999, em que o referido cultivo bacteriano possui atividade antifúngica e é capaz de crescer na presença de glufosinato.

[0054] 46. O cultivo bacteriano da reivindicação 45, em que a cepa AIP050999 depositada como NRRL nº B-50999 está presente em uma quantidade eficaz suficiente para melhorar a saúde, o crescimento ou o rendimento da planta na presença de uma taxa de aplicação em campo agrícola de glufosinato.

#### **BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS**

[0055] A Figura 1 apresenta uma curva de crescimento das diversas cepas na presença de glifosato.

#### **DESCRIÇÃO DETALHADA**

[0056] São fornecidas composições e métodos para melhorar agentes de controle biológico. Agente biológico, agente de controle biológico ou agente de biocontrole são termos empregues na presente invenção para descrever um micro-organismo que é utilizado para controlar patógenos e pragas causadores de doenças nas plantas. Os agentes de controle biológico da invenção foram modificados de tal modo que se tornaram capazes de crescer na presença de pelo menos um biocida. Um biocida é uma substância que pode exercer um efeito de controle sobre um organismo por meios químicos ou biológicos. Exemplos de biocidas são pesticidas, tais como fungicidas, herbicidas, inseticidas, outros produtos químicos para a proteção de cultivos e similares. As composições da invenção incluem um ou mais agentes de

biocontrole isolados que tenham sido selecionados pela sua resistência a biocidas, tais como herbicidas, fungicidas, pesticidas ou outros produtos químicos para a proteção de cultivos; um agente de biocontrole recombinante que tenha sido transformado para conter um gene resistente a herbicidas, fungicidas, pesticidas ou outros produtos químicos para a proteção de cultivos; uma população modificada de agentes de biocontrole, em que a população é resistente a pelo menos um herbicida, fungicida, pesticida ou outro produto químico para a proteção de cultivos; além de composições contendo essas populações modificadas de agentes de biocontrole. A população modificada pode conter micro-organismos que tenham sido selecionados por sua resistência a herbicidas, fungicidas, pesticidas ou outros produtos químicos para a proteção de cultivos, ou que tenham sido transformados com um gene que confere resistência ou tolerância a tais herbicidas, fungicidas, pesticidas ou outros produtos químicos para a proteção de cultivos. Assim, a invenção compreende cultivos substancialmente puros, ou cultivos biologicamente puros, dos referidos agentes de biocontrole modificados ou agentes biológicos modificados. Um "cultivo bacteriano biologicamente puro" se refere a um cultivo de bactérias que não contenha outras espécies bacterianas em quantidades que possam ser detectadas por técnicas bacteriológicas normais. Dito de outra maneira, trata-se de um cultivo no qual praticamente todas as células bacterianas presentes são da cepa selecionada. Um agente de biocontrole modificado inclui agentes de biocontrole que tenham adquirido uma característica devido à pressão de seleção, bem como agentes de biocontrole recombinantes que tenham sido transformados com um gene que confere resistência ou tolerância a, pelo menos, um

herbicida, fungicida, pesticida ou outro produto químico para a proteção de cultivos.

[0057] A invenção abrange, ainda, um agente de biocontrole modificado particular. Esse agente inclui AIP1620. A AIP1620 é uma cepa de *Pseudomonas* que foi selecionada por apresentar tolerância ao glifosato. Agentes adicionais incluem AIP050999. A AIP050999 é uma cepa de *Pseudomonas* que foi selecionada por apresentar tolerância ao glufosinato.

[0058] A AIP1620 foi depositada perante o Depósito de Patentes do Centro Nacional para Pesquisas de Utilização Agrícola, Serviço de Pesquisas Agrícolas, Departamento de Agricultura dos EUA, sito em 1815 North University Street, Peoria, Illinois, EUA (CEP 61604) em 31 de janeiro de 2014, sendo-lhe atribuído NRRL n° B-50897. A AIP050999 foi depositada perante o Depósito de Patentes do Centro Nacional para Pesquisas de Utilização Agrícola, Serviço de Pesquisas Agrícolas, Departamento de Agricultura dos EUA, sito em 1815 North University Street, Peoria, Illinois, EUA (CEP 61604) em 23 de janeiro de 2015, sendo-lhe atribuído NRRL n° B-50999. Cada um desses depósitos será mantido sob os termos do Tratado de Budapeste sobre o Reconhecimento Internacional do Depósito de Micro-organismos para fins de Procedimentos em Matéria de Patentes. O depósito foi realizado apenas como uma conveniência para os especialistas na matéria e não representam uma admissão de que seja necessário um depósito sob o 35 USC §112.

[0059] Por "tolerância a herbicidas, fungicidas, pesticidas ou outros produtos químicos para a proteção de cultivos ou resistência a herbicidas, fungicidas, pesticidas ou outros produtos químicos para a proteção de cultivos" entende-se a capacidade de um organismo (ou seja, de uma planta, agente de biocontrole, agente bacteriano de biocontrole, etc.) para

sobreviver e se reproduzir após ser exposto a uma dose de herbicida, fungicida, pesticida ou outro produto químico para a proteção de cultivos, considerando que essa dose é normalmente letal para o organismo de tipo selvagem.

[0060] Agentes biológicos ou agentes de biocontrole da invenção incluem micro-organismos e fungos que controlam patógenos vegetais causadores de doenças e estimulam a saúde, o crescimento e o rendimento da planta. Qualquer um desses agentes biológicos ou de biocontrole podem ser modificados por seleção ou transformação e, assim, produzir um agente biológico ou de biocontrole modificado ou um agente biológico ou de biocontrole recombinante. Portanto, a invenção abrange um agente de biocontrole modificado isolado. Os agentes de biocontrole modificados podem ser cultivados para produzir uma população de agentes de biocontrole. Por "população modificada de agentes biológicos ou de biocontrole" entende-se uma população de agentes que substancialmente compreende um cultivo do agente selecionado ou do agente recombinante que possui a característica de interesse, tais como resistência a um herbicida, fungicida, pesticida ou a outro produto químico para a proteção de cultivos. Por "substancialmente compreende" pretende-se indicar que a população foi cultivada e produzida a partir do agente de biocontrole modificado ou recombinante. Isto é, os agentes de biocontrole modificados ou recombinantes podem ser cultivados para produzir um cultivo biologicamente puro. Reconhece-se que esses cultivos biologicamente puros podem ser usados em conjunto para melhorar a saúde, o crescimento ou o rendimento da planta.

[0061] Qualquer agente biológico ou de biocontrole pode ser utilizado nos métodos da invenção. Micro-organismos de interesse particular incluem cepas das bactérias *Pseudomonas*,

*Bacillus*, *Agrobacterium*, *Lysobacter*, *Gliocladium*, *Pythium*, *Chromobacterium*, *Penicillium*, *Pantoea*, *Lactobacillus*, *Paenibacillus*, *Burkholderia*, *Streptomyces*, *Variovorax*, *Pasteuria*, *Xanthomonas*, etc. Fungos de interesse incluem *Aureobasidium*, *Ampelomyces*, *Beauveria*, *Metarhizium*, *Metschnikowia*, *Myrothecium*, *Lecanicillium*, *Chaetomium*, *Cordyceps*, *Coniothyrium*, *Dactylella*, *Gliocladium*, *Aspergillus*, *Paecilomyces*, *Trichoderma*, *Pisolithus*, *Glomus*, etc. Vide, por exemplo, Patente dos EUA nº 5.348.742, 5.496.547, 5.756.087, 5.955.348, 6.060.051, 6.635.425 e Publicação de Patente dos EUA 20130142759; todas as quais são aqui incorporadas por referência. Existem muitos agentes de biocontrole no mercado e qualquer um deles pode ser modificado de acordo com a presente invenção. Esses agentes incluem: *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 chlororaphis* MA 342; *B. amyloliquifaciens*; *Chromobacterium 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; e *A. pullulans* cepa DSM 14941. Outros produtos para o controle de doenças biológicas podem ser encontrados no seguinte endereço de internet (em inglês): [nevegetable.org/table-22biological-disease-control-products](http://nevegetable.org/table-22biological-disease-control-products).

[0062] Patógenos causadores de doenças incluem fungos, bactérias, vírus e nemátodos. Os agentes de biocontrole da invenção são aqueles que visam qualquer um dos patógenos vegetais. Os patógenos alvo incluem, mas não se limitam a, *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*, *Verticillium*, *Gnomonia*, *Fusicladium*, *Nectria*, *Phyllosticta*, *Diplocarpon*, *Albugo*, *Guignardia*, *Botrytis*, *Exobasidium*, *Entomosporium*, *Exobasidium*, *Pestalotia*, *Phoma*, *Cristulariella*, *Phakopsora*, *Thelaviopsis*, *Puccinia*, *Peronospora*, *Bremia*, *Pantoea* e *Clavibacter*.

[0063] A resistência a herbicidas, fungicidas, pesticidas ou outros produtos químicos para a proteção de cultivos é a capacidade de um organismo para sobreviver e se reproduzir após ser exposto a uma dose de herbicida, fungicida, pesticida ou outro produto químico para a proteção de cultivos que normalmente seria letal para o organismo de tipo de selvagem ou reduziria

consideravelmente o crescimento do organismo de tipo selvagem. A resistência pode ser induzida ou identificada por seleção ou pode ser induzida mediante engenharia genética. Para identificar e produzir uma população modificada de agentes de biocontrole mediante seleção, os agentes de biocontrole devem ser cultivados na presença do herbicida, fungicida, pesticida ou outro produto químico para a proteção de cultivos utilizado como pressão de seleção. Os agentes sensíveis perecem, ao passo que os agentes resistentes sobrevivem para se reproduzirem sem concorrência. Como os agentes de biocontrole são cultivados na presença do herbicida, fungicida, pesticida ou outro produto químico para a proteção de cultivos, os agentes de biocontrole resistentes se reproduzem com sucesso e se tornam dominantes na população, a qual se transforma em uma população modificada de agentes de biocontrole. Os métodos para selecionar cepas resistentes são conhecidos e se descrevem nas Patentes dos EUA nº 4.306.027 e 4.094.097, aqui incorporadas por referência. Portanto, a invenção inclui um cultivo biologicamente puro de uma cepa resistente de biocontrole. As cepas resistentes da invenção possuem as mesmas características de identificação do que a cepa sensível original, exceto pelo fato de que são consideravelmente mais tolerantes ao herbicida, fungicida, pesticida ou outro produto químico para a proteção de cultivos específico. Portanto, é possível identificá-las rapidamente mediante comparação com as características da cepa sensível conhecida.

[0064] Os herbicidas incluem glifosato, inibidores de ACCase (Arloxifenoxi propionato (FOPS)); inibidores de ALS (Sulfonilureia (SU)), Imidazonlinona (IMI), Pirimidinas (PM)); inibidor da proteína do microtúbulo (Dinitroanilina (DNA)); auxinas sintéticas (Fenoxi (P)), ácido benzoico (BA), ácido carboxílico (CA)); inibidor do fotossistema II (Triazina (TZ)),

Triazinona (TN), Nitrilos (NT), Benzotiadiazinonas (BZ), Ureias (US)); inibidor da EPSP sintase (Glicinas (GC)); inibidor da síntese de glutamina (Ácido Fosfínico (PA)); inibidor da DOXP sintase (Isoxazolidinona (IA)); inibidor de HPPD (Pirazola (PA)), Tricetonas (TE)); inibidores de PPO (Difenileter (DE), N-fenilftalimida (NP) (Ari Triazinona (AT)); inibidores de VLFA (Cloroacetamida (CA)), Oxiacetamida (OA)); inibidor do fotossistema I (Bipiridílios (BP)), entre outros.

[0065] Os pesticidas incluem clotianidina imidacloprida, compostos arilpirazola (WO2007103076); organofosfatos, fenil pirazola, piretoides caramoiloiximos, pirazolas, amidinas, hidrocarbonetos halogenados, carbamatos e seus derivados, terbufos, clorpirifos, fipronil, cloretoxifos, telfutrina, carbofurano, imidacloprida, tebupirimfos (5.849.320).

[0066] Os fungicidas incluem fungicidas de nitrogênio alifáticos (butilamina, cimoxanil, dodicina, dodina, guazatina, iminoctadina); fungicidas de amida (benzovindiflupir, carpropamida, cloraniformetano, ciflufenamida, diclocimet, dimoxistrobina, fenaminstrobina, fenoxanil, flumetover, furametpir, isofetamida, isopirasame, mandestrobin, mandipropamida, metominostrobina, orisastrobina, pentiopirade, procloraz, quinazamida, siltiofame, triforina); fungicidas de ácido acilamino (benalaxil, benalaxil-M, furalaxil, metalaxil, metalaxil-M, pefurazoato, valifenalato); fungicidas de anilida (benalaxil, benalaxil-M, bixafeno, boscalida, carboxia, fenehexamida, fluxapiroxade, isotianil, metalaxil, metalaxil-M, metsulfovax, ofurace, oxadixil, oxicarboxina, penflufen, piracarbolid, sedaxane, tipluzamida, tiadinil, vanguarda); fungicidas de benzanilida (benodanil, flutolanilo, mebenil, mepronilo, salicilanilida, tecloftalam); fungicidas de furanilida (fenfuram, furalaxilo, furcarbanil, metfuroxam);

fungicidas de sulfonanilida (flusulfamida); fungicidas de benzamida (ácido benzohidroxâmico, fluopicolida, fluopirame, tioximida, triclamida, zarilamida, zoxamida); fungicidas de furamida (ciclafuramida, furmeciclox); fungicidas de fenilsulfamida (diclofluanida, tolilfluanida); fungicidas de sulfonamida (amissulbroma, ciazofamida); fungicidas de valinamida (bentiavalicarbe, iprovalicarbe); fungicidas de antibióticos (aureofungina, blasticidina-S, ciclo-heximida, griseofulvina, casugamicina, moroxidina, natamicina, polioxinas, polioxorim, estreptomicina, validamicina); fungicidas de estrobilurina (fluoxastrobina, mandestrobina); fungicidas de metoxiacrilato estrobilurina (azoxistrobina, bifujunzi, coumoxistrobina, enoxastrobina, flufenoxistrobina, jiaxiangjunzi, picoxistrobina, piraoxistrobina); fungicidas de metoxicarbanilato estrobilurina (piraclostrobina, pirametostrobina, triclopiricarbe); fungicidas de metoximinoacetamida estrobilurina (dimoxistrobina, fenaminstrobina, metominostrobina, orisastrobina); fungicidas de metoximinoacetato estrobilurina (cresoxime-metilo, trifloxistrobina); fungicidas aromáticos (bifenilo, clorodinitronaftalenos, cloroneb, clorotalonil, cresol, diclorana, fenjuntong, hexaclorobenzeno, pentaclorofenol, quintozeno, pentaclorofenóxido de sódio, tecnazeno, triclorotrinitrobenzenos); fungicidas arsenicais (asomato, urbacida); fungicidas aril fenil cetonas (metrafenona, piriofenona); fungicidas de benzimidazol (albendazol, benomil, carbendazim, clorfenazol, cipendazol, debacarbe, fuberidazol, mecarbinzid, rabenzazol, tiabendazol); fungicidas precursores de benzimidazol (furofanato, tiofanato, tiofanato-metilo); fungicidas de benzotiazol (bentaluron, bentiavalicarbe, bentiazol, clobentiazonse, probenazol); fungicidas botânicos

(alicina, berberina, carvacrol, carvona, ostol, sanguinarina, santonina); fungicidas de difenil em ponte (bitionol, diclorofeno, difenilamina, hexaclorofeno, parinol); fungicidas de carbamato (bentiavalicarbe, furofanato, iodocarbe, iprovalicarbe, picarbutrazox, propamocarbe, piribencarbe, tiofanato, tiofanato-metilo, tolprocarbe); fungicidas de benzimidazolilcarbamato (albendazol, benomil, carbendazim, ipendazol, debacarbe, mecarbinzid); fungicidas de carbanilato (dietofencarbe, piraclostrobina, pirametostrobina, triclopiricarbe); fungicidas de conazol (imidazóis) (climbazol, clotrimazol, imazalilo, oxpoconazol, procloraz, triflumizol); fungicidas de conazol (triazóis) (azaconazol, bromuconazol, ciproconazol, diclobutrazol, difenoconazol, diniconazol, diniconazol-M, epoxiconazol, etaconazol, fenbuconazol, fluquinconazol, flusilazol, flutriafol, furconazol, furconazolcis, hexaconazol, imibenconazol, ipconazol, metconazol, miclobutanil, penconazol, propiconazol, protioconazol, quinconazol, simeconazol, tebuconazol, tetraconazol, triadimefon, triadimenol, triticonazol, uniconazol, uniconazol-P); fungicidas de cobre (acipetacs-cobre, mistura Bordeaux, mistura Burgundy, mistura Cheshunt, acetato de cobre, carbonato de cobre, básico, hidróxido de cobre, naftenato de cobre, oleato de cobre, oxicloreto de cobre, silicato de cobre, sulfato de cobre, básico, cromato de zinco-cobre, cufraneb, cuprobam, óxido cuproso, mancobre, oxinacobre, saisentong, tiodiazol-cobre); fungicidas de cianoacrilato (benzamacril, fenamacril); fungicidas de dicarboximida (famoxadona, fluoroimida); fungicidas de diclorofenil dicarboximida (clozolinato, diclozolina, iprodiona, isovalediona, miclozolina, procimidona, vinclozolina); fungicidas de ftalimida (captafol, captan, ditalimfos, folpete,

tioclorfenfim); fungicidas de dinitrofenol (binapacril, dinobuton, dinocape, dinocape-4, dinocape-6, meptildinocape, dinooctona, dinopentona, dinosulfona, dinoterbona, DNOC); fungicidas de ditiocarbamato (amobam, asomato, azitiram, carbamorfe, cufranebe, cuprobam, disulfiram, ferbam, metam, nabam, tecoram, tiram, urbacida, ziram); fungicidas de ditiocarbamato cíclico (dazomete, etem, milneb); fungicidas de ditiocarbamato polimérico (mancopper, mancozebe, manebe, metiram, policarbamato, propinebe, zinebe); fungicidas de ditiolano (isoprotiolano, saijunmao); fungicidas fumigantes (dissulfureto de carbono, cianogênio, ditioéter, brometo de metilo, iodeto de metilo, tetratiocarbonato de sódio); fungicidas de hidrazida (benquinox, saijunmao); fungicidas de imidazol (ciazofamida, fenamidona, fenapanil, gliodin, iprodiona, isovalediona, pefurazoato, triazoxida); fungicidas de conazol (imidazóis) (climbazol, clotrimazol, imazalil, oxpoconazol, procloraz, triflumizol); fungicidas inorgânicos (azida de potássio, tiocianato de potássio, azida de sódio, enxofre; vide também fungicidas de cobre; vide também fungicidas de mercúrio inorgânico); fungicidas de mercúrio; fungicidas de mercúrio inorgânico (cloreto mercúrico, óxido mercúrico, cloreto mercurioso); fungicidas de organomercúrio (brometo de (3etoxipropil)mercúrio, acetato de etilmercúrio, brometo de etilmercúrio, cloreto de etilmercúrio, etilmercúrio 2,3dihidroxipropil mercaptida, fosfato de etilmercúrio, N(etilmercúrio)-*p*-toluenossulfonanilida, hidrargafen, cloreto de 2metoxietilmercúrio, benzoato de metilmercúrio, dicianodiamida de metilmercúrio, pentaclorofenóxido de metilmercúrio, 8fenilmercurioxoquinolina, fenilmercuriureia, acetato de fenilmercúrio, cloreto de fenilmercúrio, derivado fenilmercúrio de pirocatecol, nitrato de fenilmercúrio,

salicilato de fenilmercúrio, tiomersal, acetato de tolilmercúrio); fungicidas de morfolina (aldimorfe, benzamorfe, carbamorfe, dimetomorfe, dodemorfe, fenpropimorfe, flumorfe, tridemorfe); fungicidas organofosforados (ampropilfos, ditalimfos, EBP, edifenfos, fosetil, hexiltiofos, inezin, iprobenfos, izopamfos, kejunlin, fosdifeno, pirazofos, tolclofos-metilo, triamifos); fungicidas de organotina (decafentina, fentina, óxido de tributiltina); fungicidas de oxatiina (carboxina, oxicarboxina); fungicidas de oxazol (clozolinato, diclozolina, drazoxolona, famoxadona, himexazol, metazoxolona, miclozolina, oxadixil, oxatiapiprolina, pirisoxazola, vinclozolina); fungicidas de polissulfeto (polissulfureto de bário, polissulfureto de cálcio, polissulfeto de potássio, polissulfeto de sódio); fungicidas de pirazol (benzovindiflupir, bixafeno, fenpirazamino, fluxapiroxade, furametpir, isopirasame, oxatiapiprolina, penflufen, pentiopirad, piraclostrobina, pirametostrobina, piraoxistrobina, rabenzazol, sedaxane); fungicidas de piridina (boscalida, butiobate, dipiritiona, fluazinam, fluopicolida, fluopirame, parinol, picarbutrazox, piribencarbe, piridinitril, pirifenox, pirisoxazol, piroxiclor, piroxifur, triclopiricarbe); fungicidas de pirimidina (bupirimato, diflumetorim, dimetirimol, etirimol, fenarimol, ferimzona, nuarimol, triarimol); fungicidas de anilinopirimidina (ciprodinil, mepanipirima, pirimetanil); fungicidas de pirrol (dimetaclona, fempiclonil, fludioxonil, fluoroimida); fungicidas de amônio quaternário (berberina, sanguinarina); fungicidas de quinolina (etoxiquina, halacrinato, sulfato de 8-hidroxiquinolina, quinacetol, quinoxifena, tebufloquin); fungicidas de quinona (cloranil, diclona, ditianona); fungicidas de quinoxalina (quinometionato, clorquinox, tioquinox);

fungicidas de tiadiazol (etridiazol, saisentong, tiodiazol-cobre, zinco tiazol); fungicidas de tiazol (etaboxam, isotianil, metsulfovax, octilinona, oxatiapiprolina, tiabendazol, tifluzamida); fungicidas de tiazolidina (flutianil, tiadifluor); fungicidas de tiocarbamato (metassulfocarbe, protiocarbe); fungicidas de tiofeno (etaboxam, isofetamida, siltiofame); fungicidas de triazina (anilazina); fungicidas de triazol (amisulbrom, bitertanol, fluotrimazol, triazbutil); fungicidas de conazol (triazóis) (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 triazolopirimidina (ametoctradina); fungicidas de ureia (bentaluron, pencicuron, quinazamida); fungicidas de zinco (acipetacs-zinco, cromato de cobre zinco, cufranebe, mancozebe, metirame, poliocarbamato, polioxorim-zinco, propinebe, naftenato de zinco, tiazol de zinco, triclorofenóxido de zinco, zineb, ziram); fungicidas não classificados (acibenzolar, acipetacs, álcool de alilo, cloreto de benzalcônio, betoxazina, bromotalonil, quitosano, cloropicrina, DBCP, ácido desidroacético, diclomezina, pirocarbonato de dietil, etilicina, fenaminosulfe, fenitropan, fenpropidina, formaldeído, furfural, hexaclorobutadieno, isotiocianato de metil, nitroestireno, nitrotal-isopropilo, OCH, laurato de pentaclorofenil, 2-fenilfenol, ftalida, piperalina, propamidina, proquinazida, piroquilona, ortofenilfenóxido de sódio, espiroxamina, sultropen, ticiofeno, triciclazol) ou mefenoxam.



[0067] Conforme indicado, os agentes de biocontrole recombinantes que apresentam resistência a um herbicida, fungicida, pesticida ou outro produto químico para a proteção de cultivos podem ser produzidos mediante técnicas de engenharia genética, e, por sua vez, os referidos agentes de biocontrole manipulados ou recombinantes podem ser cultivados para produzir uma população modificada de agentes de biocontrole. Um agente de biocontrole recombinante é produzido mediante a introdução de polinucleotídeos na célula hospedeira de biocontrole via transformação. Os métodos para a transformação de microorganismos são conhecidos e estão disponíveis na literatura da especialidade. Vide, de modo geral, 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. A transformação pode ocorrer por absorção natural de DNA nu por células competentes provenientes de seu ambiente no laboratório. Alternativamente, as células podem se tornar competentes por exposição a cátions divalentes sob condições de frio, por eletroporação, por exposição a polietileno glicol, por tratamento com nanopartículas fibrosas ou por outros métodos reconhecidos da especialidade.

[0068] Os genes de resistência a herbicidas para utilização na transformação de um agente de biocontrole recombinante incluem, mas não se limitam a, genes de desintoxicação fumonisina (Patente dos EUA nº 5.792.931); mutantes de acetolactato sintase (ALS) que conferem resistência a herbicidas, em particular aos herbicidas do tipo sulfonilureia, como as mutações S4 e/ou Hra; inibidores de glutamina sintase, como fosfinotricina ou basta

(por ex., gene bar); e resistência a glifosatos (gene EPSPS)); e resistência ao HPPD (WO 96/38576, Patentes dos EUA nº 6.758.044, 7.250.561, 7.935.869 e 8.124.846), ou outros genes similares conhecidos na especialidade. As divulgações das patentes acima citadas são aqui incorporadas por referência. O gene bar codifica a resistência ao herbicida basta, o gene nptII codifica a resistência aos antibióticos canamicina e geneticina, ao passo que os mutantes do gene ALS codificam a resistência aos herbicidas de sulfonilureia como clorsulfuron, metsulfuron, sulfometuron, nicossulfuron, rimsulfuron, flazassulfuron, sulfossulfuron e triassulfuron, bem como aos herbicidas de imadizolinona como imazetapir, imazaquin, imazapir e imazametabenzó.

[0069] As populações modificadas de agentes de controle biológico da presente invenção podem ser formuladas como pós, poeiras ou grânulos molháveis, ou ainda como produtos líquidos de base oleosa ou aquosa, entre outros. Essas formulações compreenderão os agentes de controle biológico modificados, além dos transportadores e de outros agentes. As formulações podem ser utilizadas como inoculantes de campo para biocontrole, como revestimentos de sementes, etc. Isto é, as populações de biocontrole modificadas podem ser utilizadas de qualquer forma conhecida na especialidade, incluindo revestimento de sementes com uma quantidade eficaz dos agentes modificados, aplicação em sulco das populações de biocontrole modificadas diretamente no solo, aplicações foliares, mesclas em uma mistura de envasamento, e controle de doenças póscolheita. Esses métodos são conhecidos na especialidade e são descritos, por ex., na Patente dos EUA nº 5.348.742 e na publicação do Pedido de Patente Europeu EP0472494 A2, ambas as quais são aqui incorporadas por referência. O biocontrole inclui a gestão das populações

residentes de organismos e as introduções de organismos específicos para reduzir a ocorrência de doenças.

[0070] O agente de biocontrole aqui proporcionado pode ser misturado com um fungicida, inseticida ou herbicida para melhorar sua atividade ou a atividade do produto químico ao qual tenha sido adicionado. Em alguns casos, a combinação do agente de biocontrole com o produto químico pode apresentar atividade sinérgica, implicando que a mistura de ambos excede a que se espera como resultado de um simples efeito aditivo.

[0071] Os agentes de controle biológico modificados da invenção podem ser usados para reduzir a ocorrência de doenças de forma significativa, para estimular o crescimento e o rendimento das plantas, e para reduzir a dependência em relação aos pesticidas tradicionais. Os agentes modificados da invenção podem ser usados junto com outros pesticidas para elaborar um programa de gestão de pragas integrado e eficaz. Em uma configuração, as populações de biocontrole modificadas podem ser misturadas na formulação com pesticidas conhecidos da forma descrita no documento WO 94/10845, aqui incorporado por referência.

[0072] As populações de biocontrole modificadas são aplicadas em uma quantidade eficaz. Uma quantidade eficaz de uma população de biocontrole modificada é uma quantidade suficiente para controlar ou inibir o patógeno. Em outras configurações, a quantidade eficaz do agente de biocontrole modificado é uma quantidade suficiente para estimular ou melhorar a saúde, o crescimento ou o rendimento da planta na presença de uma taxa de aplicação no campo agrícola de um biocida. A taxa de aplicação do agente de biocontrole modificado e/ou do biocida pode variar de acordo com o agente patógeno alvo, com o cultivo a ser protegido, com a eficácia das populações de biocontrole

modificadas, com a gravidade da doença, com as condições climáticas, entre outros fatores. Geralmente para a inoculação de um campo, a taxa de aplicação do agente de biocontrole modificado é de  $10^{12}$  a  $10^{16}$  unidades formadoras de colônias (UFC) por hectare. (Isso corresponde a cerca de 10 g a 10 kg de ingrediente ativo por hectare se a a.i. é de 100 bilhões de UFC por g.). Em outras configurações, para uma inoculação de campo, a taxa de aplicação do agente de biocontrole modificado é de  $3 \times 10^{15}$  a  $1 \times 10^{17}$  unidades formadoras de colônias (UFC) por hectare. (Isso corresponde a cerca de 30 kg a 1000 kg de ingrediente ativo por hectare se a a.i. é de 100 bilhões de UFC por g.). Em outras configurações, para uma inoculação de campo, a taxa de aplicação do agente de biocontrole modificado é de  $3 \times 10^{15}$  a  $1 \times 10^{17}$  unidades formadoras de colônias (UFC) por hectare; cerca de  $1 \times 10^{12}$  a cerca de  $1 \times 10^{13}$  unidades formadoras de colônias (UFC) por hectare, cerca de  $1 \times 10^{13}$  a cerca de  $1 \times 10^{14}$  unidades formadoras de colônias (UFC) por hectare, cerca de  $1 \times 10^{14}$  a cerca de  $1 \times 10^{15}$  unidades formadoras de colônias (UFC) por hectare, cerca de  $1 \times 10^{15}$  a cerca de  $1 \times 10^{16}$  unidades formadoras de colônias (UFC) por hectare ou cerca de  $1 \times 10^{16}$  a cerca de  $1 \times 10^{17}$  unidades formadoras de colônias (UFC) por hectare. Em outras configurações, para uma inoculação de campo, a taxa de aplicação do agente de biocontrole modificado é de, pelo menos, cerca de  $1 \times 10^{13}$ , cerca de  $1 \times 10^{14}$ ,  $1 \times 10^{15}$ , cerca de  $1 \times 10^{16}$  ou cerca de  $1 \times 10^{17}$  unidades formadoras de colônias (UFC) por hectare. Em outras configurações adicionais, a taxa de aplicação do agente de biocontrole modificado é de 10 g a 50 kg, 50 kg a 100 kg, 100 kg a 200 kg, 200 kg a 300 kg, 300 kg a 400 kg, 400 kg a 500 kg, 500 kg a 600 kg, 600 kg a 700 kg, 700 kg a 800 kg, 800 kg a 900 kg, 900 kg a 1.000 kg de ingrediente ativo por hectare, se a a.i. é de 100 bilhões UFC por g. Em outras configurações adicionais, a taxa de aplicação do agente de

biocontrole modificado é de, pelo menos, 10 g, 50 kg, 100 kg, 200 kg, 300 kg, 400 kg, 500 kg, 600 kg, 700 kg, 800 kg, 900 kg, 1000 kg de ingrediente ativo por hectare se o a.i. é de 100 bilhões UFC por g. Em configurações específicas, o agente de biocontrole modificado aplicado compreende a cepa depositada como NRRL n° B-50897 e/ou a cepa AIP050999 depositada como NRRL n° B-50999.

[0073] Qualquer taxa de aplicação agrícola adequada para um biocida pode ser aplicada ao cultivo, por exemplo, uma quantidade eficaz do biocida que controla um dado organismo (isto é, uma praga de interesse, como fungos, insetos, ervas daninhas, doenças, etc.) pode ser aplicada. Os métodos utilizados para comprovar a quantidade eficaz do agente de biocontrole modificado incluem, por exemplo, qualquer aumento estatisticamente significativo da saúde, do rendimento e/ou do crescimento da planta que ocorre após a aplicação de uma quantidade eficaz do agente de biocontrole e uma taxa de aplicação no campo de um biocida, em comparação com a saúde, o rendimento e/ou o crescimento da planta que ocorre quando a mesma concentração de um agente de biocontrole não-modificado é aplicada em combinação com a quantidade eficaz do biocida.

[0074] Portanto, uma configuração adicional da invenção proporciona um método para controlar ou inibir o crescimento de um agente patogênico vegetal mediante a aplicação da população de agentes de biocontrole modificados da invenção a um ambiente no qual o patógeno vegetal possa crescer. A aplicação pode ser à planta, a partes da planta, às sementes das plantas a serem protegidas, ou ainda ao solo no qual a planta a ser protegida estiver crescendo ou crescerá. A aplicação à planta ou a partes da planta pode ser realizada antes ou depois da colheita. A

aplicação às sementes deve ser realizada antes de plantar as sementes.

[0075] Em outras configurações, um cultivo, uma área de cultivo, uma semente e/ou ervas daninhas podem ser tratadas com uma combinação de uma quantidade eficaz do agente de controle modificado e uma quantidade eficaz de um biocida. Por "tratar com uma combinação de" ou "aplicar uma combinação de" um agente de biocontrole modificado e um biocida a um cultivo, área de cultivo ou campo, entende-se que um ou vários campos, cultivos de plantas, sementes e/ou ervas daninhas são tratados com um ou mais dos agentes de biocontrole modificados e um ou mais biocidas para que o efeito desejado seja alcançado. Além disso, a aplicação do agente de biocontrole modificado, do biocida, ou de ambos, pode ocorrer antes da plantação do cultivo (por exemplo, ao solo, às sementes ou à planta). Além disso, a aplicação do agente de biocontrole modificado e do biocida pode ocorrer de forma simultânea, ou as aplicações podem ocorrer em momentos diferentes (forma sequencial), contanto que o efeito desejado seja alcançado.

[0076] Em uma configuração não-limitante, o agente de biocontrole modificado é resistente ao glifosato e aumenta ainda mais a saúde, o rendimento ou o crescimento da planta ao ser aplicado em uma quantidade eficaz, ao passo que o biocida compreende glifosato ou um derivado ativo do mesmo. Em tais métodos, uma semente, planta ou área de cultivo é tratada com uma combinação de uma quantidade eficaz do agente de biocontrole modificado que é resistente ao glifosato e uma quantidade eficaz de glifosato, em que a quantidade eficaz de glifosato é suficiente para controlar seletivamente as ervas daninhas, sem danificar o cultivo de forma significativa. Em tais configurações, a quantidade eficaz do agente de biocontrole

modificado é suficiente para provocar um aumento estatisticamente significativo da saúde, do rendimento e/ou do crescimento da planta, em comparação com a saúde, o rendimento e/ou o crescimento que ocorrem quando a mesma concentração de um agente de biocontrole não-modificado é aplicada em combinação com a quantidade eficaz do glifosato ou de um derivado ativo do mesmo. Em outra configuração, o agente de biocontrole compreende uma quantidade eficaz de AIP1620.

[0077] Em outra configuração não-limitante, o agente de biocontrole modificado é resistente ao glufosinato e aumenta ainda mais a saúde, o rendimento ou o crescimento da planta ao ser aplicado em uma quantidade eficaz, ao passo que o biocida compreende glufosinato ou um derivado ativo do mesmo. Em tais métodos, uma semente, planta ou área de cultivo é tratada com uma combinação de uma quantidade eficaz do agente de biocontrole modificado que é resistente ao glufosinato e uma quantidade eficaz de glufosinato, em que a quantidade eficaz de glufosinato é suficiente para controlar seletivamente as ervas daninhas, sem danificar o cultivo de forma significativa. Em tais configurações, a quantidade eficaz do agente de biocontrole modificado é suficiente para provocar um aumento estatisticamente significativo da saúde, do rendimento e/ou do crescimento da planta, em comparação com a saúde, o rendimento e/ou o crescimento que ocorrem quando a mesma concentração de um agente de biocontrole não-modificado é aplicada em combinação com a quantidade eficaz do glufosinato ou de um derivado ativo do mesmo. Em outra configuração, o agente de biocontrole compreende uma quantidade eficaz de AIP050999.

[0078] Conforme aqui utilizado, o termo "planta" inclui células vegetais, protoplastos vegetais, culturas de tecidos de células vegetais a partir dos quais as plantas podem ser

regeneradas, calos vegetais, touceiras vegetais e células vegetais que estão intactas em plantas ou partes de plantas como embriões, pólen, óvulos, sementes, folhas, flores, ramos, frutos, caroços, orelhas, espigas, cascas, caules, raízes, pontas de raízes, anteras, entre outras. O termo "grão" pretende designar a semente madura produzida por cultivadores comerciais para outros fins que não sejam os de plantar ou reproduzir a espécie. Progênie, variantes e mutantes das plantas regeneradas também estão incluídos no âmbito da invenção, desde que essas partes compreendam os polinucleotídeos introduzidos.

[0079] O agente de biocontrole modificado pode ser usado com qualquer espécie de planta, incluindo, mas não se limitando a, monocotiledôneas e dicotiledôneas. Exemplos de espécies vegetais de interesse incluem, mas não se limitam a, milho (*Zea mays*), *Brassica* sp. (por ex., *B. napus*, *B. rapa*, *B. juncea*), principalmente as espécies *Brassica* usadas como fonte de óleo de sementes, alfalfa (*Medicago sativa*), arroz (*Oryza sativa*), centeio (*Secale cereale*), sorgo (*Sorghum bicolor*, *Sorghum vulgare*), milheto (por ex., milheto pérola (*Pennisetum glaucum*), painço (*Panicum miliaceum*), painço foxtail (*Setaria italica*), capim pé-de-galinha (*Eleusine coracana*), girassol (*Helianthus annuus*), cártamo (*Carthamus tinctorius*), trigo (*Triticum aestivum*), soja (*Glycine max*), tabaco (*Nicotiana tabacum*), batata (*Solanum tuberosum*), amendoim (*Arachis hypogaea*), algodão (*Gossypium barbadense*, *Gossypium hirsutum*), batata-doce (*Ipomoea batatas*), mandioca (*Manihot esculenta*), café (*Coffea* spp.), coco (*Cocos nucifera*), abacaxi (*Ananas comosus*), árvores de cítricos (*Citrus* spp.), cacau (*Theobroma cacao*), chá (*Camellia sinensis*), banana (*Musa* spp.), abacate (*Persea americana*), figo (*Ficus casica*), goiaba (*Psidium guajava*), manga (*Mangifera indica*), azeitona (*Olea europaea*), mamão (*Carica papaya*), caju



(*Anacardium occidentale*), macadâmia (*Macadamia integrifolia*), amêndoa (*Prunus amygdalus*), beterraba (*Beta vulgaris*), cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.), aveia, cevada, verduras, plantas ornamentais e coníferas.

[0080] As verduras incluem tomates (*Lycopersicon esculentum*), alface (por ex., *Lactuca sativa*), feijão comum (*Phaseolus vulgaris*), feijão-de-lima (*Phaseolus limensis*), ervilhas (*Lathyrus* spp.), além de membros do gênero *Cucumis* como pepino (*C. sativus*), melão cantaloupe (*C. cantalupensis*) e melão comum (*C. melo*). As plantas ornamentais incluem azaleia (*Rhododendron* spp.), hortênsia (*Macrophylla hydrangea*), hibisco (*Hibiscus rosasanensis*), rosa (*Rosa* spp.), tulipa (*Tulipa* spp.), narciso (*Narcissus* spp.), petúnia (*Petunia hybrida*), cravo (*Dianthus caryophyllus*), poinsettia (*Euphorbia pulcherrima*) e crisântemo.

[0081] As coníferas que podem ser usadas para praticar a presente invenção incluem, por exemplo, pinheiros como o pinheiro Loblolly (*Pinus taeda*), pinheiro americano (*Pinus elliotii*), pinheiro ponderosa (*Pinus ponderosa*), pinheiro contorta (*Pinus contorta*) e pinheiro de Monterrey (*Pinus radiata*); abeto de Douglas (*Pseudotsuga menziesii*); cicuta ocidental (*Tsuga canadensis*); abeto Sitka (*Picea glauca*); pau-brasil vermelho (*Sequoia sempervirens*); abetos verdadeiros como abeto prateado (*Abies amabilis*) e abeto balsâmico (*Abies balsamea*); além de cedros como o cedro vermelho ocidental (*Thuja plicata*) e o cedro amarelo do Alasca (*Chamaecyparis nootkatensis*). Em configurações específicas, as plantas da presente invenção são plantas de cultivo (por exemplo, milho, alfalfa, girassol, *Brassica*, soja, algodão, cártamo, amendoim, sorgo, trigo, milhete, tabaco, etc.). Em outras configurações, é usado milho ou plantas de soja.

[0082] Os exemplos a seguir são oferecidos a título de ilustração e não a título de limitação.

### **EXPERIMENTAL**

Exemplo 1: Produção de mutantes de AIP0069 resistentes ao glifosato

#### Introdução

[0083] Agentes biológicos estão sendo utilizados atualmente na agricultura para reduzir riscos e melhorar o rendimento. Um atributo importante desses agentes biológicos é que eles devem ser compatíveis com os produtos químicos que também podem ser aplicados na prática agrícola comercial. O glifosato é um herbicida químico que representa cerca de 25% do mercado mundial de herbicidas, sendo aplicado a uma taxa de aproximadamente 90 milhões de quilos por ano. Esse herbicida inibe a enzima 5-enolpiruvilchiquimato-3fosfato (EPSP) sintase (EPSPS), a qual catalisa um passo na biossíntese de aminoácidos aromáticos em plantas e em muitas bactérias. Portanto, o glifosato diminui a viabilidade de organismos, incluindo quaisquer agentes de biocontrole que dependam de EPSPS, além de comprovadamente alterar a comunidade microbiana da planta. Esse relatório descreve a correta introdução de tolerância ao glifosato em uma cepa *Pseudomonas fluorescens* utilizada no controle biológico de diversos patógenos vegetais fúngicos importantes, incluindo *Pythium* e *Rhizoctonia*, os agentes causais do agricolamente importante complexo de doenças denominado de "tombamento". Além de melhorar a compatibilidade química desse agente de biocontrole, a introdução de resistência ao glifosato oferece vantagens adicionais para a produção comercial.

[0084] Além do exemplo de glifosato aqui fornecido, outros agroquímicos podem inibir o desenvolvimento de bactérias desejáveis para realizar controle biológico ou estimular o

crescimento das plantas. Exemplos incluem o glufosinato de herbicidas (inibidor de glutamina sintase), herbicidas de sulfonilureia e imidazolinona (inibidores da síntese de aminoácidos de cadeia ramificada), bem como os antibióticos estreptomicina, oxitetraciclina e casugamicina.

#### Materiais, métodos e resultados

[0085] A cepa de controle biológico *Pseudomonas fluorescens* AIP0069 foi disposta sobre placas de ágar contendo 0 ou 5 mM de glifosato. O meio basal consistiu em 11,3 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 3 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1 g de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 10 g de glutamato monossódico, 31 g de melaço, 493 mg de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 50 mg de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 5 mg de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  e 0,3 g de tiamina por litro de água desionizada. Na ausência de glifosato, diversas colônias bacterianas eram visíveis após incubação durante a noite a 25°C. Na presença de 5 mM de glifosato, nenhuma colônia foi visível após uma incubação similar, embora após uma incubação prolongada de vários dias algumas colônias tenham sido vistas. Essas colônias foram isoladas e cresceram em um meio líquido a várias concentrações de glifosato. Uma isolada, chamada de GlyphR1, foi dez vezes mais resistente ao glifosato do que a cepa progenitora AIP0069 (Figura 1). Essa cepa melhorada deveria ser mais competitiva e, portanto, mais eficaz para propósitos de biocontrole do que a AIP0069 ou cepas similares sensíveis ao glifosato em sistemas agrícolas nos quais o glifosato está presente no solo e nos cultivos. Além disso, o glifosato pode ser utilizado como um agente seletivo durante a produção, formulação e/ou armazenamento dessa cepa para impedir a contaminação por outras bactérias.

#### Exemplo 2: Atividade de controle biológico de mutantes resistentes ao glifosato

[0086] As bactérias foram inoculadas em 50 ml de meio de caldo que consiste em 11,3 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 3 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1 g de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 10 g de glutamato monossódico, 30 g de melaço, 493 mg de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 50 mg de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  e 5 mg de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  por litro de água desionizada. Os cultivos foram plantados em balões com defletores de 250 ml em uma incubadora de agitação a 28°C e 250 rpm durante 2 dias. As células foram recolhidas por centrifugação a 3.500 xg durante 10 minutos. Os sobrenadantes do cultivo foram descartados e as células foram ressuspensas em água desionizada estéril com os volumes dos cultivos originais. A AIP0323, um mutante da AIP0069 que não possui atividade antifúngica, foi incluída como controle negativo.

[0087] Foi produzido um grão de arroz infestado com *Rhizoctonia solani*, conforme descrito anteriormente (K.A. Holmes e D.M. Benson, 1994. *Evaluation of Phytophthora parasitica var. nicotianae as a biocontrol for Phytophthora parasitica on Catharanthus roseus*. Plant Disease 78:193-199.) O arroz infestado foi pulverizado em um misturador e peneirado através de um crivo nº 10 (abertura de 2 mm). O grão pulverizado foi misturado com o meio de germinação a uma taxa de 2 g por litro.

[0088] Sementes *Impatiens* foram plantadas no meio de germinação infestado em bandejas de ficha de tamanho 402, tratadas com 0,3 ml de bactéria ressuspensa por ficha, e cultivadas seguindo condições padrão de produção em estufa. Foram realizadas 2 réplicas para cada tratamento experimental, com 20 fichas por réplica. O número de mudas sadias foi avaliado após duas semanas. Os dados do Quadro 1 abaixo demonstram que as variantes resistentes ao glifosato AIP0404 e AIP1620 retêm atividade antifúngica total, em comparação com a cepa progenitora, AIP0069.

Quadro 1

Tratamento	% mudas sadias		
	Réplica 1	Réplica 2	Média
Controle não-inoculado	90	90	90
Controle inoculado	15	20	17,5
Inoculado + AIP0069	75	80	77,5
Inoculado + AIP0323	10	15	12,5
Inoculado + AIP0404	75	80	77,5
Inoculado + AIP1620	80	75	77,5

[0089] A cepa de biocontrole pode ser utilizada para controlar fusariose da espiga do trigo, ferrugem asiática da soja, *Rhizoctonia*, *Botrytis*, *Pythium*, doenças de relva, entre outras.

#### Exemplo 3:

[0090] Os genes que codificam as enzimas de EPSPS tolerantes ao glifosato podem ser obtidos a partir de várias bactérias (A. Schulz et al., 1985, Differential sensitivity of bacterial 5enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthases to the herbicide glyphosate. FEMS Microbiology Letters, 28:297-301). Em particular, são altamente resistentes os genes de EPSPS da *Agrobacterium tumefaciens* CP4 (GF 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) e da *Arthrobacter globiformis* (C.L. Peters et al, 2010, genes GRG23 e GRG51 que conferem resistência a herbicidas. Patente dos EUA 7.674.958).

[0091] Um gene adequado é amplificado por PCR ou produzido sinteticamente utilizando técnicas conhecidas na especialidade. A fase de leitura aberta foi clonada no vetor plasmídeo pKK223-3 (Pharmacia) entre o promotor *tacI* e o terminador transcricional *rrnB*. O promotor *tacI* fornece uma forte expressão constitutiva de genes em *Pseudomonas*. Sequências de DNA genômicas da cepa AIP0069 cepa são incorporadas em cada lado do cassete promotor - gene - terminador para dirigir a recombinação homóloga dentro do cromossomo AIP0069.

[0092] O plasmídeo resultante é mobilizado de *E. coli* a *Pseudomonas fluorescens* AIP0069 por conjugação, uma técnica bem conhecida na especialidade, ao passo que a seleção em meio definido contém 100 mM de glifosato. O plasmídeo contém a origem de réplica *colE1* de gama de hospedeiros estreita e, portanto, não pode ser replicado em *Pseudomonas*. As colônias resistentes ao glifosato serão obtidas quando o cassete promotor - gene - terminador se integrar ao cromossomo *Pseudomonas* por recombinação homóloga. Os eventos de cruzamento simples (nos quais todo o plasmídeo é integrado ao cromossomo) podem ser distinguidos dos eventos de cruzamento duplo (nos quais é integrado apenas o cassete promotor - gene - terminador desejado) mediante PCR, método Southern blot ou outras técnicas bem conhecidas na especialidade. Um evento de cruzamento duplo é selecionado para utilização.

#### Exemplo 4.

[0093] Cultivos iniciadores de AIP1620 foram inoculados usando colônias oriundas de placas de ágar Luria e plantadas em um caldo de 0,1X NBY (0,8 g de caldo em pó nutritivo Difco e 0,5

g de extrato de levedura em pó por litro de água desionizada) a 28°C e 250 rpm. Cultivos de produção foram plantados em um caldo contendo, por litro de água desionizada: 11,3 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 3,0 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1,0 g de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 10 g de glutamato monossódico, 3,0 g de melaço, 0,49 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 50 mg de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 5 mg de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  e ácido clorídrico suficiente para ajustar o pH a cerca de 6,2. Cinquenta ml de caldo de produção foram colocados em um balão de cultivo com defletores de 250 ml, inoculados com 0,5 ml do cultivo iniciador e incubados a 28°C e 250 rpm. Os cultivos de produção foram inoculados em vários momentos e, em seguida, colhidos simultaneamente para produzir cultivos com tempos de incubação de 15, 24, 33 e 43 horas. Quarenta ml de cada cultivo foram colhidos por centrifugação. O caldo de cultivo gasto foi descartado e as células foram ressuspensas em água desionizada autoclavada a 40 ml de volume final.

[0094] O inóculo fúngico foi preparado utilizando o método de grão de arroz descrito por Holmes e Benson (K.A. Holmes e DM Benson, 1994. Evaluation of *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* for biocontrol of *Phytophthora parasitica* on *Catharanthus roseus*. Plant Disease, 78:193-199.). Os grãos de arroz infestados foram pulverizados em um misturador e peneirados através de um crivo nº 10. Esse inóculo foi misturado à mescla de germinação superfina Fafard a uma taxa de 1,0 g por litro.

[0095] A mescla de germinação inoculada foi então colocada em 392 bandejas de ficha próprias para estufas (Landmark Plastic Corporation, Akron, Ohio, EUA) e uma semente *Impatiens* foi plantada em cada célula. Suspensões de células AIP1620 foram aplicadas a uma taxa de 0,3 ml por célula. As sementes foram germinadas seguindo condições padrão para estufas. Foram realizadas 3 réplicas de cada tratamento, com 20 células por

réplica. Após 10 a 14 dias, os ensaios foram pontuados de acordo com o número de mudas sadias obtidas em cada tratamento. Os resultados são resumidos no Quadro 2 abaixo.

<b>Quadro 2. Desempenho das células AIP1620 em teste de germinação de sementes em estufa</b>			
<b>Tratamento</b>	<b>Tempo de cultivo</b>	<b>Mudas vivas (de 20)</b>	
		<b>Média</b>	<b>Desvio padrão</b>
Controle não-inoculado	n/a	15,0	0,0
Controle inoculado	n/a	2,7	1,2
AIP1620	15 horas	6,3	1,2
AIP1620	24 horas	13,3	4,6
AIP1620	33 horas	15,0	0,0
AIP1620	44 horas	14,7	2,5

#### Exemplo 5.

[0096] Diversos ensaios de estufa de células AIP1620 foram realizados durante um período de 10 meses. Para cada ensaio, cultivos AIP1620 foram plantados, colhidos e ressuspensos em água desionizada autoclavada, essencialmente conforme descrito no EXEMPLO 4, usando um tempo de cultivo de aproximadamente 24 horas. Os ensaios de germinação em estufa também foram realizados conforme descrito no EXEMPLO 4, embora a taxa do inóculo R.



*solani* tenha variado de 0,25 a 1,0 g de grão de arroz pulverizado por litro de mistura de germinação, dependendo do ensaio. Os resultados compilados a partir de 17 ensaios são indicados no Quadro 3 abaixo, demonstrando um desempenho consistente da AIP1620 para controlar as doenças de tombamento.

<b>Quadro 3. Desempenho das células AIP1620 em diversos testes de germinação de sementes em estufa</b>						
<b>Ensaio</b>	<b>Mudas vivas (de 20)</b>					
	<b>Não-inoculado Controle</b>		<b>Inoculado Controle</b>		<b>Inoculado + AIP1620</b>	
	<b>Média</b>	<b>DP</b>	<b>Média</b>	<b>DP</b>	<b>Média</b>	<b>DP</b>
1	17,0	1,0	1,3	0,6	11,3	2,5
2	17,3	2,5	9,0	1,0	17,3	2,1
3	14,0	0,0	2,0	1,0	16,7	2,3
4	12,3	1,5	1,7	1,5	13,3	3,1
5	18,4	1,1	3,8	1,8	16,8	1,3
6	16,4	1,7	2,6	2,1	13,6	2,5
7	16,6	1,1	2,8	1,3	15,8	1,3
8	19,7	0,6	3,0	1,0	17,3	0,6

9	19,0	1,0	3,7	1,5	15,7	1,2
10	16,3	0,6	1,7	2,1	15,7	0,6
11	18,5	0,7	2,0	0,0	14,5	0,7
12	18,0	1,0	3,0	3,0	16,3	0,6
13	18,8	1,9	3,8	2,1	17,0	0,8
14	17,0	0,0	3,5	0,7	15,5	0,7
15	18,6	1,1	4,8	1,3	14,8	2,8
16	19,5	0,6	3,5	2,5	18,5	1,5
17	18,0	0,0	1,0	1,7	15,3	0,6

Exemplo 6.

[0097] Cinquenta gramas de pasta de células AIP1620 foram misturados com 50 g de argila atapulgita Min-U-Gel 400 ou Min-U-Gel 200 (Active Minerals International, LLC, Sparks, Maryland, EUA) e secos a uma atividade de água inferior a 0,3. Uma porção de cada formulação foi armazenada a 4°C e uma outra porção foi armazenada a 22°C. A viabilidade dessas formulações foi testada em vários momentos por diluição em placas, e os resultados são indicados no Quadro 4 abaixo. Após 21 dias de armazenamento, as amostras que tinham sido armazenadas a 4°C foram testadas em um ensaio de germinação de sementes em estufa, verificando-se que retiveram atividade antifúngica contra *Rhizoctonia solani*.

<b>Quadro 4. Sobrevivência de células AIP1620 formuladas durante armazenamento a 4°C ou 22°C</b>			
Formulação	Unidades formadoras de colônias por grama de AIP1620 após armazenamento durante		
	2 semanas	4 semanas	20 semanas
Min-U-Gel 400 armazenada a 22°C	$5,4 \times 10^7$	$2,0 \times 10^6$	$< 2,0 \times 10^4$
Min-U-Gel 400 armazenada a 4°C	$1,3 \times 10^8$	$3,5 \times 10^8$	Não testado
Min-U-Gel 200 armazenada a 22°C	$8,2 \times 10^8$	$3,7 \times 10^8$	$7,2 \times 10^5$
Min-U-Gel 200 armazenada a 4°C	$1,8 \times 10^{10}$	$9,0 \times 10^9$	Não testado

Exemplo 7.

[0098] Cem gramas de pasta de células AIP1620 foram misturados com 20 g de silicato de cálcio sintético (*Microcel E*, *Imerys Filtration Minerals*, *Lompoc*, Califórnia, EUA) utilizando um processador de alimentos. O material resultante continha  $2,7 \times 10^{10}$  unidades formadoras de colônias por grama (UFC/g) de AIP1620, conforme determinado por diluição em placas. Esse material foi seco a 40°C a uma atividade de água inferior a 0,30,

momento no qual continha  $1,4 \times 10^9$  UFC/g de AIP1620. A formulação em pó seco foi armazenada em sacos vedados a vácuo Mylar a 22°C. Após 85 dias, o pó continha  $1,1 \times 10^6$  UFC/g de AIP1620 e reteve atividade antifúngica contra *Rhizoctonia solani* conforme determinado por um ensaio de germinação de sementes em estufa.

Exemplo 8.

[0099] Cem gramas de pasta de células AIP1620 foram misturados com 5 g de glicerol e 20 g de silicato de cálcio sintético utilizando um processador de alimentos. O material resultante continha  $5,7 \times 10^{11}$  UFC/g de AIP1620, conforme determinado por diluição em placas. Esse material foi seco a 40°C a uma atividade de água inferior a 0,30, momento no qual continha  $3,1 \times 10^9$  UFC/g de AIP1620. A formulação em pó seco foi armazenada em sacos vedados a vácuo Mylar a 22°C. Após 61 dias, o pó continha  $6,2 \times 10^8$  UFC/g de AIP1620 e reteve atividade antifúngica contra *Rhizoctonia solani* conforme determinado por um ensaio de germinação de sementes em estufa.

Exemplo 9.

[0100] Cem gramas de pasta de células AIP1620 foram misturados com 5 g de trealose e 20 g de silicato de cálcio sintético utilizando um processador de alimentos. O material resultante continha  $5,7 \times 10^{11}$  UFC/g de AIP1620, conforme determinado por diluição em placas. Esse material foi seco a 40°C a uma atividade de água inferior a 0,30, momento no qual continha  $4,0 \times 10^8$  UFC/g de AIP1620. A formulação em pó seco foi armazenada em sacos vedados a vácuo Mylar a 22°C. Após 54 dias, o pó continha  $2,7 \times 10^7$  UFC/g de AIP1620.

Exemplo 10.

[0101] Quatro gramas de goma xantana foram dispersos em 4 g de óleo de soja. A mistura resultante foi combinada com 100 g de pasta de células AIP1620 e deixada espessar por cerca de 5

minutos à temperatura ambiente. A mistura espessada foi misturada com 20 g de silicato de cálcio sintético utilizando um processador de alimentos. O material resultante continha  $9,4 \times 10^{11}$  UFC/g de AIP1620 e foi dividido em duas porções de 50 g. Uma porção foi seca a 40°C a uma atividade de água inferior a 0,30, momento no qual continha  $7,0 \times 10^8$  UFC/g de AIP1620.

[0102] A outra porção foi seca sobre sílica gel à temperatura ambiente, a uma atividade de água inferior a 0,10, momento no qual continha  $1,18 \times 10^{10}$  UFC/g de AIP1620.

#### Exemplo 11.

[0103] Cinco formulações diferentes foram preparadas essencialmente conforme descrito no Exemplo 4 acima, utilizando os excipientes e proporções indicados no Quadro 5 abaixo. Essas formulações foram secas a 40°C a uma atividade de água inferior a 0,30 e armazenadas a 4°C.

[0104] O inóculo fúngico foi preparado utilizando o método de grão de arroz descrito por Holmes e Benson (K.A. Holmes e DM Benson, 1994. *Evaluation of Phytophthora parasitica var. nicotianae for biocontrol of Phytophthora parasitica on Catharanthus roseus. Plant Disease*, 78:193-199.). Os grãos de arroz infestados foram pulverizados em um misturador e peneirados através de um crivo nº 10. Esse inóculo foi misturado à mescla de germinação superfina Fafard a uma taxa de 0,25 g por litro.

[0105] A mistura inoculada foi dividida e, posteriormente, adicionou-se AIP1620 formulado à razão de 5 g por litro. Sementes *Impatiens* foram plantadas nas mesclas inoculadas e tratadas. As sementes foram germinadas seguindo condições padrão para estufas. Após 10 dias, os ensaios foram pontuados de acordo com o número de mudas sadias obtidas em cada tratamento. Os resultados são resumidos no Quadro 6 abaixo.

<b>Quadro 5. Composição das formulações</b>			
<b>Formulação</b>	<b>Pasta de células AIP1620</b>	<b>Excipiente</b>	<b>Atividade de água final</b>
A	50 g	50 g de argila atapulgita Minugel 400	0,29
B	50 g	50 g de argila atapulgita Minugel 200	0,28
C	50 g	50 g de argila atapulgita Agsorb 325 RVM	0,24
D	100 g	15 g de sílica hidrofílica Sipernat 22S	0,26
E	100 g	15 g de sílica Aerosil 200F	0,29

<b>Quadro 6. Desempenho de AIP1620 formuladas em ensaio de germinação de sementes em estufa</b>			
<b>Tratamento</b>		<b>Mudas vivas (de 20)</b>	
	<b>Tempo de armazenamento</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio padrão</b>

Controle nãoinoculado	n/a	19,7	0,6
Controle inoculado	n/a	3,0	1,0
Formulação A	45 dias	12,7	4,9
Formulação B	45 dias	9,0	6,2
Formulação C	45 dias	17,3	1,2
Formulação D	45 dias	17,3	0,6
Formulação F	45 dias	11,7	2,1

#### Exemplo 12.

[0106] Várias formulações foram preparadas conforme descrito nos Exemplos 4 a 8 acima, em momentos diferentes. A composição das diferentes formulações é apresentada no Quadro 7 abaixo. Após secagem a uma atividade de água de 0,30 ou inferior, os materiais formulados foram vedados a vácuo em sacos Mylar e armazenados a 22°C.

[0107] O inóculo fúngico foi preparado utilizando o método de grão de arroz descrito por Holmes e Benson (K.A. Holmes e DM Benson, 1994. Evaluation of *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* for biocontrol of *Phytophthora parasitica* on *Catharanthus roseus*. Plant Disease, 78:193-199.). Os grãos de arroz infestados foram pulverizados em um misturador e peneirados através de um crivo n° 10. Esse inóculo foi misturado

à mescla de germinação superfina Fafard a uma taxa de 0,25 g por litro.

[0108] A mistura inoculada foi dividida e, posteriormente, adicionou-se AIP1620 formulado à razão de 5 g por litro. No mesmo dia, uma subamostra de cada formulação passou pelo processo de diluição em placas para determinar a UFC/g da AIP1620. Sementes *Impatiens* foram plantadas nas mesclas inoculadas e tratadas. As sementes foram germinadas seguindo condições padrão para estufas. Após 10 a 14 dias, os ensaios foram pontuados de acordo com o número de mudas sadias obtidas em cada tratamento. Os resultados são resumidos no Quadro 8 abaixo.

<b>Quadro 7. Composição das formulações</b>				
<b>Formulação</b>	<b>Pasta de células AIP1620</b>	<b>Aditivos</b>	<b>Excipiente</b>	<b>Método de secagem</b>
F	100 g	nenhum	20 g de silicato de cálcio	Forno a 40°C
G	100 g	5 g de glicerol	20 g de silicato de cálcio	Forno a 40°C
H	100 g	nenhum	50 g de MinuGel 200	Forno a 40°C



I	100 g	4 g de goma xantana, 4 g de óleo de soja	20 g de silicato de cálcio	Temperatura ambiente, gel de sílica
J	100 g	4 g de goma xantana, 4 g de óleo de soja	20 g de silicato de cálcio	Forno a 40°C
K	100 g	4 g de goma xantana, 4 g de azeite de oliva	20 g de silicato de cálcio	Forno a 40°C

<b>Quadro 8. Desempenho de AIP1620 formuladas em ensaio de germinação de sementes em estufa</b>				
<b>Tratamento</b>	<b>Tempo de armazenamento</b>	<b>UFC AIP1620 por g</b>	<b>Mudas vivas (de 20)</b>	
			<b>Média</b>	<b>Desvio padrão</b>
Controle nãoinoculado	n/a		18,3	0,6
Controle inoculado	n/a		2,3	3,2

Formulação F	12 dias	$5,2 \times 10^6$	5,7	2,5
Formulação G	12 dias	$8,3 \times 10^6$	10,3	3,2
Formulação F	18 dias	$8,0 \times 10^5$	16,7	1,5
Formulação G	18 dias	$3,4 \times 10^9$	16,7	1,1
Formulação H	25 dias	$5,7 \times 10^9$	4,7	0,7
Formulação I	39 dias	$7,7 \times 10^9$	16,7	1,5
Formulação J	39 dias	$1,3 \times 10^7$	8,0	1,7
Formulação K	39 dias	$3,6 \times 10^8$	5,3	1,5

[0109] Esses resultados demonstram que a AIP1620 formulada retém a viabilidade e a atividade, isto é, a capacidade de proteger mudas contra as doenças de tombamento.

#### Exemplo 13

[0110] Cinquenta gramas de pasta de células AIP1620 foram misturados com 50 g de argila atapulgita Min-U-Gel 400 ou Min-UGel 200 (Active Minerals International, LLC, Sparks, Maryland, EUA), secos a uma atividade de água inferior a 0,2 e armazenados a 22°C. A viabilidade dessas formulações foi testada em vários momentos por diluição em placas, e os resultados são indicados no Quadro 9 abaixo. Após 21 dias, ambas as formulações foram testadas em um ensaio de germinação de sementes em estufa, verificando-se que retiveram atividade antifúngica contra *Rhizoctonia solani*.

Quadro 9

Formulação	Unidades formadoras de colônias por grama de AIP1620 após armazenamento a 22°C durante		
	14 dias	30 dias	141 dias
A: Min-U-Gel 400	$1,3 \times 10^6$	$3,5 \times 10^6$	$< 2,0 \times 10^4$
B: Min-U-Gel 200	$1,8 \times 10^8$	$9,0 \times 10^7$	$7,2 \times 10^5$

Exemplo 14.

[0111] Experimentos em estufa foram realizados para demonstrar a eficácia da AIP1620 em controlar *Botrytis cinerea*.

Cultivos iniciadores de AIP1620 foram inoculados usando colônias oriundas de placas de ágar Luria e plantadas em um caldo de 0,1X NBY (0,8 g de caldo em pó nutritivo Difco e 0,5 g de extrato de levedura em pó por litro de água desionizada) a 28°C e 250 rpm. Cultivos de produção foram plantados em um caldo contendo, por litro de água desionizada: 11,3 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 3,0 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1,0 g  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 10 g de glutamato monossódico, 3,0 g de melaço, 0,49 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 50 mg de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 5 mg de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  e ácido clorídrico suficiente para ajustar o pH a cerca de 6,2. Cinquenta ml de caldo de produção foram colocados em um balão de cultivo com defletores de 250 ml, inoculados com 0,5 ml do cultivo iniciador e incubados a 28°C e 250 rpm. Os cultivos de produção foram inoculados em vários momentos e, em seguida, colhidos simultaneamente para produzir cultivos com tempos de incubação de 15, 24, 33 e 43 horas. Quarenta ml de cada cultivo foram colhidos por centrifugação. O caldo de cultivo gasto foi

descartado e as células foram ressuspensas em água desionizada autoclavada a 40 ml de volume final. *Botrytis cinerea* foi cultivado em caldo de dextrose de batata durante 1 a 2 semanas, sem agitação. O colchão micelial resultante foi removido do caldo e homogeneizado em água desionizada autoclavada para produzir um inóculo líquido. Morangos cultivados organicamente foram comprados em um mercado local. As frutas puras foram selecionadas e imersas no inóculo de *B. cinerea* durante 2 a 3 segundos e, em seguida, foram colocadas para secar durante 60 minutos antes do tratamento. Foram aplicados tratamentos da AIP1620 mediante a imersão dos frutos inoculados dentro da suspensão de células por 2 a 3 segundos. Os frutos foram posteriormente colocados em recipientes de plástico vedados com toalhas de papel umedecidas para manter uma elevada umidade, e armazenados à temperatura ambiente durante 72 a 84 horas. Foram realizadas 14 réplicas (bagas) em cada tratamento. Cada baga foi classificada de acordo com a seguinte escala de gravidade de deterioração visual: 0 = nenhum dano, 1 = 25% de dano, 2 = 50% de dano, 3 = 75% de dano e 4 = 100% (ou seja, baga completamente coberta pelo fungo). Os resultados são resumidos no Quadro 10 abaixo.

**Quadro 10. Controle pós-colheita de bolor cinza em morangos por células AIP1620**

<b>Tratamento</b>	<b>Classificação de gravidade de deterioração média</b>
Controle não-inoculado	3,1
Controle inoculado	3.3

Inoculado + AIP1620	0,7
---------------------	-----

Exemplo 15.

[0112] Experimentos em estufa foram realizados para demonstrar a eficácia da AIP1620 em controlar doenças de tombamento causadas pelo patógeno vegetal oomicete *Pythium aphanadermatum*.

Cultivos iniciadores de AIP1620 foram inoculados usando colônias oriundas de placas de ágar Luria e plantadas em um caldo de 0,1X NBY (0,8 g de caldo em pó nutritivo Difco e 0,5 g de extrato de levedura em pó por litro de água desionizada) a 28°C e 250 rpm. Cultivos de produção foram plantados em um caldo contendo, por litro de água desionizada: 11,3 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 3,0 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,0 g de NH<sub>4</sub>Cl, 10 g de glutamato monossódico, 3,0 g de melaço, 0,49 g de MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 50 mg de ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 5 mg FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O e ácido clorídrico suficiente para ajustar o pH a cerca de 6,2. Cinquenta ml de caldo de produção foram colocados em um balão de cultivo com defletores de 250 ml, inoculados com 0,5 ml do cultivo iniciador e incubados a 28°C e 250 rpm. Os cultivos de produção foram inoculados em vários momentos e, em seguida, colhidos simultaneamente para produzir cultivos com tempos de incubação de 15, 24, 33 e 43 horas. Quarenta ml de cada cultivo foram colhidos por centrifugação. O caldo de cultivo gasto foi descartado e as células foram ressuspensas em água desionizada autoclavada a 40 ml de volume final.

[0113] O inóculo de *P. aphanadermatum* foi preparado utilizando o método de grão de arroz descrito por Holmes e Benson (K.A. Holmes and D.M. Benson, 1994. Evaluation of *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* for biocontrol of *Phytophthora parasitica* on *Catharanthus roseus*. Plant Disease, 78:193-199.).

Os grãos de arroz infestados foram pulverizados em um misturador e peneirados através de um crivo nº 10. Esse inóculo foi misturado à mescla de germinação superfina Fafard a uma taxa de 6,0 g por litro (testes 1 a 4) ou 7,0 g por litro (teste 5).

[0114] A mescla de germinação inoculada foi então colocada em 392 bandejas de ficha próprias para estufas (Landmark Plastic Corporation, Akron, Ohio, EUA) e uma semente Impatiens foi plantada em cada célula. As suspensões de células AIP1620 foram aplicadas a uma taxa de 0,3 ml por célula. As sementes foram germinadas seguindo condições padrão para estufas. Foram realizadas 2 ou 3 réplicas de cada tratamento, com 20 células por réplica. Após 7 a 17 dias, os ensaios foram pontuados de acordo com o número de mudas saudáveis obtidas em cada tratamento. Os resultados são resumidos no Quadro 11 abaixo.

<b>Quadro 11. Controle da doença de tombamento <i>Pythium</i> por células AIP1620 em um ensaio de germinação de sementes em estufa.</b> Os valores representam a média +/- o desvio padrão.					
Tratamento	Mudas vivas (de 20)				
	Teste 1	Teste 2	Teste 3	Teste 4	Teste 5
Controle nãoinoculado	18,0 ± 1,4	18,5 ± 0,7	17,5 ± 0,7	16,5 ± 0,7	17,3 ± 0,0
Controle inoculado	12,0 ± 0,0	10,5 ± 0,7	9,0 ± 1,4	8,5 ± 0,7	10,7 ± 0,7

Inoculado AIP1620	+	17,0 ± 1,4	15,5 ± 2,1	13,5 ± 2,1	12,5 ± 0,7	16,3 ± 0,7
----------------------	---	---------------	---------------	---------------	---------------	---------------

Exemplo 16. Controle da ferrugem asiática da soja com AIP1620

[0115] Células AIP1620 foram produzidas conforme descrito nos exemplos anteriores. *Phakopsora pachyrhizi* foi cultivada em plantas de soja suscetíveis, ao passo que urediniósporos foram recolhidos por sucção a vácuo a partir de folhas infectadas que apresentavam pústulas erupcionadas (Twizeyimana, M., e Hartman, G.L. 2010. Culturing *Phakopsora pachyrhizi* on detached leaves and urediniospore survival at different temperatures and relative humidities. Plant Disease 94:1453-1460).

[0116] Plantas de soja Williams 82 foram cultivadas em câmaras de cultivo de plantas utilizando técnicas bem conhecidas na especialidade. Quando as plantas estavam em estágio V3, a primeira folha trifoliada totalmente expandida foi pulverizada com células AIP1620 ressuspensas, com um fungicida químico padrão ou com água deionizada (controle inoculado). Um dia depois, as folhas foram inoculadas com uma suspensão de urediniósporos *P.pachyrhizi* ( $1 \times 10^5$  /ml). Tanto a inoculação como a cepa/fungicida foram aplicadas utilizando um atomizador ligado a um compressor de ar. As plantas foram mantidas em uma câmara de cultivo a 95% de umidade relativa, com um ciclo diário de 12 horas de luz e 12 horas de escuridão a 21 e 23°C, respectivamente. Após duas semanas, a gravidade da doença foi pontuada por contagem do número de urédias esporuladas em círculos de diâmetro de 1 cm selecionados aleatoriamente nas folhas inoculadas. Foram realizadas 3 réplicas (plantas) para cada tratamento e 3 contagens de urédias para cada réplica. Os

resultados são ilustrados no Quadro 12 abaixo e demonstram que as aplicações de AIP1620 controlam eficazmente a doença de ferrugem asiática da soja causada por *Phakopsora pachyrhizi*.

Quadro 12

<b>Tratamento</b>	<b>Urédias esporuladas por círculo de 1 cm de diâmetro</b>
Controle inoculado	22,1
Químico padrão	0,0
AIP1620	1,8

Exemplo 17. Compatibilidade da AIP1620 com fungicidas comerciais

[0117] A viabilidade da AIP1620 foi medida após misturar a cepa com 3 fungicidas comerciais, cada um contendo um ingrediente ativo diferente (Quadro 13). Concentrações de fungicidas foram selecionadas para simular as que ocorrem em uma mistura típica de tanque para aplicação em campo.

[0118] A AIP1620 foi cultivada em 3 mL de meio LB em um tubo de 10 mL durante 24 horas a 28°C e 250 rpm. Os sedimentos celulares foram recolhidos por centrifugação e suspensos em 3 mL de dH<sub>2</sub>O. Novecentos microlitros de suspensão celular foram misturados com 100 microlitros de 10X de estoque de fungicida e incubados a 28°C durante 5 minutos ou 120 minutos.



<b>Quadro 13. Fungicidas químicos formulados</b>		
<b>Marca</b>	<b>Ingrediente ativo</b>	<b>Volume de produto (por 100 mL)</b>
Quadris	Azoxistrobina	936 µL
Spectator Ultra 1.3	Propiconazol	1,87 mL
Subdue Maxx	Mefenoxam	78,1 µL

[0119] Após incubação com os fungicidas, as células foram recolhidas por centrifugação conforme descrito acima e ressuspensas em água desionizada. As alíquotas foram diluídas em série em água desionizada, plaqueadas em ágar LB e incubadas a 28°C durante 2 dias usando técnicas bem conhecidas na especialidade. As colônias bacterianas foram contadas e o número de unidades formadoras de colônias por ml (UFC/ml) nas soluções originais foram calculadas. Os dados são indicados no Quadro 14 abaixo e mostram que a viabilidade da AIP 1620 não é adversamente afetada por misturá-la com esses fungicidas formulados.

**Quadro 14. Viabilidade das células AIP1620 após incubação com formulações de fungicidas em uma mistura de tanque simulada**

Fungicida	UFC/mL após o período de incubação	
	5 minutos	120 minutos
Água (controle)	$3,70 \times 10^9$	$8,67 \times 10^8$
Quadris	$4,50 \times 10^9$	$4,87 \times 10^9$
Spectator	$2,33 \times 10^9$	$2,17 \times 10^9$
Subdue	$4,67 \times 10^9$	$3,63 \times 10^9$

Exemplo 18. Avaliação da atividade protetora de misturas de AIP1620 e fungicidas contra a ferrugem asiática causada por *Phakopsora pachyrhizi*.

[0120] As bactérias foram inoculadas em 50 ml de meio de caldo que consiste em 11,3 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 3 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1 g de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 10 g de glutamato monossódico, 30 g de melaço, 493 mg de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 50 mg de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  e 5 mg de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  por litro de água desionizada. Os cultivos foram plantados em balões com defletores de 250 ml em uma incubadora de agitação a 28°C e 250 rpm durante 2 dias. As células foram recolhidas por centrifugação a 3.500 xg durante 10 minutos. Os sobrenadantes do cultivo foram descartados e as células foram ressuspensas em água desionizada estéril com os volumes dos cultivos originais. A AIP0323, um mutante da AIP0069 que não possui atividade antifúngica, foi incluída como controle negativo.

[0121] Urediniósporos da *Phakopsora pachyrhizi* foram recolhidos por sucção a vácuo a partir de folhas infectadas com o fungo que apresenta pústulas erupcionadas. Os esporos foram ressuspensos em água a  $10^5/\text{mL}$  e inoculados em folhas soltas de soja como um aerossol, utilizando um aerógrafo de acordo com as técnicas conhecidas na especialidade (Twizeyimana, M., e Hartman, G. L. 2010. Culturing *Phakopsora pachyrhizi* on detached leaves and urediniospore survival at different temperatures and relative humidities. *Plant Disease* 94:1453-1460).

[0122] As misturas de células AIP1620 ressuspensas em água com ingredientes ativos fungicidas são preparadas em várias proporções, incluindo  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$ ,  $10^9$  ou  $10^{10}$  células AIP1620 por mL, misturando-as, por sua vez, com o ingrediente ativo fungicida a uma taxa normal de uso de campo de 1/10X, 1/3X, 1/2X ou 1X, calculada mediante a conversão da taxa de campo publicada no rótulo a g/mL, com base em uma suposição sobre o volume de pulverização por hectare ou acre.

[0123] As folhas de soja inoculadas são tratadas com o agente de biocontrole nas proporções acima, e com os fungicidas nas taxas acima, bem como com as misturas de agente de biocontrole e fungicida em várias combinações das proporções e taxas especificadas acima. Além disso, algumas folhas soltas inoculadas são deixadas sem tratamento, ou tratadas com AIP0323 como controles. Pelo menos 3 folhas (ou segmentos de folhas) são utilizados para cada tratamento de agente de biocontrole, produto químico ou mistura. As folhas soltas são incubadas em uma câmara de cultivo de alta umidade, com 12 horas de luz a  $21^\circ\text{C}$  e 12 horas de escuridão a  $23^\circ\text{C}$ . Após 10 a 14 dias, as folhas foram observadas e pontuadas de acordo com o número de urédias visíveis por  $\text{cm}^2$ .

[0124] A equação de Colby é usada para determinar os efeitos fungicidas esperados das misturas. (Vide Colby, S. R., Calculation of the synergistic and antagonistic response of herbicide combinations. *Weeds* 1967, 15, 20-22, aqui incorporado por referência em sua totalidade).

[0125] A seguinte equação é usada para calcular a atividade esperada das misturas que contêm dois ingredientes ativos, A e B:

$$\text{Atividade esperada} = A+B-(A \times B/100)$$

A = eficácia observada do componente ativo A na mesma concentração que a utilizada na mistura;

B = eficácia observada do componente ativo B na mesma concentração que a utilizada na mistura.

[0126] Interações sinérgicas representativas, incluindo as taxas de aplicação usadas e o controle da doença resultante, são observadas e registrados da seguinte maneira:

% CD = porcentagem de controle da doença

% CD Obs = porcentagem de controle da doença observado

% CD Esp = porcentagem de controle da doença esperado

Fator de sinergia = % CD Obs / % CD Esp

Exemplo 19. Seleção de uma população da cepa de controle bilógico *Pseudomonas fluorescens* AIP000069 que adquiriu resistência ao herbicida glufosinato

[0127] 50 microlitros de cultivo de AIP000069, cultivado em 0,5X LB durante 24 horas a 28°C, foram espalhados em placas contendo o meio M63 Plus com 0 ou 100 mM de glufosinato. O meio M63 Plus consistiu em 13,6 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 9,92 g de C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>, 2 g de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 5,5 mg de CaCl<sub>2</sub>, 0,278 mg de FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O e 10,16 mg de MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O por litro de água desionizada. Na ausência de glufosinato, diversas colônias bacterianas (uma relva) eram visíveis após a incubação de placas durante 2 dias a 28°C. Na

presença de 100 mM de glufosinato, nenhuma colônia foi visível após uma incubação similar, embora, após uma incubação prolongada de vários dias, uma única colônia tenha crescido. Essa colônia foi demarcada para isolamento em uma placa de ágar M63 contendo 100 mM de glufosinato. O isolado resultante foi denominado de AIP050999. O cultivo da AIP050999 foi comparado ao da cepa progenitora, AIP000069, e a uma versão resistente ao glifosato da cepa AIP001620. Os resultados são resumidos no Quadro 15 abaixo.

**Quadro 15. Cultivo de cepas em meio de ágar M63 Plus na presença e na ausência de glufosinato.**

<b>Cepa</b>	<b>0 mM de glufosinato</b>	<b>100 mM de glufosinato</b>
AIP000069	+++	-
AIP001620	+++	-
AIP050999	+++	+++

[0128] Todas as publicações e pedidos de patente mencionados na especificação são indicativos do nível de perícia dos peritos na especialidade à qual esta invenção pertence. Todas as publicações e pedidos de patente são aqui incorporados por referência na mesma extensão, como se cada publicação ou pedido de patente particular fosse especificamente e individualmente indicado para ser incorporado por referência.

[0129] Embora a invenção anterior tenha sido descrita em algum detalhe por meio de ilustrações e exemplos, para fins de clareza de compreensão é elementar ressaltar que certas alterações e modificações podem ser praticadas dentro do âmbito das reivindicações anexas.

### **REIVINDICAÇÕES**

1. Método de controlar um patógeno vegetal, o referido método **caracterizado** pelo fato de que compreende aplicar a uma planta ou parte de planta pós colheita um agente de controle biológico que compreende NRRL n° B-50897, em que o referido agente de controle biológico controla o referido patógeno vegetal.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o referido método compreende, ainda, aplicar um herbicida, um fungicida, um inseticida, um pesticida ou uma combinação dos mesmos, à planta ou parte de planta.

3. Método, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado** pelo fato de que o fungicida compreende protioconazol, azoxistrobina, fluopicolide, fosetil, clorotalonil, fenexamida, flutriafol, difenoconazol, tebuconazol, tetraconazol, piraclostrobina, trifloxistrobina, propiconazol, fluoxastrobina, flutolanilo, metconazol ou metrafenona.

4. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o patógeno compreende um fungo.

5. Método, de acordo com a reivindicação 4, **caracterizado** pelo fato de que o patógeno compreende ferrugem asiática da soja, *Pythium aphanadermatum*, *Phytophthora parasitica*, *Rhizoctonia solani* ou *Botrytis cinerea*.

6. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, **caracterizado** pelo fato de que o patógeno vegetal compreende uma bactéria.

7. Método, de acordo com a reivindicação 6, **caracterizado** pelo fato de que a bactéria compreende *Erwinia*.

8. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, **caracterizado** pelo fato de que a referida planta é uma monocotiledônea.

9. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, **caracterizado** pelo fato de que a referida planta é uma dicotiledônea.

10. Método, de acordo com a reivindicação 8, **caracterizado** pelo fato de que a planta é milho, sorgo, trigo, arroz, cana-de-açúcar, cevada, aveia, centeio, painço, coco, abacaxi ou banana.

11. Método, de acordo com a reivindicação 9, **caracterizado** pelo fato de que a planta é girassol, tomate, batata, algodão, soja, beterraba, tabaco, batata-doce, alfafa, cártamo, amendoim, mandioca, café, cacau, pepino, alface, azeitona, ervilha, abacate, manga, mamão, morango, melão cantaloupe, melão comum, amêndoa ou chá.



FIGURA 1

