



**Assinado
Digitalmente**

REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA INDÚSTRIA, COMÉRCIO EXTERIOR E SERVIÇOS
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

CARTA PATENTE Nº PI 1006992-5

O INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL concede a presente PATENTE DE INVENÇÃO, que outorga ao seu titular a propriedade da invenção caracterizada neste título, em todo o território nacional, garantindo os direitos dela decorrentes, previstos na legislação em vigor.

(21) Número do Depósito: PI 1006992-5

(22) Data do Depósito: 26/01/2010

(43) Data da Publicação do Pedido: 29/07/2010

(51) Classificação Internacional: C12N 1/20; A01N 63/02.

(30) Prioridade Unionista: US 61/147,174 de 26/01/2009.

(54) Título: MÉTODO PARA CONTROLE DE NEMATOIDES E COMPOSIÇÃO NEMATICIDA

(73) Titular: SYNGENTA CROP PROTECTION AG, Pessoa Jurídica. Endereço: Schwarzwaldallee 215, 4058 Basel, SUIÇA(CH), Suíça

(72) Inventor: THOMAS E. HEWLETT; JOHN P. WATERS.

Código de Controle: 03250BE319CE3684 2E11D478DE3A0102

Prazo de Validade: 20 (vinte) anos contados a partir de 26/01/2010, observadas as condições legais

Expedida em: 18/12/2018

Assinado digitalmente por:
Liane Elizabeth Caldeira Lage
Diretora de Patentes, Programas de Computador e Topografias de Circuitos Integrados

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"MÉTODO PARA CONTROLE DE NEMATOIDES E COMPOSIÇÃO NEMATICIDA "**.

REFERÊNCIA A UM PEDIDO DE PATENTE RELACIONADO

5 Este pedido de patente reivindica o benefício do Pedido Provisório de Patente Americana No. Serial 61/147.174, depositado em 26 de janeiro de 2009, a revelação do qual é por meio deste incorporado por referência em sua totalidade, incluindo todas as figuras, tabelas ou desenhos.

ANTECEDENTES DE INVENÇÃO

10 Os nematoides parasíticos vegetais infligem perdas de safras à agricultura mundial atualmente estimadas exceder US\$ 100 bilhões anualmente. A prevenção deste dano representa um desafio significativo. Com a perda iminente do fumigante brometo de metila, não há tempo suficiente para desenvolver e registrar novos compostos sintéticos para controle de nematoides.

15 Nematoides fitopatogênicos são particularmente difíceis de controlar porque são recobertos por uma cutícula espessa, impermeável, ou cobertura externa, e têm muito poucos neurônios sensoriais. Uma vez que muitos compostos de controle de pestes operam como neurotoxinas, o baixo número de neurônios expostos por nematoides fitopatogênicos reduz a área
20 alvo eficaz de compostos nematicidas e resultou no desenvolvimento de compostos nematicidas com propriedades neurotóxicas seletivamente altas. Além disso, como os nematoides fitopatogênicos são encontrados no solo ou nas raízes vegetais, exposição de nematoides fitopatogênicos a agentes de controle é difícil de alcançar e coloca o lençol d'água em risco de contaminação com aqueles compostos tóxicos. O uso de nematicidas baseados em
25 neurotoxinas foi demonstrado contaminar tanto a água subterrânea como superficial. Consequentemente, muitos destes compostos estão sendo removidos do mercado por razões de saúde pública.

30 O nematoide reniforme, também conhecido como *Rotylenchulus reniformis*, é a espécie mais economicamente importante no gênero *Rotylenchulus*. As fêmeas do nematoide reniforme causam grande prejuízo no sistema radicular de plantas vivendo parcialmente dentro das raízes. O

termo "reniforme" refere-se ao corpo de forma de rim das fêmeas maduras. Reniforme também pode fazer com que às plantas sejam mais suscetíveis a outros organismos causadores de doença.

5 Nematoides reniformes parasitam as raízes de uma ampla variedade de espécies vegetais, incluindo algodão, ervilha de vaca, batata doce, soja, abacaxi, chá, e várias verduras, tais como tomate, quiabo, abóbora e alface. Patogenicidade de nematoides reniformes tem impactado muito a agricultura. Por exemplo, causaram uma redução de 40 a 60% do rendimento de algodão na Luisiana, junto com um aumento em murcha de *Fusarium*.

10 Fumigação de solo antes da plantação é um método popular para controle de nematoides. Um dos fumigantes mais populares, brometo de metila, está previsto para remoção do uso por causa de suas propriedades de destruição de ozônio. Além disso, esta prática da fumigação de solo mata organismos no solo indiscriminadamente e corre-se o risco de eliminar mi-
15 cróbios benéficos bem como organismos causadores de doença. Estima-se que o mercado total de um nematicida eficaz com efeitos ambientais benignos aproxime-se de um bilhão de dólares em uma base mundial.

Pasteuria foi primeiro descrito em 1888 por Metchnikoff (Annales de l'Institut Pasteur 2:165-170) como um parasita de pulgas d'água. Posteriormente, Cobb descreveu uma infecção por *Pasteuria* do nematoide *Dorylaimus bulbiferous* (2ª ed. Hawaiian Sugar Planters Assoc. Expt. Sta. Div. Path. Physiol. Touro. 5:163-195, 1906).
20 *Pasteuria* do nematoide *Dorylaimus bulbiferous* (2ª ed. Hawaiian Sugar Planters Assoc. Expt. Sta. Div. Path. Physiol. Touro. 5:163-195, 1906).

 O ciclo de vida das bactérias começa quando endósporos se ligam à cutícula dos nematoides no solo. *Pasteuria* proliferam dentro do corpo
25 do nematoide e passam por várias fases morfológicas documentadas, incluindo estruturas miceliais e de hastes, que culmina no desenvolvimento dos endósporos. Endósporos são liberados quando o corpo de nematoide se rompe. Crescimento das bactérias dentro do corpo de nematoide reduz ou elimina a produção de ovos pelo nematoide, restringindo severamente a taxa
30 da reprodução do nematoide. O dano econômico à cultura hospedeira normalmente é causado pela progênie de primeira geração de nematoides e é evitado por *Pasteuria* pela redução da concentração de nematoides de pro-

gênie na zona radicular vegetal.

Enquanto as cepas de *Pasteuria* foram produzidas em múltiplas espécies de nematoide, tais como *Meloidogyne incognita* (Verdeho, S. and R. Mankau. 1986. *Journal of Nematology*, 18:635) e *Meliodogyne arenaria* (Patente Americana No. 6.919.197), nenhuma cepa de *Pasteuria* foi observada ou cultivada com sucesso em nematoides Reniformes até agora.

BREVE SUMÁRIO

A presente invenção refere-se a uma cepa nova e vantajosa de bactérias *Pasteuria* que parasitam nematoides Reniformes. Esta cepa foi depositada na American Type Culture Collection e foi atribuído o número de depósito ATCC PTA-9643.

Estas bactérias são capazes de produzir endósporos que têm a propriedade única e útil de serem capazes de ligar-se, infectar, crescer, re-
esporular e matar nematoides Reniformes e outros nematoides fitopatogênicos.

A presente invenção também inclui mutantes da cepa de *Pasteuria* descrita que têm substancialmente as mesmas propriedades nematicidas ou melhoradas. Procedimentos para produção de mutantes são bem conhecidos na técnica microbiológica. Por exemplo, luz ultravioleta e nitrosoguanidina são usadas extensivamente em direção a este fim.

A presente invenção refere-se ainda a variantes dos micróbios exemplificados. As variantes podem ser identificadas, por exemplo, por sequências polinucleotídicas que são altamente homólogas com sequências do isolado exemplificado bem como tendo a atividade biológica desejada contra nematoides Reniformes.

A presente invenção ainda inclui composições compreendendo uma quantidade nematicidicamente eficaz de endósporos da cepa de bactérias *Pasteuria* descrita e o uso destas composições para controlar nematoides fitopatogênicos.

Em uma modalidade, uma semente vegetal é primeiro tratada com um aderente que pode se aderir aos esporos *Pasteuria* e/ou uma composição contendo os esporos. O aderente pode ser, por exemplo, uma cola

e/ou um ou mais polímeros ou copolímeros. Exemplos de aderentes incluem, mas não são limitados a, colas (tais como cola ELMERS™); acetato de polivinila; materiais de silicone; e materiais inorgânicos naturais, tais como sílica-gel e argila.

5 Outro aspecto da invenção objeto fornece uma semente tendo pelo menos parte de sua superfície recoberta com uma composição de *Pasteuria*, em que a composição de *Pasteuria* compreende uma quantidade eficaz de esporos de *Pasteuria* para controle de nematoide.

BREVE DESCRIÇÃO DAS SEQUÊNCIAS

10 **SEQ ID NO: 1** é uma sequência parcial 16S de rDNA da bactéria de acordo com uma modalidade da invenção.

SEQ ID NO: 2 é uma sequência parcial *spoIIAB* da bactéria de acordo com uma modalidade da invenção.

15 **SEQ ID NO: 3** é uma sequência parcial *atpA* da bactéria de acordo com uma modalidade da invenção.

SEQ ID NO: 4 é uma sequência parcial *atpF* da bactéria de acordo com uma modalidade da invenção.

DESCRIÇÃO DETALHADA

20 A nova cepa bacteriana da invenção objeto tem atividade nematocida contra nematoides fitopatogênicos incluindo nematoides Reniformes. Uma cultura do micróbio foi depositada na American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Blvd., Manassas, Va. 20110-2209 EUA. Foi atribuído ao depósito o número de acesso ATCC N. PTA-9643 pelo repositório e foi depositado em 4 de dezembro de 2008.

25 A cultura objeto foi depositada sob condições que asseguram que o acesso à cultura estará disponível durante a pendência deste pedido de patente a alguém determinado pelo Comissário de Patentes e Marcas Comerciais para ter direito a este sob 37 CFR 1.14 e 35 U.S.C 122. O depósito está disponível como necessário por leis de patentes estrangeiras em
30 países em que os equivalentes do pedido de patente objeto, ou sua progênie, são depositados. Entretanto, deve ser entendido que a disponibilidade de um depósito não constitui uma licença para praticar a invenção objeto em

derrogação de direitos de patentes concedidos pela ação governamental.

Além disso, o depósito da cultura objeto será armazenado e colocado à disposição ao público de acordo com as disposições do Tratado de Budapeste para o Depósito de Microrganismos, isto é, será fornecido com
5 todo o cuidado necessário para mantê-lo viável e não contaminado durante um período de pelo menos cinco anos após o pedido mais recente para o suprimento de uma amostra do depósito, e em todo o caso, durante um período de pelo menos 30 (trinta) anos após data do depósito ou durante a obrigatoriedade de qualquer patente que pode ser emitida na descrição da
10 cultura. O depositante reconhece o dever de substituir o depósito, deveria o depositário ser incapaz de fornecer uma amostra quando solicitado, devido à condição do depósito. Todas as restrições na disponibilidade ao público do depósito de cultura objeto serão irrevogavelmente removidas sobre a adjudicação de uma patente descrevendo-a.

15 Como usado neste pedido, referência a "isolado" significa que a cepa é removida do ambiente no qual existe na natureza. Dessa forma, a cepa isolada pode existir como, por exemplo, uma cultura biologicamente pura, ou como esporos (ou outras formas da cepa) em associação com um veículo agrícola.

20 Como usado neste pedido, o termo "compreendendo" ainda contempla cenários nos quais a composição e/ou o método "consiste de" ou "consiste essencialmente de" componentes e/ou etapas citados. Como usado neste pedido, referência a "consiste essencialmente de" refere-se à situação onde os componentes e/ou etapas adicionais são somente aqueles que
25 não afetam a atividade pesticida da composição e/ou método.

Uma "quantidade nematocidicamente eficaz" como usada neste pedido refere-se a uma quantidade de esporos de *Pasteuria* capaz de eliminação, controle ou infecção de nematoides; retardo do crescimento ou reprodução de nematoides; redução de uma população de nematoide; e/ou
30 redução do dano a plantas causado por nematoides.

Em modalidades específicas, a invenção objeto fornece cepa bacteriana ATCC PTA-9643 e mutantes da mesma. Os procedimentos para

produção de mutantes são bem conhecidos na técnica microbiológica. Por exemplo, luz ultravioleta e nitrosoguanidina são usadas extensivamente em direção a este fim.

Esta cepa foi verificada ser uma nova cepa de *Pasteuria*. SEQ
5 ID NOs:1 a 4 são sequências polinucleotídicas de certos genes das bactérias da invenção objeto.

Em outros aspectos, a invenção fornece variantes ATCC PTA-9643 tendo atividade nematicida. Em uma modalidade, uma "variante" tem uma sequência polinucleotídica que hibridiza sob alta estringência com pelo
10 menos uma, preferencialmente, 2, 3, ou todas as 4 das SEQ ID NO:1 a 4.

"Hibridização" refere-se a uma reação na qual um ou mais polinucleotídeos reagem para formar um complexo que é estabilizado através de ligação de hidrogênio entre uma purina particular e uma pirimidina particular nas moléculas de ácido nucleico de fita dupla (DNA-DNA, RNA-DNA ou
15 RNA-RNA). Os pareamentos específicos principais são guanina com citosina e adenina com timina ou uracila. Vários graus da estringência da hibridização podem ser empregados. Quanto mais severas as condições, maior complementaridade é necessária para a formação de dúplex. Severidade de condições pode ser controlada por temperatura, concentração de sonda,
20 comprimento de sonda, força iônica, tempo e similares.

Preferencialmente, hibridização é conduzida sob condições de alta estringência por técnicas bem conhecidas na técnica, como descrito, por exemplo, em Keller, G.H. & M.M. Manak, *DNA Probes*, e o volume acompanhante *DNA Probes: Background, Applications, Procedures* (várias edições,
25 incluindo a 2ª Edição, Nature Publishing Group, 1993). Hibridização também é descrita extensivamente nos manuais Molecular Cloning publicados por Cold Spring Harbor Laboratory Press, incluindo Sambrook & Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2001). Cada uma destas publicações é incorporada neste pedido por referência em sua totalidade.

30 Um exemplo não limitante de condições de alta estringência para hibridização é pelo menos aproximadamente SSC 6X e SDS 1% a 65°C, com uma primeira lavagem por 10 minutos a aproximadamente 42°C com

aproximadamente formamida 20% (v/v) em SSC 0,1X, e com uma lavagem subsequente com SSC 0,2X e SDS 0,1% a 65°C. Um exemplo não limitante de condições de hibridização são condições selecionadas para ser aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, ou 25°C mais baixo do que o ponto de fusão térmica (T_m) da sequência específica na solução particular. T_m é a temperatura (dependente de força iônica e pH) no qual 50% da sequência alvo hibridizam a uma sonda perfeitamente combinada. T_m tipicamente aumenta com concentração $[Na^+]$ porque os cátions sódio protegem eletrostaticamente os grupos fosfato aniônicos dos nucleotídeos e minimizam sua repulsão. As lavagens empregadas podem ser de aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30, ou mais minutos cada uma, e pode ser de estringência crescente, se desejado.

Cálculos para estimativa de T_m são bem conhecidos na técnica. Por exemplo, a temperatura de fusão pode ser descrita pela seguinte fórmula (Beltz, G.A., K.A. Jacobs, T.H. Eickbush, P.T. Cherbas, and F.C. Kafatos, *Methods of Enzymology*, R. Wu, L. Grossman and K. Moldave [eds.] Academic Press, New York 100:266-285, 1983).

$$T_m = 81,5^{\circ}\text{C} + 16,6 \log[Na^+] + 0,41(\% \text{ G+C}) - 0,61(\% \text{ formamida}) - 600/\text{comprimento do dúplex em pares de bases.}$$

Uma estimativa mais exata de T_m pode ser obtida usando modelos de vizinho mais próximo. Breslauer, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83:3746-3750 (1986); SantaLucia, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95: 1460-1465 (1998); Allawi & SantaLucia, *Biochemistry* 36:10581-94 (1997); Sugimoto *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 24:4501-4505 (1996). T_m também pode ser rotineiramente medida pela calorimetria de varredura diferencial (Duguid *et al.*, *Biophys J*, 71:3350-60, 1996) em uma solução escolhida, ou por outros métodos conhecidos na técnica, tais como fusão monitorada por UV. Como a estringência das condições de hibridização é aumentada, graus mais altos de homologia são obtidos.

Métodos típicos que podem ser usados para identificar a presença da sequência de DNA como descrito neste pedido incluem e não são limitados à detecção de uma hibridização de sequência de DNA específica

usando oligonucleotídeos específicos, sequenciamento de DNA direto, digestão por enzima de restrição, proteção de RNase, clivagem química e detecção mediada por ligase.

Um exemplo de uma variante de ATCC PTA-9643 é uma cepa
5 contendo um polinucleotídeo que tem identidade de sequência maior que 85, 90, 95, 98, ou 99% para todas ou qualquer uma das SEQ ID NOS:1 a 4.

A estrutura cristalina de uma F1-Atpase é dada por Stocker *et al.*, *Structure* 15(8):904-914 (2007) e a função de F1-Atpase foi extensivamente estudada. Ver, por exemplo, Itoh *et al.*, "Mechanically driven ATP
10 synthesis by F1-Atpase" *Nature* 427 (6973):407-8 (2004), bem como as referências citadas neste. Em certas modalidades da invenção, as sequências variantes de atpA codificam um polipeptídeo que conserva pelo menos 1, 2, 3, 4, 5 ou todas as diferenças da SEQ ID NO:4 em relação à porção correspondente de NCBI gi 93007315 de *Pasteuria ramosa*.

15 A proteína spollAB é um fator anti-sigma. Duncan & Losick, *Proc Natl Acad Sci USA*, 90 (6): 2325-2329 (1993). Uma variedade de estruturas cristalinas está disponível. Masuda *et al.*, *J Mol Biol*, 340(5):941-956 (2004); Campbell *et al.*, *Cell*, 108(6):795-807 (2002). Em certas modalidades da invenção, as sequências variantes de spollAB codificam um polipeptídeo que
20 conserva pelo menos 1, 2, 3, 4, 5 ou todas as diferenças da SEQ ID NO:2 em relação à porção correspondente de NCBI gi 30173229 de *Pasteuria penetrans* e/ou NCBI gi 93007308 de *Pasteuria ramosa*.

Dados estruturais e funcionais da subunidade de *E. coli* ATP sintase b são dados, por exemplo, por Del Rizzo *et al.*, *J Mol Biol*, 364 (4):735-
25 46 (2006); e Claggett *et al.*, *J Bacteriol*, 189 (15):5463-5471 (2007). Em certas modalidades da invenção, as sequências variantes de atpF codificam um polipeptídeo que conserva pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, ou todas as diferenças da SEQ ID NO:3 em relação às porções correspondentes de NCBI gi 41019057 de *Pasteuria penetrans* e/ou NCBI gi 93007313 de *Pasteuria ramosa*.
30

Em certas modalidades da invenção, cepas de *Pasteuria penetrans* que parasitam nematoides reniformes são aquelas cepas de *Pasteuria*

que estão filogeneticamente mais estritamente relacionadas à ATCC PTA-9643 do que a alguma cepa de *Pasteuria* atualmente conhecida (ou, alternativamente, mais estritamente relacionadas à ATCC PTA-9643 do que qualquer cepa conhecida de *Pasteuria penetrans* não reniforme parasitante),

5 como determinado pela análise regular de 16 sequências ribossomais. Uma variedade de instrumentos e dados adequados para a análise de 16s de rDNA é conhecida na técnica. Os seguintes números de acesso devolvidos por NCBI Blast do banco de dados "nr" fornecem 16 sequências ribossomais referidas pelo número NCBI gi: 157357381; 145690675; 55168340;

10 215499254; 29169172; 197777542; 153816650; 189353846; 154483090; 27360487; 153816533; 27359371; 10039641; 153816651; 153813776; 169191254; 77959837; 223489039; 224155181; 197766214; 197782632; 223475320; 165924309; 225111262; 50363539; 169189407; 119632772; 167630417; 147836457; 321193; 47570202; 229499565; 29565682;

15 5531888; 27360062; 197763227; 121592110; 227495267; 3256603; 197781048; 154500167; 154500794; 150251526; 197735635; 153813782; 167425567; 212632978; 15921449; 218151942; 163781875; 169869672; 78033426; 157354103; 40062645; 115762746; 83595848; 196018328; 115379816; 1780806; 198417694; 154500170; 108707408; 224033543;

20 223947683; 226443382; 237831283; 195614328; 194703406; 212274346; 149633895; 118086080; 119178984; 74007189; 197768010; 191162148; 219461701; 169213810; 167630416; 19927; 196018322; 182701819; 156341374; 115467400; 126433538; 119190145; 56422945; 50545958; 223466311; 212507121; 197762411; 169194840; 192291641; 152012802;

25 3831447; 67903352; 3256604; 171686416; 158294661; 154273901; 119720343. Em certas modalidades da invenção, as sequências variantes de 16s de rDNA codificam RNA que conservam pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, ou todas as diferenças em relação a uma ou mais (ou qualquer combinação) das sequências 16s de rDNA apresentadas neste parágrafo. Em certas mo-

30 dalidades, as sequências 16 rDNA apresentadas pelo número NCBI gi neste parágrafo podem ser excluídas da invenção reivindicada.

Grandes quantidades destas bactérias podem ser produzidas

usando técnicas de fermentação. Esporulação ocorre a partir da última fase vegetativa das bactérias com produção de esporos maduros, dormentes. Endósporos de *Pasteuria* não são danificados por secagem. Por isso, podem ser armazenados por longos períodos à temperatura ambiente.

5 Métodos para cultura de *Pasteuria* são conhecidos na técnica e incluem, por exemplo, os métodos descritos nas Patentes Americanas Nos. 5.094.954 e 7.067.299, ambas as quais são incorporadas neste pedido por referência em sua totalidade.

A presente invenção ainda fornece composições de endósporo bacteriano úteis para o controle de pestes. Especificamente exemplificadas são composições de endósporo de bactérias que são patogênicas a nematoides e crescem dentro ou sobre tecido de nematoide vivo.

Os endósporos podem ser formulados em um pó molhável, concentrado líquido, grânulos ou outras formulações pela adição de tensoativos, dispersantes, veículos inertes e outros componentes para obter uma composição nematicida que facilita manejo e aplicação para nematoides alvo particulares.

A preparação comercial teria uma alta concentração de endósporos, tipicamente mais de 1×10^7 esporos/ml e preferencialmente mais de 1×10^9 esporos por ml ou grama de produto seco.

A composição também pode incluir um ou mais dos seguintes ingredientes: outros pesticidas, incluindo compostos que atuam somente embaixo da terra; fungicidas, tais como captan, tiram, metalaxila, fludioxonil, oxadixila, e isômeros de cada um daqueles materiais, e similares; herbicidas, incluindo compostos selecionados a partir de carbamatos, tiocarbamatos, acetamidas, triazinas, dinitroanilinas, éteres de glicerol, piridazinonas, uracilas, fenóis, ureia e ácidos benzoicos; agentes protetores herbicidas, tais como benzoxazina, derivados benzidril, N,N-dialil dicloroacetamida, vários compostos di-haloacila, oxazolidinila e tiazolidinila, etanona, compostos de anidrido naftálico e derivados oxima; fertilizantes; e agentes de biocontrole, tais como outras bactérias que ocorrem naturalmente ou recombinantes e fungos dos gêneros *Rhizobium*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Tricho-*

denna, Glomus, Gliocladium e fungos micorrizais.

Estes procedimentos de formulação e aplicação são todos bem conhecidos na técnica e são usados com cepas comerciais de *Pasteuria*. A composição nematicida pode ser pulverizada ou aplicada na folhagem para
5 controlar nematoides fitopatogênicos.

Outra abordagem que pode ser tomada é incorporar os endósporos em grânulos, opcionalmente contendo um atrativo, e aplicando estes grânulos ao solo para controle dos nematoides que habitam no solo. Tipicamente, no contato com água, os esporos são liberados do grânulo e em seguida os esporos se aderem e infectam os nematoides. Esporos formulados
10 também podem ser aplicados como um revestimento de sementes para tratamento de raiz ou tratamento vegetal total.

A quantidade dos endósporos aplicada necessita ser nematicidamente eficaz. Em uma modalidade, menos de um quarto dos endósporos por acre é suficiente para alcançar o controle de nematoide eficaz.
15

Vantajosamente, as composições são fáceis de aplicar com o equipamento de aplicação convencional. O modo de ação do endósporo torna o desenvolvimento de resistência improvável. A maioria dos nematicidas disponíveis deve ser aplicada ao solo antes da plantação, porque os produtos químicos prejudicariam de outra maneira as plantas. Em contrapartida, esta cepa de *Pasteuria* não danificará as plantas, e pode ser aplicada em qualquer momento.
20

Outro aspecto da invenção fornece sementes tratadas com a composição objeto de *Pasteuria*. Uma modalidade fornece sementes tendo pelo menos parte da área superficial recoberta com a composição de *Pasteuria*. Em uma modalidade específica, as sementes tratadas com *Pasteuria* têm uma concentração de esporo de aproximadamente 10^6 a aproximadamente 10^9 esporos por semente. As sementes também podem ter mais esporos por semente, tal como, por exemplo, 1×10^{10} , 1×10^{11} ou 1×10^{12} esporos por semente.
25
30

Materiais e métodos da invenção objeto podem ser usados para redução do dano para espécies de plantas, incluindo, mas não limitados a,

feijões verdes, gramas desportivas, batata doce, tomates, algodão, milho, feijões soja, quiabo, alface, abóbora, verduras, abacaxi, chá, trigo, cevada, arroz e canola.

5 A seguir é um exemplo, que ilustra procedimentos para prática da invenção. Este exemplo não deve ser interpretado como limitação. Todas as porcentagens são por peso e todas as proporções de mistura de solvente são por volume a menos que de outra maneira observado.

EXEMPLO 1 - TRATAMENTOS DE SEMENTES

10 Conforme a invenção objeto, os esporos de *Pasteuria* podem ser efetivamente entregues para controlar nematoides fitopatogênicos pelo revestimento com os esporos de *Pasteuria* em sementes vegetais.

Os esporos de *Pasteuria* podem recobrir irrestritamente as sementes ou, preferencialmente, podem ser formulados em uma composição líquida ou sólida antes de recobrir as sementes. Por exemplo, uma composi-
15 ção sólida compreendendo os esporos pode ser preparada pela mistura de um veículo sólido com uma suspensão de esporos até que os veículos sólidos estejam impregnados pela suspensão de esporos. Esta mistura então pode ser seca para obter as partículas desejadas.

Os veículos sólidos são preferencialmente grânulos. Os grânulos
20 podem ser, por exemplo, grânulos de terra diatomácea de AXIS® e/ou grânulos de argila Greens Grade de PROFILE®. Vários aditivos, tais como aderentes, dispersantes, tensoativos, e ingredientes nutricionais e tamponados, também podem estar incluídos no veículo e mistura de suspensão de esporos.

25 Em uma modalidade específica, além dos esporos, o revestimento pode compreender ainda uma camada de aderente. O aderente deve ser não tóxico, biodegradável, e adesivo. Exemplos de tais materiais incluem, mas não são limitados a, acetato de polivinila; copolímeros de acetato de polivinila; alcoóis de polivinila; copolímeros de álcool polivinílico; celulo-
30 ses, tais como metilceluloses, hidroximetilceluloses e hidroximetilpropilceluloses; dextrinas; alginatos; açúcares; melaço; polivinilpirrolidonas; polissacarídeos; proteínas; gorduras; óleos; goma arábica; gelatina; xaropes; e ami-

dos. Mais exemplos podem ser encontrados, por exemplo, na Patente U.S. a No. 7.213.367, que é incorporada por referência neste pedido em sua totalidade.

5 A camada aderente pode auxiliar a ligar os esporos na superfície da semente e prevenir possíveis declínios acentuados. Além disso, o revestimento também pode compreender outros agentes químicos ou biológicos tendo um efeito benéfico na combinação com os esporos de *Pasteuria* para controle de nematoide e/ou para controle de outras pestes. Os revestimentos também podem incluir fertilizantes e outros componentes que auxiliam a
10 promover germinação de semente, e/ou crescimento e/ou saúde vegetal.

Dessa forma, a invenção objeto fornece um método de produção de um revestimento de esporo de *Pasteuria* em uma semente vegetal. Em uma modalidade específica, o método compreende combinação de misturas secas de grânulo impregnadas por esporos de *Pasteuria* e uma semente
15 recoberta com um aderente.

Embora os tratamentos de semente possam ser aplicados a uma semente em qualquer estado fisiológico, é preferencial que a semente esteja em um estado suficientemente durável que não cause nenhum dano durante o processo de tratamento. Tipicamente, a semente foi coletada do campo;
20 removida da planta; e separada de qualquer outro material vegetal não semente. A semente é preferencialmente biologicamente estável até o ponto em que o tratamento não cause dano biológico à semente. Em uma modalidade, por exemplo, o tratamento pode ser aplicado para semear milho que foi colhido, limpo e seco a um conteúdo de umidade abaixo de aproximada-
25 mente 15% por peso. Em uma modalidade alternativa, a semente pode ser aquela que foi seca e em seguida preparada com água e/ou outro material e em seguida seca novamente antes ou durante o tratamento com a composição de esporo de *Pasteuria*. Dentro das limitações apenas descritas, o tratamento pode ser aplicado à semente em qualquer momento entre a coleta da semente e a disseminação da semente. Como usado neste pedido, o
30 termo "semente não semeada" está destinado a incluir a semente em qualquer período entre a coleta da semente e a disseminação da semente na

terra para fins de germinação e crescimento da planta.

Como usado neste pedido, quando é dito que a semente não semeada é "tratada" com a composição contendo *Pasteuria*, entende-se que tal tratamento inclui aquelas práticas nas quais *Pasteuria* são aplicadas ao solo, em vez de à semente.

Os esporos de *Pasteuria* são tipicamente aplicados às sementes na forma de uma formulação de pesticida. Esta formulação pode conter um ou mais componentes desejáveis incluindo mas não limitados a diluentes líquidos, ligadores, enchedores para proteger as sementes durante as condições de estresse, e plastificantes para melhorar a flexibilidade, adesão e/ou dispersibilidade do revestimento. Além disso, pode ser desejável adicionar à formulação, agentes de secagem, tais como carbonato de cálcio, caulim ou argila bentonita, perlita, terra diatomácea ou qualquer outro material adsorvente. O uso de tais componentes em tratamentos de semente é conhecido na técnica. Vide, por exemplo, Patente U.S. No. 5.876.739. O versado, tendo o benefício da descrição atual, pode selecionar prontamente componentes desejáveis para usar na formulação.

As sementes também podem ser tratadas com um ou mais dos seguintes ingredientes: outros pesticidas, incluindo compostos que atuam somente embaixo da terra; fungicidas, tais como captan, tiram, metalaxils, fludioxonils, oxadixils, e isômeros de cada um daqueles materiais, e similares; herbicidas, incluindo compostos selecionados a partir de glifosato, carbamatos, tiocarbamatos, acetamidas, triazinas, dinitroanilinas, éteres de glicerol, piridazinonas, uracilas, fenóis, ureia, e ácidos benzoicos; agentes protetores herbicidas, tais como benzoxazina, derivados benzidril, N,N-dialil dicloroacetamida, vários compostos di-haloacila, oxazolidinila e tiazolidinila, etanona, compostos de anidrido naftálico, e derivados oxima; fertilizantes; e agentes de biocontrole, tais como outras bactérias que ocorrem naturalmente ou recombinantes e fungos dos gêneros *Rhizobium*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Trichoderma*, *Glomus*, *Gliocladium* e fungos micorrizais. Estes ingredientes podem ser adicionados como uma camada separada na semente ou alternativamente podem ser adicionados como parte da composi-

ção de *Pasteuria*.

Preferencialmente, a quantidade da nova composição ou outros ingredientes usados no tratamento de semente não deve inibir a germinação da semente, ou causar dano fitotóxico à semente.

5 A formulação que é usada para tratar a semente na presente invenção pode ser na forma de uma suspensão; emulsão; pasta fluida de partículas em um meio aquoso (por exemplo, água); pó molhável; grânulos molháveis (dispersíveis secos); e grânulos secos. Se formulado como uma suspensão ou pasta fluida, a concentração do ingrediente ativo na formulação é
10 preferencialmente aproximadamente 0,5% a aproximadamente 99% por peso (p/p), preferencialmente 5 a 40% ou como de outra maneira formulado pelos versados na técnica.

Como mencionado acima, outros ingredientes inativos ou inertes convencionais podem ser incorporados na formulação. Tais ingredientes
15 inertes incluem mas não são limitados a: agentes adesivos convencionais; agentes dispersantes, tais como metilcelulose (Methocel A15LV ou Methocel A15C, por exemplo, servem como agentes dispersantes/adesivos combinados para uso em tratamentos de sementes); álcool polivinílico (por exemplo, Elvanol 51-05); lecitina (por exemplo, Yelkinol P), dispersantes poliméricos
20 (por exemplo, polivinilpirrolidona/acetato de vinila PVPIVA S-630); espessantes (por exemplo, espessantes de argila, tais como Van Gel B para melhorar a viscosidade e reduzir o assentamento de suspensões de partículas); estabilizantes de emulsão; tensoativos; compostos anticongelantes (por exemplo, ureia), corantes, colorantes e similares. Ingredientes inertes adicionais
25 úteis na presente invenção podem ser encontrados em McCutcheon, volume 1, "Emulsifiers and Detergents," MC Publishing Company, Glen Rock, N.J., U.S.A., 1996. Ingredientes inertes adicionais úteis na presente invenção podem ser encontrados em McCutcheon, volume 2, "Functional Materials," MC Publishing Company, Glen Rock, N.J., U.S.A., 1996.

30 As formulações de revestimento da presente invenção podem ser aplicadas a sementes por uma variedade de métodos, incluindo, mas não limitadas a, mistura em um recipiente (por exemplo, uma garrafa ou bol-

sa), aplicação mecânica, tombamento, pulverização e imersão. Uma variedade de material ativo ou inerte pode ser usada para contato de sementes com pesticidas de acordo com a presente invenção, tais como materiais de revestimento do filme convencionais incluindo mas não limitados a materiais de revestimento de filme baseados em água, tais como SEPIRET™ (Seppic, Inc, Fairfield, N.J.) e OPACOAT™ (Berwind Pharm. Services, Westpoint, Pa).

Métodos de revestimento de sementes e composições que são conhecidas na técnica são úteis quando são modificados pela adição de uma das modalidades da presente invenção. Tais métodos de revestimento e o aparato para sua aplicação são descritos, por exemplo, nas Patentes U.S. Nos. 5.918.413, 5.891.246, 5.554.445, 5.389.399, 5.107.787, 5.080.925, 4.759.945 e 4.465.017. Composições de revestimento de sementes são descritas, por exemplo, nas Patentes U.S. Nos. 5.939.356, 5.882.713, 5.876.739, 5.849.320, 5.834.447, 5.791.084, 5.661.103, 5.622.003, 5.580.544, 5.328.942, 5.300.127, 4.735.015, 4.634.587, 4.383.391, 4.372.080, 4.339.456, 4.272.417 e 4.245.432, entre outras.

Ligadores que são úteis na presente invenção preferencialmente compreendem um polímero adesivo que pode ser natural ou sintético e não tem efeito fitotóxico sobre a semente a ser recoberta. O ligador pode ser selecionado de acetato de polivinila; copolímeros de acetato de polivinila; copolímeros etileno acetato de vinila (EVA); alcoóis de polivinila; copolímeros de álcool polivinílico; celuloses, incluindo etilceluloses, metilceluloses, hidroximetilceluloses, hidroxipropilceluloses e carboximetilcelulose; polivinilpirrolidonas; polissacarídeos, incluindo amido, amido modificado, dextrinas, maltodextrinas, alginato e quitosanas; gorduras; óleos; proteínas, incluindo gelatina e zeínas; goma arábica; gomas-lacas; cloreto de vinilideno e copolímeros de cloreto de vinilideno; lignossulfonatos de cálcio; copolímeros acrílicos; polivinilacrilatos; óxido de polietileno; polímeros e copolímeros de acrilamida; acrilato de poli-hidroxietila, monômeros de metilacrilamida; e policloropreno.

A quantidade de *Pasteuria* que é usada para o tratamento da semente variará dependendo do tipo da semente e do tipo de ingredientes

ativos, mas o tratamento compreenderá contato das sementes com uma quantidade de *Pasteuria* que é pesticidicamente eficaz. Como usado neste pedido, uma quantidade nematicidicamente eficaz significa que a quantidade de *Pasteuria* que eliminará os nematoides, ou que reduzirá constantemente ou que retardará a quantidade de dano causado pelos nematoides.

Os pesticidas que são usados no tratamento não devem inibir a germinação da semente e devem ser eficazes na proteção da semente e/ou a planta durante aquele tempo no ciclo de vida do nematoide no qual causa injúria à semente ou planta. Em geral, o revestimento será eficaz durante aproximadamente 1 hora a 120 dias após disseminação.

Os revestimentos formados com o pesticida são preferencialmente do tipo que é capaz de efetivar uma taxa lenta de liberação de pesticida por difusão ou movimento através da matriz ao meio circundante.

Além da camada de revestimento, a semente pode ser tratada com um ou mais dos seguintes ingredientes: outros pesticidas incluindo fungicidas e herbicidas; agentes protetores herbicidas; fertilizantes e/ou agentes de biocontrole. Estes ingredientes podem ser adicionados como uma camada separada ou alternativamente podem ser adicionados na camada de revestimento de pesticida.

A formulação de pesticida pode ser aplicada às sementes usando uma variedade de técnicas e máquinas, tais como técnicas de leito fluidizado, método de laminador, tratadores de semente rotoestáticos, e revestidores de tambor. Outros métodos, tais como leitos de jorro também podem ser úteis. As sementes podem ser pré-ajustadas antes do revestimento. Após revestimento, as sementes são tipicamente secas e em seguida transferidas para uma máquina de dimensionamento para dimensionamento. Tais procedimentos são conhecidos na técnica.

As sementes tratadas por *Pasteuria* também podem ser envolvidas com um sobre-revestimento de filme para proteger o revestimento. Tais sobre-revestimentos são conhecidos na técnica e podem ser aplicados usando leito fluidizado e técnicas de revestimento de filme de tambor.

Em outra modalidade da presente invenção, os esporos de *Pas-*

teuria podem ser introduzidos em uma semente pelo uso de condicionamento de matriz sólida. Por exemplo, uma quantidade dos esporos *Pasteuria* pode ser misturada com um material de matriz sólida e em seguida a semente pode ser colocada em contato com o material de matriz sólida por um período para permitir o pesticida ser introduzido na semente. A semente então pode ser opcionalmente separada do material de matriz sólida e armazenada ou usada, ou a mistura de material de matriz sólida mais semente pode ser armazenada ou plantada diretamente. Materiais de matriz sólida que são úteis na presente invenção incluem poliacrilamida, amido, argila, sílica, alumina, solo, areia, poliureia, poliacrilato ou qualquer outro material capaz de absorção ou adsorção de pesticida por um tempo e libera aquele pesticida dentro ou sobre a semente. É útil assegurar que o pesticida e o material de matriz sólida são compatíveis entre si. Por exemplo, o material de matriz sólida deve ser escolhido para que possa liberar o pesticida em uma taxa razoável, por exemplo, durante o período de minutos, horas ou dias.

Ao contrário da forma vegetativa das bactérias, esporos de *Pasteuria* não são danificados por secagem e podem ser armazenados por longos períodos à temperatura ambiente. Por isso, uma vantagem da invenção objeto consiste em que a secagem e outras etapas rigorosas usadas em métodos de revestimento podem ser aplicadas à invenção objeto do revestimento de sementes sem reduzir significativamente a eficácia dos esporos. A longa validade de sementes da invenção objeto também permite variações nos planejamentos de plantação. Além disso, a taxa de sobrevivência dos esporos de *Pasteuria* é muito mais alta do que a forma vegetativa das bactérias durante o transporte e disseminação uma vez colocados no solo.

Em geral, a quantidade eficaz de esporos varia de aproximadamente 1×10^5 a 1×10^{12} (ou mais) esporos/semente. Preferencialmente, a concentração de esporo é aproximadamente 1×10^6 a aproximadamente 1×10^9 esporos/semente.

Em uma modalidade, para obter as misturas de grânulos, a proporção de esporos de *Pasteuria* para grânulo é aproximadamente 3×10^7 a 5×10^7 esporos/g de grânulos. Em uma modalidade específica, aproximada-

mente 3 a 5 ml de uma suspensão de esporo de *Pasteuria* contendo aproximadamente 2×10^7 esporos/ml de tampão são adicionados a aproximadamente 2 g de grânulos. A proporção pode depender dos tipos de grânulo. Por exemplo, aproximadamente 5 ml de suspensão de esporos podem ser aplicados a 2 g de grânulos AXIS® enquanto aproximadamente 3 ml de suspensão de esporos são preferenciais para a mesma quantidade de grânulos PROFILE®. O aderente pode ser qualquer cola comercial biocompatível com a semente e solo, tal como cola escolar branca Elmer contendo acetato de polivinila.

10 Uma etapa extra de tratamento térmico pode ser incluída a fim de eliminar nematoides se os esporos forem produzidos em hospedeiros de nematoide. A etapa de tratamento térmico pode ser aplicada à suspensão de esporo antes da mistura com grânulos. Alternativamente, a etapa pode ser aplicada após formação de misturas de grânulo.

15 Todas as patentes, pedidos de patente, pedidos provisórios de patente e publicações referidas ou citadas neste pedido são incorporados por referência em sua totalidade, incluindo todas as figuras e tabelas, até o ponto em que não sejam inconsistentes com os ensinamentos explícitos deste relatório descritivo.

20 Deve ser entendido que os exemplos e modalidades descritas neste pedido são para fins ilustrativos somente e que várias modificações ou alterações à luz da mesma serão sugeridas aos versados na técnica e devem estar incluídas dentro do espírito e alcance deste pedido de patente.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para controle de nematoides, **caracterizado** pelo fato de que o dito método compreende contatar nematoides com uma quantidade nematocidicamente eficaz de uma cepa de *Pasteuria* que é depositada como número de
5 acesso ATCC PTA-9643.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o nematoide é um nematoide reniforme.

3. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o referido método é usado para proteger uma cultura selecionada a partir
10 do grupo consistindo em feijões verdes, gramas desportivas, batata doce, tomates, algodão, milho, feijões soja, quiabo, alface, abóbora, verduras, abacaxi, chá, trigo, cevada, arroz e canola.

4. Método, de acordo com a reivindicação 3, **caracterizado** pelo fato de que a cultura é algodão.

15 5. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que a cepa de *Pasteuria* é aplicada ao solo para controle de nematoides que habitam no solo.

6. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que a cepa de *Pasteuria* é aplicada antes ou durante a plantação.

20 7. Método, de acordo com a reivindicação 6, **caracterizado** pelo fato de que a cepa de *Pasteuria* é aplicada como um revestimento de sementes.

8. Composição nematicida, **caracterizada** pelo fato de que compreendendo uma quantidade nematicidicamente eficaz de uma cepa de *Pasteuria* como definido na reivindicação 1, e um veículo agrícola.