

TÍTULO DE PATENTE No. 351439

Titular(es): CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ASISTENCIA EN TECNOLOGÍA Y DISEÑO DEL ESTADO DE JALISCO, A.C.

Domicilio: Av. Normalistas No. 800, Col. Colinas de la Normal, 44270, Guadalajara, Jalisco, MÉXICO

Denominación: CEPA DE *STREPTOMYCES SP* CON ACTIVIDAD ANTAGÓNICA, COMPOSICIÓN QUE LA CONTIENE Y USO DE LA MISMA.

Clasificación: CIP: C12N1/20; A01N63/02; C12R1/465
CPC: C12N1/20; A01N63/02; C12R1/465

Inventor(es): ZAHAED EVANGELISTA MARTINEZ

SOLICITUD

Número: MX/a/2011/013044
Fecha de Presentación: 6 de Diciembre de 2011
Hora: 10:23

Vigencia: Veinte años

Fecha de Vencimiento: 6 de diciembre de 2031

Fecha de Expedición: 13 de septiembre de 2017

La patente de referencia se otorga con fundamento en los artículos 1º, 2º fracción V, 6º fracción III, y 59 de la Ley de la Propiedad Industrial.

De conformidad con el artículo 23 de la Ley de la Propiedad Industrial, la presente patente tiene una vigencia de veinte años improrrogables, contada a partir de la fecha de presentación de la solicitud y estará sujeta al pago de la tarifa para mantener vigentes los derechos.

Quien suscribe el presente título lo hace con fundamento en lo dispuesto por los artículos 6º fracciones III y 7º bis 2 de la Ley de la Propiedad Industrial (Diario Oficial de la Federación (D.O.F.) 27/06/1991, reformada el 02/06/1994, 25/10/1996, 26/12/1997, 17/05/1999, 26/01/2004, 16/06/2005, 25/01/2006, 06/05/2009, 06/01/2010, 18/06/2010, 28/06/2010, 27/01/2012 y 09/04/2012); artículos 1º, 3º fracción V inciso a), 4º y 12º fracciones I y III del Reglamento del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial (D.O.F. 14/12/1999, reformado el 01/07/2002, 15/07/2004, 28/07/2004 y 7/09/2007); artículos 1º, 3º, 4º, 5º fracción V inciso a), 10 fracciones I y III y 30 del Estatuto Orgánico del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial (D.O.F. 27/12/1999, reformado el 10/10/2002, 29/07/2004, 04/08/2004 y 13/09/2007); 1º, 3º y 6º inciso a) del Acuerdo que delega facultades en los Directores Generales Adjuntos, Coordinador, Directores Divisionales, Titulares de las Oficinas Regionales, Subdirectores Divisionales, Coordinadores Departamentales y otros subalternos del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial. (D.O.F. 15/12/1999, reformado el 04/02/2000, 29/07/2004, 04/08/2004 y 13/09/2007).

El presente oficio se signa con firma electrónica avanzada (FIEL), con fundamento en los artículos 7 BIS 2 de la Ley de la Propiedad Industrial; 3o de su Reglamento, y 1 fracción III, 2 fracción V, 26 BIS y 26 TER del Acuerdo por el que se establecen los lineamientos para el uso del Portal de Pagos y Servicios Electrónicos (PASE) del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial, en los trámites que se indican.

LA DIRECTORA DIVISIONAL DE PATENTES NAHANNY CANAL REYES

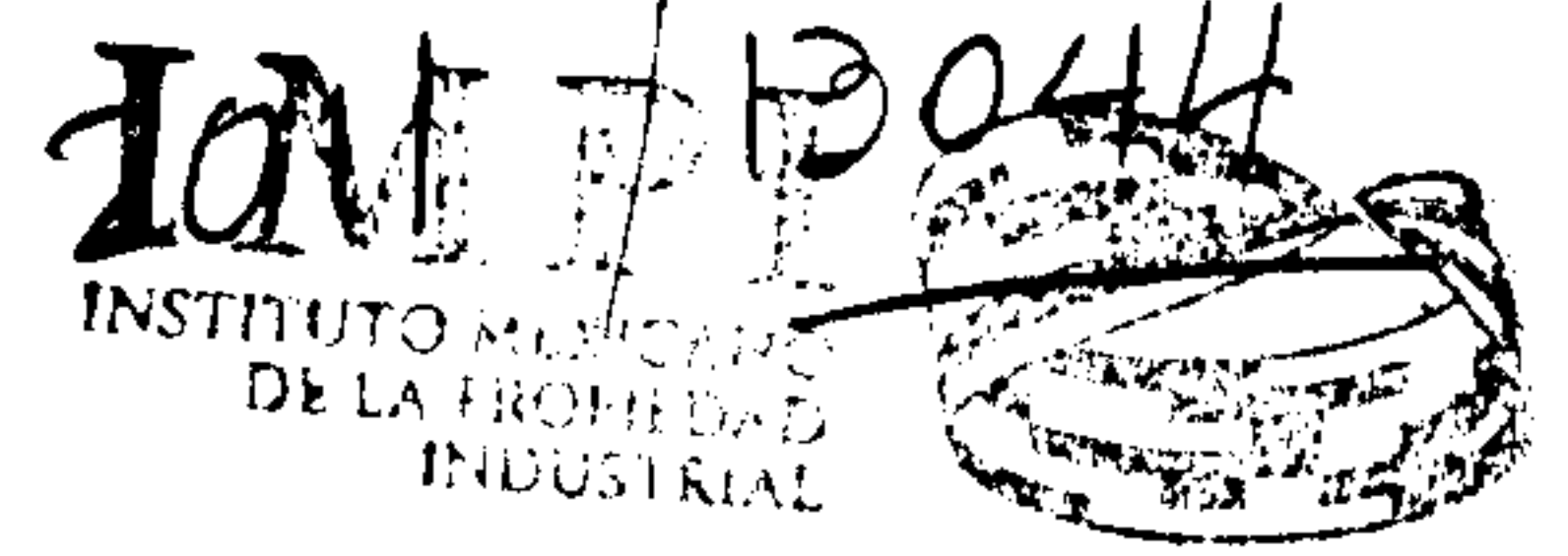


Cadena Original:
NAHANNY MARISOL CANAL REYES|00001000000403252793|Servicio de Administración Tributaria|1695|MX/2017/83562|MX/a/2011/013044|Título de patente normal|1220|RRGO|Pág(s) 1|jKuW2WlJJghHOvxdv6abA0lceOQ=

Sello Digital:
sZIV2/ig24MJL/+0sl0c7BzaAOdFbt8LPESW0xh5m1CJPh2909/CaeTWf1oDnfUIZkP/sToNR5g/hSRwuD601L7UIa f+pgb8ULjHWnHtl+hk9wMRReK4XZhcFpGJu4/3SAnvEQyFgZ8ksA8ccb4JVOksKxzzVT2fxYfcdjgu+H7X6RYMgnmiH MFbWSbla6qcOCne82yQxxQaF3/J9prfb20XwgaE/CB280qfl3BcZG/bJqloZJXHeSZVj0u1INaBbtXJ8P8CM5j7Ilb fLBvdOw7Ri/gvq0df3UK6Tnlwb8UrinaFW0dKS+ppq+6EGhnGlsIR0QSatfozOzVNFYQMHQ==



351439



**Cepa de *Streptomyces* sp con actividad antagónica, ~~composición que~~
la contiene y uso de la misma.**

CAMPO DE LA INVENCION

5 La presente invención pertenece al campo de la biotecnología,
específicamente al campo de la biotecnología agrícola, dado que
describe y reclama una cepa nueva de la bacteria *Streptomyces* sp,
llamada CACIS-1.16CA que es capaz de inhibir el crecimiento de
hongos fitopatógenos que afectan diversos cultivos hortícolas. Dicha
10 cepa de *Streptomyces* fue aislada del suelo en el Estado de
Campeche, México, específicamente en el municipio de Calkini. La
utilización de estas cepas ayuda a disminuir considerablemente el uso
de abonos y de pesticidas químicos, que pueden generar resistencia
en los hongos patógenos de plantas y dañar considerablemente el
15 medio ambiente y la salud de los humanos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

En las últimas décadas, la producción agrícola a nivel mundial ha
dependido cada vez más de los productos agroquímicos como un
20 método confiable de protección de los cultivos. Sin embargo, el
incremento en el uso de estos productos en el campo, ha generado

efectos negativos importantes como son la aparición de cepas
patógenas resistentes a los productos químicos y el impacto sobre el
medio ambiente.

La horticultura en México es una de las actividades más
5 importantes desde el punto de vista económico y social. Una de las
principales limitantes en la producción de estas hortalizas, son las
enfermedades bacterianas, fúngicas y virales, las cuales llegan a
generar pérdidas hasta del 100 % de la producción. De manera
particular, los hongos fitopatógenos son microorganismos que provocan
10 pérdidas económicas severas, ya que pueden causar enfermedades en
los cultivos. Esas enfermedades pueden provocar la muerte de las
semillas que están en proceso de germinación, reducir el vigor de las
plantas y afectar de manera adversa la producción de los cultivos.

Muchos países están cada día más conscientes de la
15 problemática de usar indiscriminadamente los pesticidas químicos y del
gran impacto que tienen sobre el medio ambiente, en los agricultores y
los consumidores de los productos agrícolas. Aunado a ello, los
patógenos han llegado a adquirir resistencia contra los pesticidas; en
consecuencia, deben buscarse métodos alternativos para el control de
20 las enfermedades de plantas y con ello reducir el efecto negativo de los
productos químicos. La reducción o el reemplazo de químicos pueden

llevarse a cabo con la aplicación de microorganismos benéficos que ataquen directamente a los patógenos o bien, que induzcan la expresión del sistema de defensa de las mismas plantas, o ambos.

Una de las razones por las cuales muchos de los cultivos agrícolas y sus productos no son destruidos completamente por las enfermedades o plagas es la presencia de agentes de control biológico, refiriéndose a ellos como aquellos organismos capaces de antagonizar con las plagas o patógenos, reduciendo sus efectos nocivos. Los agentes de control biológico pueden funcionar a través de varios modos de acción como:

5 la antibiosis, el parasitismo, la competencia, la hipovirulencia, y la inducción de respuestas de defensa de las plantas. Es de primordial importancia conocer la proporción y temporalidad que pueda llevarse a cabo en cada modo de acción. Este tipo de información puede obtenerse de estudios *in vitro* o usando plantas crecidas bajo

10 condiciones de esterilidad, donde la actividad potencial de estos agentes puede ser valorada.

15

El término Control Biológico se refiere a la reducción de la densidad o de las actividades productoras de enfermedades de un patógeno o parásito, en su estado activo o durmiente, lograda de

20 manera natural o a través de la manipulación del ambiente, del

hospedero o de antagonistas del patógeno o plaga que se quiere controlar.

En relación a los microorganismos, el Control Biológico se puede definir como la utilización de microorganismos antagonistas para el control de enfermedades, entendiéndose por antagonistas, aquellos organismos que interfieren en la supervivencia o desarrollo de los patógenos.

Las investigaciones sobre la utilización de organismos benéficos que protejan contra las enfermedades e induzcan el crecimiento de las plantas está en pleno auge, debido a las restricciones cada vez más fuertes que existen con respecto al uso de fungicidas químicos y la producción de fertilizantes, cuya aplicación y fabricación generan una gran cantidad de contaminantes perjudiciales para el medio ambiente y la salud humana.

Es por ello que el Control Biológico de las enfermedades de las plantas provocadas por hongos empleando bacterias benéficas, es una alternativa muy interesante a el uso de los fungicidas químicos (Rahman *et al.*, 2007. Asian J. Plant Sci. 6:12-20; Li *et al.*, 2008. Biocontrol 53:931-944; Talubnak y Soyong, 2010. J. Agr. Tech. 6:47-55), que pueden causar que surjan nuevas cepas de hongos resistentes a estos

químicos como consecuencia de emplearse por largos periodos de tiempo.

Los actinomicetos son un grupo de bacterias gram positivas, la mayoría presenta crecimiento micelial filamentosos, son
5 preferentemente aerobias y se encuentran ampliamente distribuidas en ambientes terrestres y acuáticos (Goodfellow y Williams, 1983. Ann. Rev. Microbiol. 37:189-216). Constituyen un grupo diverso desde el punto de vista de su morfología y se distinguen de otras bacterias gram positivas por presentar en su DNA un alto contenido de G + C (Lacey,
10 1997. Ann. Agric. Environ. Med. 4:113-121). Un rasgo característico de estas bacterias es la bien conocida capacidad de producir un gran número de metabolitos secundarios bio-activos de alto valor comercial (Omura, 1986. Microbiol. Rev. 50:259-279; Takizawa *et al.*, 1993. Appl. Environ. Microbiol. 59:997-1002). Estos compuestos principalmente se
15 han purificado de especies del género *Streptomyces* (Bérdy, 2005. J. Antibiot. 58:1-26).

Diversos actinomicetos de origen marino y de suelos han sido probados como agentes de control biológico contra hongos patógenos de plantas del género *Colletotrichum* (Ahn *et al.*, 2008. Plant
20 Pathol. J. 24:24-30; Intra *et al.*, 2011. BMC Research Notes 4:98), especies de los géneros *Aspergillus*, *Fusarium*, y *Trichoderma* (Kokare *et al.*, 2004.

Current Science. 86:593-597); de *Helminthosporium solani* (Elson, 1997.

Plan Dis. 81:647-652); *Curvularia oryzae*, *Pyricularia oryzae*, *Bipolaris oryzae* y *Fusarium oxysporum* (Ningthoujam *et al.*, 2009. African J. Microbiol. Res. 3:737-742); así como contra *Pyrenochaeta lycopersici* 5 (Fiume y Fiume, 2008. Comm. Appl. Biol. Ghent University. 73:233-248). Especialmente el género *Streptomyces* ha sido el actinomiceto más utilizado contra un número importante de hongos patógenos de plantas en los que se ha observado una reducción significativa en el crecimiento del hongo (Yuan y Crawford, 1995. Appl. Environ. Microbiol. 10 61:3119-3128; Taechowisan *et al.*, 2005. Microbiology. 151:1691-1695; Errakhi *et al.*, 2007. World J. Microbiol. Biotechnol. 23:1503-1509; Macagnan *et al.*, 2008. Biological Control. 47:309-314; Maldonado *et al.*, 2010. Afr. J. Microbiol. Res. 4:2451-2556).

A este respecto, en la presente invención se ha detectado una 15 cepa de *Streptomyces* sp. aislada de suelo, capaz de presentar actividad contra patógenos, principalmente hongos patógenos de plantas.

En el estado de la técnica no se encuentran documentos que mencionen específicamente a la cepa de *Streptomyces* sp. descrita 20 en la presente solicitud.

Existen diversas patentes y solicitudes publicadas sobre los usos de cepas de *Streptomyces* con actividad antimicrobiana contra hongos fitopatógenos, pero no afectan la patentabilidad de la presente solicitud y citamos a continuación las más relevantes.

5 La patente de los Estados Unidos 4,534,965 describe un método y una composición para controlar la infección de las semillas por hongos, en el que se utiliza el sobrenadante de un cultivo líquido de la cepas de *Streptomyces*, que ha crecido en un medio de sales minerales suplementados con desechos de camarón secos y molidos y que se
10 utiliza para recubrir las semillas y controlar la infección por hongos. A diferencia de la patente mencionada, en la presente invención se emplea una cepa de *Streptomyces* capaz de antagonizar directamente con los hongos fitopatógenos, además la cepa de la presente invención muestra características morfológicas y fisiológicas
15 claramente diferentes.

La patente de los Estados Unidos 5,279,829 se refiere a un antibiótico complejo con actividad fúngica obtenido de *Streptomyces* NCIMB 40212, en particular contra hongos que atacan cultivos y al hombre. La colonia bacteriana madura presenta características como
20 es un micelio vegetativo de borde liso, de color brillante, inclusive amarillo en agar nutritivo; asimismo, en el mismo medio desarrolla un

micelio aéreo abundante de color blanco que desarrolla
generalmente esporas de color gris. Durante la maduración de la
colonia se acumula un pigmento soluble en el medio de color amarillo
brillante. A diferencia de la patente en cuestión, la cepa de
5 *Streptomyces* de la presente solicitud, desarrolla micelio vegetativo
amarillo, micelio aéreo blanco, formación de esporas en amarillo
tenue, y secreta un pigmento al medio de color amarillo brillante. Estas
características de la cepa, a diferencia de la reclamada en la patente
Norteamericana, no cambian al emplear un medio de cultivo distinto,
10 es decir, las características de la cepa son siempre la de presentar un
micelio vegetativo amarillo, un micelio aéreo blanco y una masa de
esporas de color amarillo, En cuanto a las esporas, su coloración
siempre es de color amarillo tenue a más fuerte y el rasgo distintivo de
la cepa en crecimiento es la de producir un pigmento o compuesto de
15 una coloración amarilla brillante que se difunde en el medio de cultivo.

La patente de los Estados Unidos 5,403,584 se refiere a una
formulación para biocontrol que tiene la capacidad de reducir la
susceptibilidad de las plantas a los hongos fitopatógenos. La cepa de
Streptomyces sp. WYEC 108 es incorporada en un medio de liberación
20 apropiado y aplicado a semillas o raíces de las plantas. Esta cepa
presenta actividad antifúngica contra diversos hongos fitopatógenos,

además de que pertenece a la especie *S. lydicus*; un rasgo importante de la cepa es que forma una masa de esporas de color negro. A diferencia de la invención en comento, la presente invención describe el uso de una cepa de *Streptomyces* que presenta como rasgo importante la de desarrollar micelio aéreo blanco que se desarrolla y madura para formar una masa de esporas de color amarillo tenue.

La patente de los Estados Unidos 5,527,526, describe el uso de dos cepas de *Streptomyces* sp., llamadas YCED 9 y WYEC 108, la primera identificada como *S. violaceusniger* o *S. hygrosopicus* y la segunda como *S. lydicus*. Ambas cepas presentan características morfológicas diferentes a la cepa de la presente invención, en particular por que en la cepa de la presente invención el micelio aéreo se torna de blanco a amarillo claro durante el proceso de esporulación. Las cepas de la patente en cuestión las describen como cepas de *Streptomyces* que son capaces de inhibir el crecimiento de patógenos de plantas que están en el suelo e inducir el crecimiento de las plantas. A diferencia de la patente norteamericana en comento, la cepa de la presente invención presenta actividad antagonista contra hongos del género *Fusarium*, *Curvularia*, *Helminthosporium*, *Aspergillus*, *Alternaria*, *Phytophthora*, *Colletotrichum* y *Rhizoctonia*, tal y como se podrá comprobar en los ejemplos de la presente solicitud. Además, la

cepa de la presente invención contiene una secuencia de DNA del
gen ribosomal 16S única, como se presenta en la SEQ ID No. 1.

La patente de los Estados Unidos 6,558,940, describe una nueva
cepa de *Streptomces* sp. llamada CIMAP A.sub.1, aislada de suelo de
5 cultivos de geranios plantados en los campos experimentales del
CIMAP y que tiene la capacidad de inhibir el crecimiento de hongos
fitopatógenos. Se menciona que la cepa de *Streptomyces* de la
invención desarrolla colonias grises lisas, las cuales posteriormente
forman colonias discretas con aspecto liquenoide, en etapas
10 posteriores desarrolla micelio aéreo el cual adquiere una coloración
café oscura, y una vez maduro desarrolla las cadenas de esporas.
Describen a la cepa con características de inhibir el crecimiento de
diversos hongos fitopatógenos de los géneros *Rhizoctonia*, *Sclerotinia*,
Pythium, *Fusarium*, *Curvularia*, *Alternaria*, *Colletotrichum* y *Thielavia*.
15 Dentro de las diferencias de la patente en cuestión son respecto al
presente invento, radica en que el presente invento está basado en la
actividad sobresaliente de una cepa de *Streptomyces* sp. contra
hongos fitopatógenos, en donde la cepa de la patente
Norteamericana presenta características morfológicas claramente
20 diferentes respecto a la cepa de la presente invención. Asimismo, la
cepa de la presente invención, tiene actividades antagonistas contra

hongos fitopatógenos de los géneros *Fusarium*, *Alternaria*,

Colletotrichum, *Helminthosporium*, *Rhizoctonia*, *Aspergillus*, *Curvularia* y

Phytophthora. Además, la cepa de la presente invención contiene una

secuencia de DNA del gen ribosomal 16S única, como se presenta en

5 la SEQ ID No. 1.

En vista de los antecedentes de la invención, el problema técnico que se resuelve es la descripción, uso y procedimiento de aplicación de una cepa novedosa de *Streptomyces* capaz de antagonizar con el crecimiento de hongos fitopatógenos de plantas, lo

10 cual hace que la presente invención sea novedosa, inventiva y con una aplicación industrial concreta para el campo de la agricultura, ya que está tropicalizada a las condiciones edáficas, ambientales y relación planta-microorganismo necesaria para las enfermedades

15 existentes en los cultivos nacionales. Esto queda comprobado con los ensayos de antagonismo contra hongos fitopatógenos, mismos que demostraron que la cepa generada supera significativamente el rendimiento de otras cepas de *Streptomyces* aisladas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. *Streptomyces* sp. cepa CACIS-1.16CA. Cultivo puro

20 crecido en medio ISP2 durante 17 días a una temperatura de 29° C; se observan colonias maduras con borde lobulado, aspecto crateriforme,

con desarrollo de micelio vegetativo de color amarillo, que al madurar desarrolla micelio aéreo blanco del cual surge la masa de esporas de color amarillo claro. Es clara la presencia y producción de un pigmento amarillo brillante conforme madura la colonia. La masa de esporas se fragmenta con mucha facilidad y le confiere un aspecto polvoso.

Figura 2. Ensayos de confrontación de *Streptomyces* sp. vs *Helminthosporium* sp (He). La cepa de *Streptomyces* sp. cepa CACIS-1.16CA (S-1.16) se confrontó contra el hongo fitopatógeno He y posteriormente se evaluó el porcentaje de inhibición del crecimiento del patógenos después de 7 días de incubación a 29°C en medio AN. La inoculación de la cepa S-1.16 se llevó a cabo a diferentes tiempos antes de inocular el hongo, de manera que se evidenciará la capacidad de inhibir el crecimiento de He respecto al tiempo. Inicialmente S-1.16 y He se inocularon al mismo tiempo (0 d); en otro experimento S-1.16 se inoculó 3 días (3d) antes inocular al hongo, y finalmente S-1.16 se inoculó 5 días (5d) antes de inocular al hongo. C; control de crecimiento del hongo.

Figura 3. Ensayos de confrontación de *Streptomyces* sp. vs *Aspergillus niger* (An). La cepa de *Streptomyces* sp. cepa CACIS-1.16CA (S-1.16) se confrontó contra el hongo An y posteriormente se evaluó el porcentaje de inhibición del crecimiento del patógeno

después de 7 días de incubación a 29°C en medio AN. La inoculación de la cepa S-1.16 se llevó a cabo a diferentes tiempos antes de inocular el hongo, de manera que se evidenciará la capacidad de inhibir el crecimiento de An respecto al tiempo. Inicialmente S-1.16 y An se inocularon al mismo tiempo (0 d); en otro experimento S-1.16 se inoculó 3 días (3d) antes de inocular al hongo, y finalmente S-1.16 se inoculó 5 días (5d) antes de inocular al hongo. C; control de crecimiento del hongo.

Figura 4. Ensayos de confrontación de *Streptomyces* sp. vs *Fusarium* sp (Fu-CDBB:1172). La cepa de *Streptomyces* sp. cepa CACIS-1.16CA (S-1.16) se confrontó contra el hongo fitopatógeno Fu-CDBB:1172 y posteriormente se evaluó el porcentaje de inhibición del crecimiento del patógeno después de 7 días de incubación a 29°C en medio AN. La inoculación de la cepa S-1.16 se llevó a cabo a diferentes tiempos antes de inocular el hongo, de manera que se evidenciará la capacidad de inhibir el crecimiento de Fu-CDBB:1172 respecto al tiempo. Inicialmente, S-1.16 y Fu-CDBB:1172 se inocularon al mismo tiempo (0 d); en otro experimento S-1.16 se inoculó 3 días (3d) antes de inocular al hongo, y finalmente S-1.16 se inoculó 5 días (5d) antes de inocular al hongo. C; control de crecimiento del hongo.

Figura 5. Ensayos de confrontación de *Streptomyces* sp. vs *Curvularia* sp (Cu). La cepa de *Streptomyces* sp. cepa CACIS-1.16CA (S-1.16) se confrontó contra el hongo fitopatógeno Cu y posteriormente se evaluó el porcentaje de inhibición del crecimiento del patógeno después de 7 días de incubación a 29°C en medio AN. La inoculación de la cepa S-1.16 se llevó a cabo a diferentes tiempos antes de inocular el hongo, de manera que se evidenciará la capacidad de inhibir el crecimiento de Cu respecto al tiempo. Inicialmente S-1.16 se inculó al mismo tiempo que Cu (0 d); en otro experimento S-1.16 se inculó 3 días (3d) antes inocular al hongo, y finalmente S-1.16 se inculó 5 días (5d) antes de inocular al hongo. C; control de crecimiento del hongo.

Figura 6. Actividad antagonista de *Streptomyces* sp. CACIS-1.16CA (S-1.16) contra *Aspergillus niger* (An). La cepa de *Streptomyces* sp. cepa CACIS-1.16CA (S-1.16) se confrontó contra el hongo fitopatógeno An y posteriormente se evaluó el porcentaje de inhibición del crecimiento del patógeno después de 7 días de incubación a 29°C en medio AN. La inoculación de la cepa S-1.16 se llevó a cabo a diferentes tiempos (0, 3 y 5 días) antes de inocular el hongo, de manera que se evidenciará la capacidad de inhibir el crecimiento de An

respecto al tiempo. Se observa en la placa una cepa de *Streptomyces* sp. para comparar la ventaja de S-1.16CA como cepa antagonista.

Figura 7. Actividad antagonista de *Streptomyces* sp. CACIS-1.16CA (S-1.16) contra *Fusarium* sp CDBB:1172 (Fu-CDBB:1172). La cepa de *Streptomyces* sp. cepa CACIS-1.16CA (S-1.16) se confrontó contra el hongo fitopatógeno Fu-CDBB:1172 y posteriormente se evaluó el porcentaje de inhibición del crecimiento del patógeno después de 7 días de incubación a 29°C en medio AN. La inoculación de la cepa S-1.16 se llevó a cabo a diferentes tiempos (0, 3 y 5 días) antes de inocular el hongo, de manera que se evidenciará la capacidad de inhibir el crecimiento de Fu-CDBB:1172 respecto al tiempo. Se observa en la placa una cepa de *Streptomyces* sp. para comparar la ventaja de S-1.16CA como cepa antagonista.

Figura 8. Actividad antagonista de *Streptomyces* sp. CACIS-1.16CA (S-1.16) contra *Curvularia* sp (Cu). La cepa de *Streptomyces* sp. cepa CACIS-1.16CA (S-1.16) se confrontó contra el hongo fitopatógeno Cu y posteriormente se evaluó el porcentaje de inhibición del crecimiento del patógeno después de 7 días de incubación a 29°C en medio AN. La inoculación de la cepa S-1.16 se llevó a cabo a diferentes tiempos (0, 3 y 5 días) antes de inocular el hongo, de manera que se evidenciará la capacidad de inhibir el crecimiento de Cu

respecto al tiempo. Se observa en la placa una cepa de *Streptomyces* sp. para comparar la ventaja de S-1.16CA como cepa antagonista.

Figura 9. Actividad antagonista de *Streptomyces* sp. CACIS-1.16CA (S-1.16) contra *Phytophthora capsici* (Pc). La cepa de *Streptomyces* sp. cepa CACIS-1.16CA (S-1.16) se confrontó contra el hongo fitopatógeno Pc y posteriormente se evaluó el porcentaje de inhibición del crecimiento del patógeno después de 7 días de incubación a 29°C en medio AN. La inoculación de la cepa S-1.16 se llevó a cabo a diferentes tiempos (0, 3 y 5 días) antes de inocular el hongo, de manera que se evidenciará la capacidad de inhibir el crecimiento de Pc respecto al tiempo. Se observa en la placa una cepa de *Streptomyces* sp. para comparar la ventaja de S-1.16CA como cepa antagonista.

Figura 10. Actividad antagonista de *Streptomyces* sp. CACIS-1.16CA (S-1.16) contra *Fusarium* sp Chile habanero (Fu-Ch). La cepa de *Streptomyces* sp. cepa CACIS-1.16CA (S-1.16) se confrontó contra el hongo fitopatógeno Fu-Ch y posteriormente se evaluó el porcentaje de inhibición del crecimiento del patógeno después de 7 días de incubación a 29°C en medio AN. La inoculación de la cepa S-1.16 se llevó a cabo a diferentes tiempos (0, 3 y 5 días) antes de inocular el hongo, de manera que se evidenciará la capacidad de inhibir el

crecimiento de Fu-Ch respecto al tiempo. Se observa en la placa una cepa de *Streptomyces* sp. para comparar la ventaja de S-1.16CA como cepa antagonista.

Figura 11. Actividad antagonista de *Streptomyces* sp. CACIS-1.16CA (S-1.16) contra *Colletotrichum* sp (Co). La cepa de *Streptomyces* sp. cepa CACIS-1.16CA (S-1.16) se confrontó contra el hongo fitopatógeno Co y posteriormente se evaluó el porcentaje de inhibición del crecimiento del patógeno después de 7 días de incubación a 29°C en medio AN. La inoculación de la cepa S-1.16 se llevó a cabo a diferentes tiempos (0, 3 y 5 días) antes de inocular el hongo, de manera que se evidenciará la capacidad de inhibir el crecimiento de Co respecto al tiempo. Se observa en la placa una cepa de *Streptomyces* sp. para comparar la ventaja de S-1.16CA como cepa antagonista.

Figura 12. Actividad antagonista de *Streptomyces* sp. CACIS-1.16CA (S-1.16) contra *Rhizoctonia* sp (Rh). La cepa de *Streptomyces* sp. cepa CACIS-1.16CA (S-1.16) se confrontó contra el hongo fitopatógeno Rh y posteriormente se evaluó el porcentaje de inhibición del crecimiento del patógeno después de 7 días de incubación a 29°C en medio AN. La inoculación de la cepa S-1.16 se llevó a cabo a diferentes tiempos (0, 3 y 5 días) antes de inocular el hongo, de manera

que se evidenciará la capacidad de inhibir el crecimiento de Rh respecto al tiempo. Se observa en la placa una cepa de *Streptomyces* sp. para comparar la ventaja de S-1.16CA como cepa antagonista.

Figura 13. Actividad antagonista de *Streptomyces* sp. CACIS-1.16CA (S-1.16) contra *Alternaria* sp (Al). La cepa de *Streptomyces* sp. cepa CACIS-1.16CA (S-1.16) se confrontó contra el hongo fitopatógeno Al y posteriormente se evaluó el porcentaje de inhibición del crecimiento del patógeno después de 7 días de incubación a 29°C en medio AN. La inoculación de la cepa S-1.16 se llevó a cabo a diferentes tiempos (0, 3 y 5 días) antes de inocular el hongo, de manera que se evidenciará la capacidad de inhibir el crecimiento de Al respecto al tiempo. Se observa en la placa una cepa de *Streptomyces* sp. para comparar la ventaja de S-1.16CA como cepa antagonista.

15 **BREVE DESCRIPCION DE LA INVENCION**

La presente invención se refiere a una cepa de *Streptomyces* sp., con número de acceso NRRL B-50597, capaz de antagonizar con bacterias y/u hongos fitopatógenos de plantas que afectan cultivos hortícolas.

20 En otro aspecto de la presente solicitud, se describe y reclama un método para promover la resistencia a fitopatógenos en plantas,

que comprende aplicar una cepa de *Streptomyces sp.* como la
mencionada anteriormente, a una planta, plántula, semilla de planta ó
al suelo, en condiciones efectivas para promover la resistencia a
fitopatógenos en la planta o en la planta crecida a partir de dicha
5 semilla; en donde dicha aplicación es llevada a cabo en forma de
solución líquida o en surco, aplicación directa en el suelo o en mezclas
para plantar, en forma sólida tal como polvos o gránulos, o por
tratamiento de las semillas de plantas.

Adicionalmente, se describe y reclama el uso de la multicitada
10 cepa para preparar una formulación agronómica para promover la
resistencia a fitopatógenos, tales como hongos y/o bacterias en
plantas.

Por último, es una modalidad adicional de la presente invención,
describir y reclamar una formulación agronómica, que comprende una
15 cepa de *Streptomyces sp.* como la que se menciona anteriormente y
un vehículo agronómicamente aceptable, en donde dicha
formulación agronómica promueve la resistencia a bacterias y/u
hongos fitopatógenos en plantas, en donde dicha formulación está en
forma de polvo, suspensión líquida o gránulos.

20 **DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION**

Aislamiento de *Streptomyces sp.*

La búsqueda de estreptomicetos con la capacidad de funcionar como microorganismos para el control biológico de hongos fitopatógenos, consistió en tomar una muestra compuesta de suelo a una profundidad de entre 0 a 10 cm; en la que dicha muestra consiste de 5 sub-muestras de suelo tomadas en un radio de 5 metros de distancia entre cada. Una característica importante del presente procedimiento es la de aplicar un pre-tratamiento a la muestra de suelo que consiste en calentar el suelo a una temperatura de 70° C por una hora para incrementar la población de los actinomicetos que forman esporas.

10 Diez gramos del suelo tratado se disolvió en 100 ml de agua destilada y de esta mezcla se prepararon diluciones seriales mismas que fueron inoculadas en medios de cultivo empleados en el aislamiento de los estreptomicetos mediante procedimientos microbiológicos convencionales. Adicionalmente, el procedimiento de aislamiento

15 consiste en la adición de ácido nalidíxico a una concentración de 12.5 µg/ml y natamicina a 21.5 µg/ml) en el medio de aislamiento, en particular el medio ISP3. Aquellas colonias que emergieron se seleccionaron y fueron consecutivamente inoculadas en cajas Petri con medio agar ISP2 hasta la obtención de cultivos puros. La

20 producción masiva de esporas se llevó a cabo mediante la inoculación de las cepas aisladas en cajas Petri con medio ISP2 y

mantenidas por tres a cuatro semanas a 29° C hasta obtener un cultivo con crecimiento confluyente bien esporulado. El proceso para la obtención de las esporas para su preservación está bien documentado en la literatura mediante los procedimientos microbiológicos estándares que se emplean para este grupo de bacterias (Shirling y Gottlieb, 1966).

Caracterización de la cepa de *Streptomyces* sp.

Los estreptomicetos aislados se crecieron en el medio ISP2 y sus características morfológicas se documentaron de acuerdo al procedimiento descrito por Shirling y Gottlieb (1966. Int. J. Syst. Bacteriol. 16:313-340). La cepa de *Streptomyces* sp CACIS-1.16CA inicialmente produce colonias de borde redondeado que conforme maduran se torna lobulado, el micelio vegetativo es de color amarillo, el cual con el paso de los días desarrolla micelio aéreo de color blanco. En la etapa final del desarrollo de la colonia, el micelio aéreo madura y se diferencia en esporas de coloración amarillo claro arregladas en cadenas. En esta etapa de crecimiento, la colonia adquiere un aspecto polvoso, además de que se ha acumulado en el medio de cultivo un pigmento de color amarillo brillante. Diversas características fisiológicas y bioquímicas se determinaron para la cepa de la presente invención, mismas que se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1

Características de <i>Streptomyces</i> sp. cepa CACIS-1.16GA					
Prueba			Fuente ^c	C	E
Tinción Gram	+		Ninguna	+/-	-
Hidrolisis de almidón	+		D-glucosa	+	+
Hidrolisis de caseína	+		Sacarosa	+/-	-
Producción de melanina	-		L-xilosa	+/-	-
			D-xilosa	+	+
Características del cultivo en ISP2 ^A					
Micelio vegetativo (reverso)	Amarillo		Maltosa	+	+
Micelio aéreo	Blanco		D-arabinosa	+	+
Masa de esporas	Amarillo claro		D-lactosa	+	+
Producción pigmentos	Amarillo brillante		D-rafinosa	+/-	-
			D-cellobiosa	+	+
Producción de enzimas extracelulares ^B					
Lipasa	-		D-fructosa	+	+
Asparaginasa	+		L-rhamnosa	+/-	-
Gelatinasa	+		Manitol	+	+
			Myo-inositol	+/-	-
			Glicerol	+	-

^A Los experimentos se realizaron como se menciona en Shirling y Gottlieb (1966).

^B La actividad enzimática se determinó mediante pruebas en placa

Petri empleando el medio ISP9 como base suplementado con 3 % v/v de aceite de oliva (lipasa), 1 % p/v L-asparagina (asparaginasa) y 1 % p/v de gelatina (gelatinasa).

5 ^C Los experimentos de utilización de la fuente de carbono se realizaron en el medio ISP9 como base suplementado con 1% (p/v) de cada azúcar y después de 14 días de crecimiento.

** C, crecimiento del micelio vegetativo; interpretación: (+), utilización positiva y desarrollo vigoroso del micelio; (+/-), utilización positiva y poco desarrollo del micelio; (-), no utilización y no se desarrolla micelio.
10 E, esporulación; interpretación: (+), formación vigorosa de esporas; (+/), débil formación de esporas; (-), sin esporulación.

Condiciones de cultivo.

Todos los medios de crecimiento se prepararon empleando
15 agua destilada y previo a su uso se esterilizaron en autoclave. Todas las muestras y cepas fueron manipuladas en el laboratorio bajo condiciones asépticas para mantener su pureza.

El medio de cultivo agar ISP2 e IPS3 (International Streptomyces Project media 2 y 3): ISP2, 4 gr/l de dextrosa, 10 gr/l de extracto de
20 malta, 4 gr/l de extracto de levadura y 20 gr/l de agar; ISP3, 20 gr/l de harina de avena integral, 18 gr/l de agar, 1 ml de solución de sales

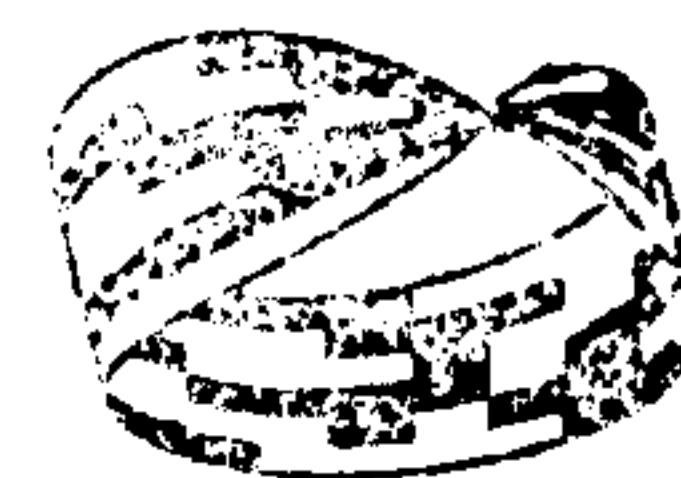
traza (por cada 100 ml de solución: 0.1 gr $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.1 gr $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.1 gr $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), se prepararon de acuerdo a Shirling y Gottlieb (1966).

El agar nutritivo (AN) consistió de 5 gr/l de peptona de gelatina, 3 gr/l de extracto de carne y 15 gr/l de agar. El medio es distribuido comercialmente por Becton Dickinson de México, SA de CV.

El agar papa-dextrosa (PDA) consistió de 200 gr/l de infusión de papa, 20 gr/l de dextrosa y 15 gr/l de agar. El medio es distribuido comercialmente por Millipore SA de CV.

10 **Hongos fitopatógenos.**

Los hongos patógenos empleados son *Aspergillus niger* NRRL-3 and *Fusarium* sp. (CDBB:1172), obtenidos de la Colección Mexicana de Cultivos Microbianos del CINVESTAV-IPN, Mexico. *Phytophthora capsici*, *Curvularia* sp. y *Helminthosporium* sp. fueron facilitadas por el Dr. Jairo Cristobal Alejo del laboratorio de Fitopatología del Instituto Tecnológico de Conkal, Yucatán, Mexico. El resto de las cepas de hongos fueron proporcionadas por el Dr. Alberto Uc Vázquez del Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco AC Unidad Sureste, que fueron aislados de plantas enfermas de cultivos de *Jatropha curcas* y de *Capsicum chinense* (chile habanero); de la



primera planta se aislaron los géneros *Alternaria*, *Colletotrichum* y *Rhizoctonia* y de la segunda se aisló una cepa del género *Fusarium* sp.

Obtención del inóculo.

El micelio de *Streptomyces* sp. CACIS-1.16CA se obtiene a partir de 100 ml de medio de cultivo inoculado con un stock de esporas con una densidad de aproximadamente 1.5×10^9 ufc/ml y se mantiene en incubación a una temperatura de 29° C y una velocidad de agitación de 250 rpm durante tres días. Se decanta el sobrenadante y el micelio se concentra para tener una suspensión de cerca de 1×10^8 ufc/ml, el cual es usado directamente para inocular a la cepa en el medio de cultivo, empleando entre 2-5 μ l de la suspensión. La producción de las esporas se obtuvo de mantener un cultivo de *Streptomyces* sp CACIS-1.16CA en medio sólido, que puede ser ISP2, hasta obtener un crecimiento confluyente durante 10-21 días, tiempo en el que se obtiene una producción masiva de esporas. Las esporas se obtuvieron directamente de las cajas Petri raspando el micelio con la ayuda de un asa bacteriológica y agua destilada estéril. La suspensión de esporas se concentró y preservó en glicerol al 20%, y de ahí se preparó una suspensión de esporas a 1×10^8 de ufc/ml, la cual es usada para inocular un medio de cultivo, empleando ente 2-5 μ l de la suspensión.

Purificación del DNA y amplificación por PCR para identificación

molecular

La identificación molecular de *Streptomyces* sp. CACIS-1.16CA se realizó mediante el análisis de la secuencia parcial del gen ribosomal 16S. La obtención del DNA genómico usado como templado para la reacción de PCR se realizó a partir de la suspensión de esporas mediante técnicas estándares, pero incorporando en la extracción 0.5 % de microperlas de vidrio (diámetro de 106 μm) y realizando agitaciones con vortex por tres veces en periodos de 1 minuto cada uno. El PCR para amplificar el fragmento del ADN se realizó en un volumen final de 50 μl que contiene 1X del buffer de reacción, MgCl_2 a 2 mM, dNTP cada uno a 0.2 mM, 2 ng de DNA cromosomal, 0.4 μM de cada oligonucleótido y 2 unidades de la enzima Taq DNA polymerase. El PCR se realizó bajo las condiciones previamente reportadas por Weisburg y otros (1991) empleando los oligonucleótidos fD1 y rD1. Los fragmentos o amplicones obtenidos fueron secuenciados directamente y la secuencia obtenida es la señalada en la SEQ ID No. 1.

Deposito de las cepas:

Se depositó la cepa CACIS-1.16CA con mejor actividad de la especie *Streptomyces* sp. de acuerdo a lo siguiente:

La cepa de *Streptomyces* sp CACIS-1.16CA ha sido depositada bajo los términos del Tratado de Budapest, en el Agricultural Research Service Culture Collection (ARS Patent Culture Collection, 1815 North University St, Peoria, IL, 61604, Estados Unidos de Norteamérica). El número de acceso indicado se asignó después de la verificación de la viabilidad de la cepa, y se han pagado los impuestos de requisición. El acceso a dicha cepa será posible durante el trámite de la solicitud de patente. Todas las restricciones sobre la disponibilidad de dicha cepa al público se removerán irrevocablemente una vez que se acepte la patente basándose en la solicitud. Además, el depósito designado se mantendrá por un periodo de treinta (30) años desde la fecha de depósito, o cinco (5) años después de la última requisición para el depósito, o para la vida de cumplimiento de la patente mexicana, cuan larga sea. Si la cepa se vuelve no viable o inadvertidamente es destruida, será reemplazada con una cepa viable. Así, la cepa descrita y reclamada en la presente invención, corresponde a lo mostrado en la siguiente tabla:

Nombre de la cepa	Fecha de Depósito	Número NRRL
<i>Streptomyces</i> sp. cepa CACIS-1.16CA	21 de noviembre de 2011	NRRL B-50597

Formulaciones que contienen la cepa *Streptomyces sp.* y

métodos de aplicación.

Una vez que la cepa *Streptomyces sp.* fue identificada y depositada con el No. de Depósito NRRL B-50597, fue crecida en un medio de cultivo apropiado para el organismo, bajo condiciones óptimas para su mantenimiento, y si se desea para expandir la densidad de población celular antes de su aplicación de acuerdo a lo divulgado en la presente invención. Asimismo, la cepa de la presente invención puede ser empleada como esporas que tienen la capacidad de perdurar por más tiempo que el emplear las células activas.

La presente invención también se relaciona con un método para promover el crecimiento y promover la resistencia a fitopatógenos, ya sea hongos o bacterias en plantas. Esto incluye aplicar la cepa de *Streptomyces sp.* NRRL B-50597, preparada de acuerdo a lo descrito previamente a una planta o semilla de planta, bajo condiciones efectivas para promover el crecimiento y la resistencia a fitopatógenos.

En una modalidad de la presente invención, la cepa puede ser inoculada a las plantas, las raíces de las plantas o las semillas en

diversas formas, ya sea directamente a las raíces, ~~al suelo en donde la~~
semilla o la planta han sido cultivadas de acuerdo a lo siguiente:

La cepa de *Streptomyces* sp. NRRL B-50597 de la presente
invención puede ser formulada o mezclada para preparar gránulos,
5 polvos o suspensiones líquidas. Estas pueden ser incorporadas
directamente en el suelo o mezclas para cultivo. Las preparaciones son
posteriormente mezcladas en el suelo o en la mezcla para cultivo para
aplicaciones a nivel invernadero o a nivel de campo.

El equipo y los procedimientos para dichas aplicaciones son
10 conocidos en la técnica y utilizados en varias empresas agrícolas. De
manera regular, se aplican entre 1 a 50 kg del producto que contenga
de 10^1 a 10^{11} unidades formadoras de colonias (ucf) por metro cúbico
de suelo o mezclas para cultivo. La cantidad de producto formulado
puede ser ajustada proporcionalmente a una mayor o menor cantidad
15 de unidades formadoras de colonias. Una cantidad adecuada de
unidades formadoras de colonias para los efectos de la presente
invención y a nivel comercial va de 10^6 a 10^{11} .
Adicionalmente, se pueden preparar suspensiones líquidas de la cepa
de *Streptomyces* sp. NRRL B-50597 de la presente invención, mezclando
20 las formulaciones en polvo con agua u otro vehículo acuoso, como
soluciones fertilizantes. Tales soluciones pueden ser utilizadas para regar

los sitios de cultivo tanto antes de plantar como cuando las plantas
están creciendo en los mismos.

Los polvos secos que contienen la cepa de *Streptomyces* sp.
NRRL B-50597 de la presente invención pueden ser aplicados como
5 polvos finos a raíces, plántulas o semillas. Dichos polvos finos (con un
tamaño de grano igual o menor a 250 μm) contienen entre 10^6 a 10^{11}
unidades formadoras de colonia por gramo.

Las suspensiones líquidas antes mencionadas pueden ser
preparadas para aplicarse en los surcos de cultivo. Tales materiales
10 pueden ser agregados a los surcos en donde las semillas son plantadas
o donde se trasplantan las plántulas. Los equipos para realizar dichas
aplicaciones son ampliamente utilizados en la industria agrícola. Las
cantidades típicas para aplicación son entre 1 y 170 kg de producto
(10^6 a 10^{11} ufc/g) por hectárea de cultivo.

15 Los gránulos pueden ser aplicados a la superficie del suelo que
contengan plantas en crecimiento, al suelo al momento del cultivo o
en suelos en donde las semillas o las plántulas van a ser plantados. Las
cantidades típicas para las aplicaciones van de 1 a 1000 kg de
producto (10^6 a 10^{11} ufc/g) por hectárea de cultivo.

20 En otra modalidad de la presente invención, la cepa de
Streptomyces sp. NRRL B-50597 es aplicable directamente a las semillas,

utilizando cualquier método de tratamiento de semillas conocido en el arte. Por ejemplo, las semillas son tratadas comúnmente utilizando pastas, recubrimientos tipo film o pastillas por procesos conocidos en el comercio (Taylor et al., 1990. " Ann. Rev. Phytopathol. 28: 321-339; Cook R.J. 1993. Ann. Rev. Phytopathol. 31: 53-80), los cuales se incorporan a la presente como meras referencias en su totalidad, sin que constituyan arte previo para la misma.

Procedimiento de aplicación de las cepas

Para aplicar la cepa de *Streptomyces* sp. NRRL B-50597, ya sea sola o como parte de la composición antes descrita, se pueden preinocular las semillas de las plantas con una cantidad agronómicamente efectiva de dicha cepa para posteriormente sembrar las semillas de las plantas de manera tradicional.

Otra modalidad de la invención incluye aplicar la cepa de *Streptomyces* sp. NRRL B-50597 ya sea sola o como parte de la formulación antes descrita directamente en la raíz de plantas. La cepa puede aplicarse como gránulos, polvo o solución líquida sobre el suelo del cultivo.

Uso de la cepa para resistencia a fitopatógenos

La cepa de *Streptomyces* sp. NRRL B-50597 de la presente invención, es óptima para utilizarse tanto sola, como en combinación

con vehículos agronómicamente aceptables, para preparar
formulaciones para promover la resistencia a fitopatógenos, tales
como hongos o bacterias en plantas, de manera notable y no obvia
en comparación tanto con otras cepas obtenidas durante la fase de
5 investigación realizada para la concreción del invento, como en
comparación con las cepas silvestres de referencia o de cepas
comerciales.

De tal forma que, a la luz de la descripción detallada de la
invención, a continuación se exponen los siguientes ejemplos
10 experimentales para ilustrar la mejor manera de llevar a cabo la
invención, sin que por ello se limite el alcance originalmente descrito y
reclamado en la presente solicitud.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

15 **Caracterización morfológica y molecular de *Streptomyces* sp.
cepa CACIS-1.16CA.**

La cepa de *Streptomyces* sp. CACIS-1.16CA NRRL B-50597 aislada
del suelo se caracterizó de acuerdo a los procedimientos establecidos
por Shirling y Gottlieb (1966). La tabla 1 presenta los resultados
20 obtenidos en las diferentes pruebas que se llevaron a cabo para
evaluar las características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas de la

cepa aislada. Asimismo, la figura 1 muestra colonias maduras de la
cepa creciendo en el medio ISP2 a 29° C durante 21 días. Se observan
las características de la colonia madura como son el borde lobulado,
aspecto crateriforme y con el micelio vegetativo amarillo, a partir de
5 este último se desarrolla el micelio aéreo de color blanco que se
diferencia en la masa de esporas de color amarillo tenue. Un rasgo
importante de la cepa de la presente invención es la producción de
pigmento amarillo brillante en forma de gota en cultivo en medio
sólido (en la foto), que se difunde en el medio de cultivo. La
10 identificación molecular de la cepa de la presente invención se llevó a
cabo mediante el análisis del gen parcial del ADN ribosomal 16S, para
lo cual se amplificó el gen por la técnica del PCR mismo que se purificó
y secuenció, obteniendo una secuencia nucleotídica que corresponde
a 641 pares de bases. Esta secuencia se analizó mediante los
15 procedimientos y herramientas bioinformáticas disponibles y conocidas
en el estado de la técnica actual; la secuencia obtenida se menciona
en la SEQ ID No. 1.

En la Tabla 1 anteriormente presentada, se resumen las
características esenciales de la cepa en comentario.

20 **Ejemplo 2**

Ensayo de antagonismo de la cepa de *Streptomyces* sp. NRRL B-

50597 vs. hongos fitopatógenos.

Se realizaron ensayos de confrontación de diferentes cepas de *Streptomyces* aisladas de suelo contra los hongos fitopatógenos de prueba que provienen de diferentes orígenes. *Fusarium* sp. CDBB:1172 y *Aspergillus niger* NRRL-3 obtenidos de ceparios; *Curvularia* sp. y *Helminthosporium* sp. fueron aislados de plantas ornamentales, específicamente plantas de crisantemo (*Dendranthema grandiflora*). Este ensayo se realizó con la finalidad de probar y seleccionar diversas cepas de *Streptomyces* aisladas del suelo que presenten las mejores características de actividad antagonista. En las Figuras 2 a 5 se muestran los resultados de los experimentos de ensayos duales o de confrontación. Así, el estreptomiceto descrito y reclamado en la presente invención, a saber, *Streptomyces* sp. NRRL B-50597 y otros estreptomicetos aislados fueron confrontados contra los fitopatógenos *Helminthosporium* sp. (Fig. 2), *Aspergillus niger* NRRL-3 (Fig. 3), *Fusarium* sp. CDBB:1172 (Fig. 4) y *Curvularia* sp. (Fig. 5) en cultivos duales que fueron mantenidos en crecimiento por 7 días a 29° C en medio AN para determinar su capacidad de inhibir el crecimiento de los fitopatógenos. Los experimentos de confrontación se realizaron en placas Petri con medio de agar nutritivo (AN) para lo cual se

inocularon 2 μ l de la suspensión de esporas de concentración 1×10^8 esporas/ml cerca del borde de la placa y se incubaron por 0, 3 y 5 días antes de inocular al hongo patógeno. El hongo patógeno se inoculó en la placa a partir de un bloque de agar de 0.4 X 0.4 cm de agar PDA cubierto completamente con el micelio activo del hongo en crecimiento. Al tiempo cero ambos microorganismos se inocularon de manera simultánea. En todos los casos, después de inocular al hongo las placas Petri fueron mantenidas por 7 días a 29° C. Las placas control contenían solamente el hongo. Todos los tratamientos se llevaron a cabo con tres repeticiones. El porcentaje de inhibición se determina de acuerdo a la formula: $PI (\%) = FR - AR/FR \times 100$, en donde FR representa el radio de crecimiento del hongo (mm) del cultivo control y AR representa el radio de la distancia del crecimiento del hongo en dirección de la colonia de las cepas de estreptomicetos (mm) (Yuan y Crawford, 1995). En ambos casos la distancia se toma a partir del crecimiento inicial del hongo. De estos resultados observamos que en general todas las cepas de estreptomicetos seleccionadas presentan un porcentaje de actividad antagonista contra los hongos de manera muy similar, sin embargo, entre ellas, la cepa de *Streptomyces*_sp. NRRL B-50597 resultó mucho más eficiente para antagonizar el crecimiento de los hongos fitopatógenos de prueba y formar la característica línea

de lisis en la zona donde inicia la interacción entre los microorganismos.

Es importante observar que las cepas de actinomicetos presentan un porcentaje mayor de antagonismo al preincubar las cepas de estreptomicetos analizadas en la presente invención y en todos los casos. La tabla 2 presenta el porcentaje de inhibición de la cepa *Streptomyces* sp. NRRL B-50597 de la presente invención. Con estos datos, la cepa de la presente invención supera a las otras cepas de actinomicetos probadas cepas comerciales, considerando los aspectos de porcentaje de antagonismo, características de la cepa y los aspectos relacionados a la facilidad y versatilidad en la que esa cepa es manejada, crecida y preservada, por lo que la cepa de *Streptomyces* sp. NRRL B-50597 supera ampliamente a otras cepas de estreptomicetos.

TABLA 2

ACTIVIDAD ANTAGONISTA DE <i>Streptomyces</i> sp NRRL B-50597 (%)			
	Porcentaje de inhibición +/- desv. Estándar *		
Patógeno	0 DIAS	3 DIAS	5 DIAS
<i>Curvularia</i> sp.	45 +/- 3.3	61 +/- 2.3	71 +/- 1.4
<i>Helminthosporium</i> sp.	36 +/- 4.9	52 +/- 2.6	68 +/- 4.0
<i>A. niger</i>	38 +/- 2.1	68 +/- 3.5	96 +/- 0.7

<i>Fusarium</i> sp.	34 +/- 1.2	49 +/- 1.6	54 +/- 3.9
---------------------	------------	------------	------------

* Cada ensayo consistió de tres replicas.

Ejemplo 3

Ensayo de antagonismo de la cepa de *Streptomyces* sp. CACIS-

1.16CA NRRL B-50597 vs. hongos fitopatógenos.

5 Se realizaron ensayos de confrontación de la cepa de *Streptomyces* sp. NRRL B-50597 aislada de suelo contra los hongos fitopatógenos de prueba que provienen de diferentes orígenes. *Fusarium* sp. CDBB:1172 y *Aspergillus niger* NRRL-3 obtenidos de ceparios nacionales; *Curvularia* sp. fue aislada de plantas

10 ornamentales, específicamente plantas de crisantemo (*Dendranthema grandiflora*). *Alternaria*, *Colletotrichum* y *Rhizoctonia*, se aislaron de plantas enfermas de cultivos de *Jatropha curcas*; *Fusarium* sp. se aisló de *Capsicum chinense* (chile habanero). Las pruebas de antagonismo

15 contra los fitopatógenos que se mencionan tienen la finalidad de mostrar la actividad antagonista de la cepa de la presente solicitud en comparación con una cepa de *Streptomyces* sp. que no presenta esta actividad. En las figuras 6 a 13 se observa que la cepa de *Streptomyces* sp NRRL B-50597 de la presente invención fue capaz de inhibir el crecimiento de los hongos fitopatógenos antes mencionados en

20 comparación con la cepa de *Streptomyces* usada para la

comparación de actividad. En la tabla 3 se muestran ~~los porcentajes~~
 de inhibición con los diferentes hongos fitopatógenos. Lo anterior
 demuestra de manera inequívoca y contundente la eficiencia de la
 cepa de la presente invención *Streptomyces sp* NRRL B-50597 como
 5 una cepa antagonista del crecimiento de hongos fitopatógenos que
 afectan diferentes cultivos, pudiendo ser plantas ornamentales y
 plantas hortícolas. El procedimiento metodológico y técnico con el que
 se realizó y evaluó el resultado del ensayo es idéntico al descrito en el
 ejemplo 2.

10 Tabla 3

ACTIVIDAD ANTAGONISTA DE <i>Streptomyces sp</i> NRRL B-50597 (%) *			
Porcentaje de inhibición (+/- DE)			
Patógeno	0 días	3 días	5 días
<i>Fusarium sp.</i> CDBB:1172	54.8 (0.5)	64.8 (1.4)	71 (2.3)
<i>Fusarium sp.</i> Chile hab	52.9 (1.8)	74.1 (4.2)	77.6 (1.0)
<i>Alternaria sp.</i>	47.6 (1.2)	60.6 (1.7)	61.4 (3.0)
<i>Curvularia sp.</i>	54.5 (3.6)	68.6 (3.6)	76.8 (1.7)
<i>Phytophthora capsici</i>	61.5 (0.4)	82.7 (1.3)	90.2 (1.6)

<i>Colletotrichum</i> sp.	59.1 (1.8)	69.8 (1.6)	80.8 (2.4)
<i>Rhizoctonia</i> sp.	55.2 (3.5)	70.5 (4.6)	76.4 (1.2)
<i>Aspergillus niger</i> NRRL -3	52.3 (0.3)	65.6 (5.1)	76.9 (1.7)

* Cada ensayo consistió de tres réplicas.

Puesto que se pueden hacer varios cambios a los métodos anteriormente mencionados y a las composiciones sin apartarse del alcance de la invención, se pretende que todos los asuntos contenidos en la descripción anteriormente dada y mostrada en los dibujos acompañantes deben interpretarse como ilustrativos y no en un sentido limitante.

REIVINDICACIONES



1. Una cepa de *Streptomyces* sp., con actividad antagónica contra microorganismos fitopatógenos caracterizada porque contiene una
5 secuencia de ADN ribosomal 16S conforme a la SEQ ID No. 1, y porque está depositada en la ARS Culture Collection (NRRL) bajo el número de acceso NRRL B-50597.
2. La cepa de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada además porque la actividad antagónica contra microorganismos fitopatógenos es
10 particularmente contra hongos.
3. La cepa de conformidad con la reivindicación 2, caracterizada además porque los hongos incluyen a los géneros *Fusarium*, *Curvularia*, *Helminthosporium*, *Aspergillus*, *Alternaria*, *Phytophthora*, *Colletotrichum* y *Rizoctonia*.
- 15 4. Un método para promover la resistencia contra microorganismos fitopatógenos en plantas, caracterizado porque comprende poner en contacto una cepa de *Streptomyces* sp., como la que se describe en las reivindicaciones 1 a 3, con una planta, plántula, semilla de planta o directamente en el suelo.
- 20 5. Método de conformidad con la reivindicación 4, en donde el paso de poner en contacto la cepa de *Streptomyces* sp implica la inoculación de la cepa en las plantas, en las raíces de las plantas, o en las semillas.
6. Método de conformidad con la reivindicación 5, en donde la inoculación de la cepa en las semillas comprende un paso de preinoculación de la
25 cepa en las semillas antes de su siembra.



RESUMEN DE LA INVENCION

5

La presente invención describe y reclama una cepa de *Streptomyces* sp., con No. de Acceso NRRL B-50597, para control biológico que tiene actividad antagonista contra organismos fitopatógenos, superior a otras cepas similares. Dicha cepa es aplicable sola o como parte de una composición agronómica.

10 Asimismo se describe un método para tratar plantas infectadas con la misma.

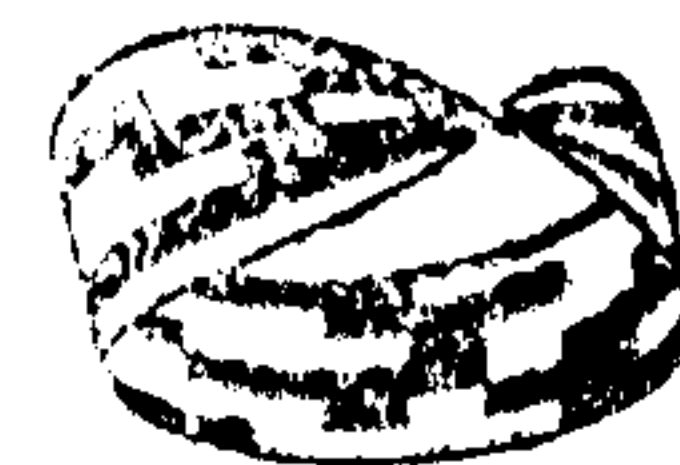
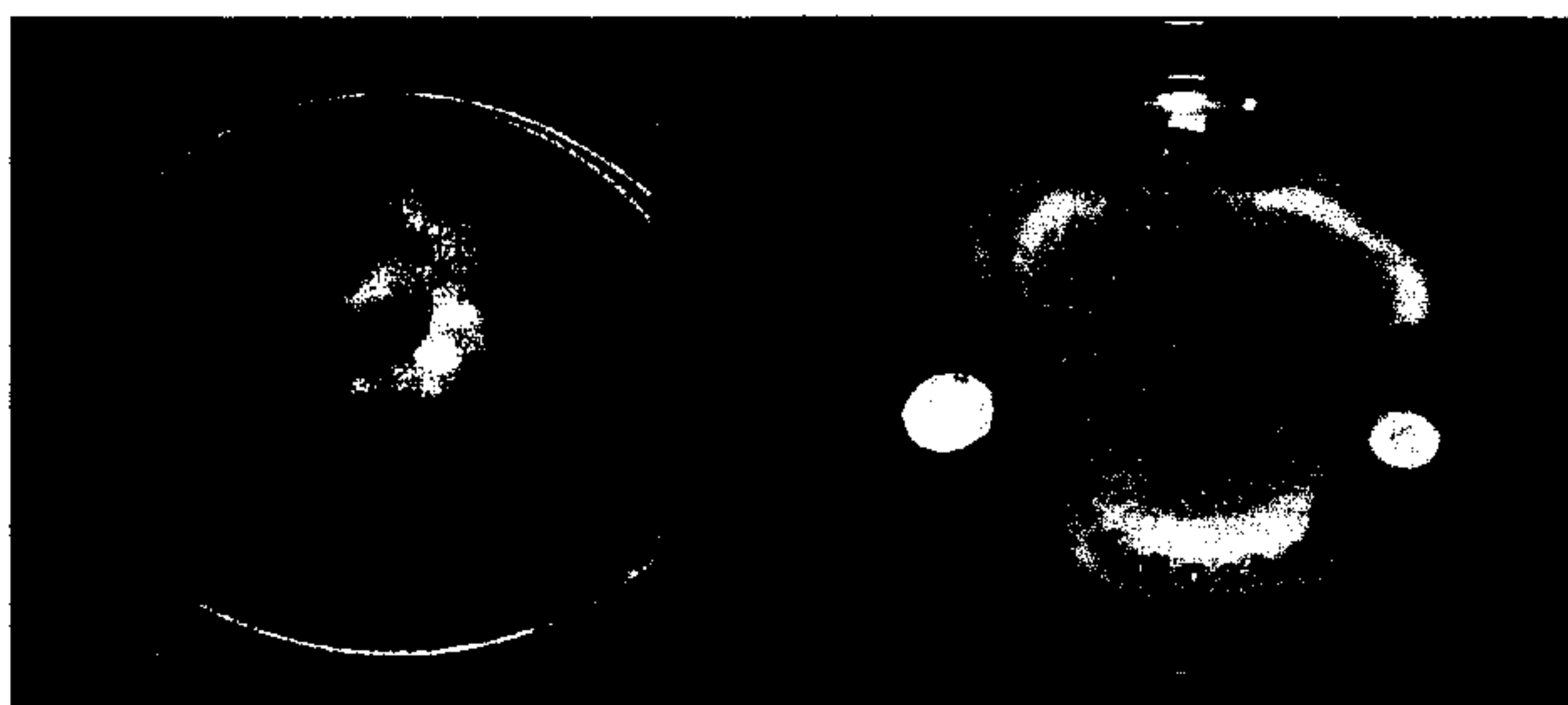


FIGURA 1



CONTROL

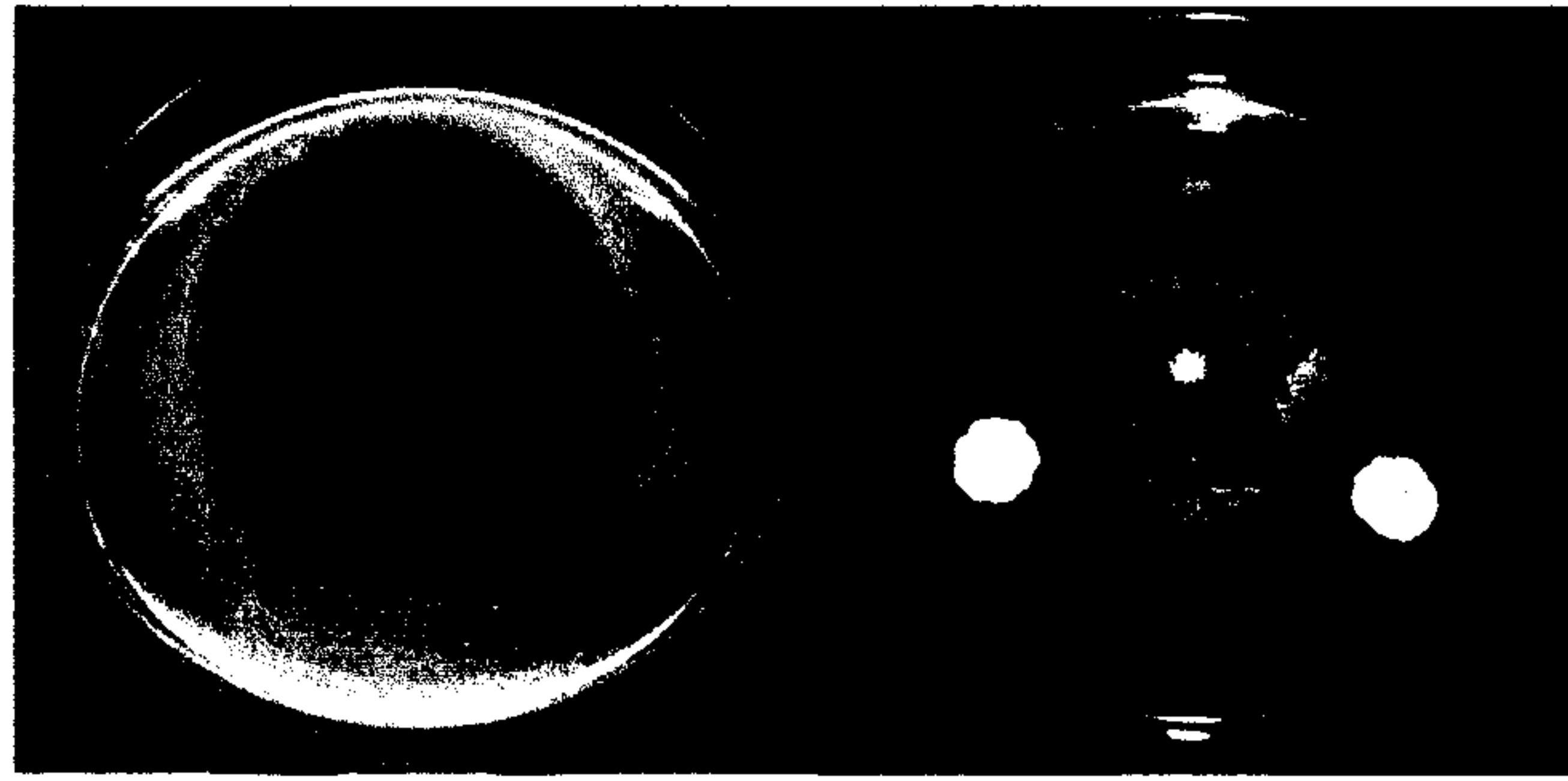
0d



3d

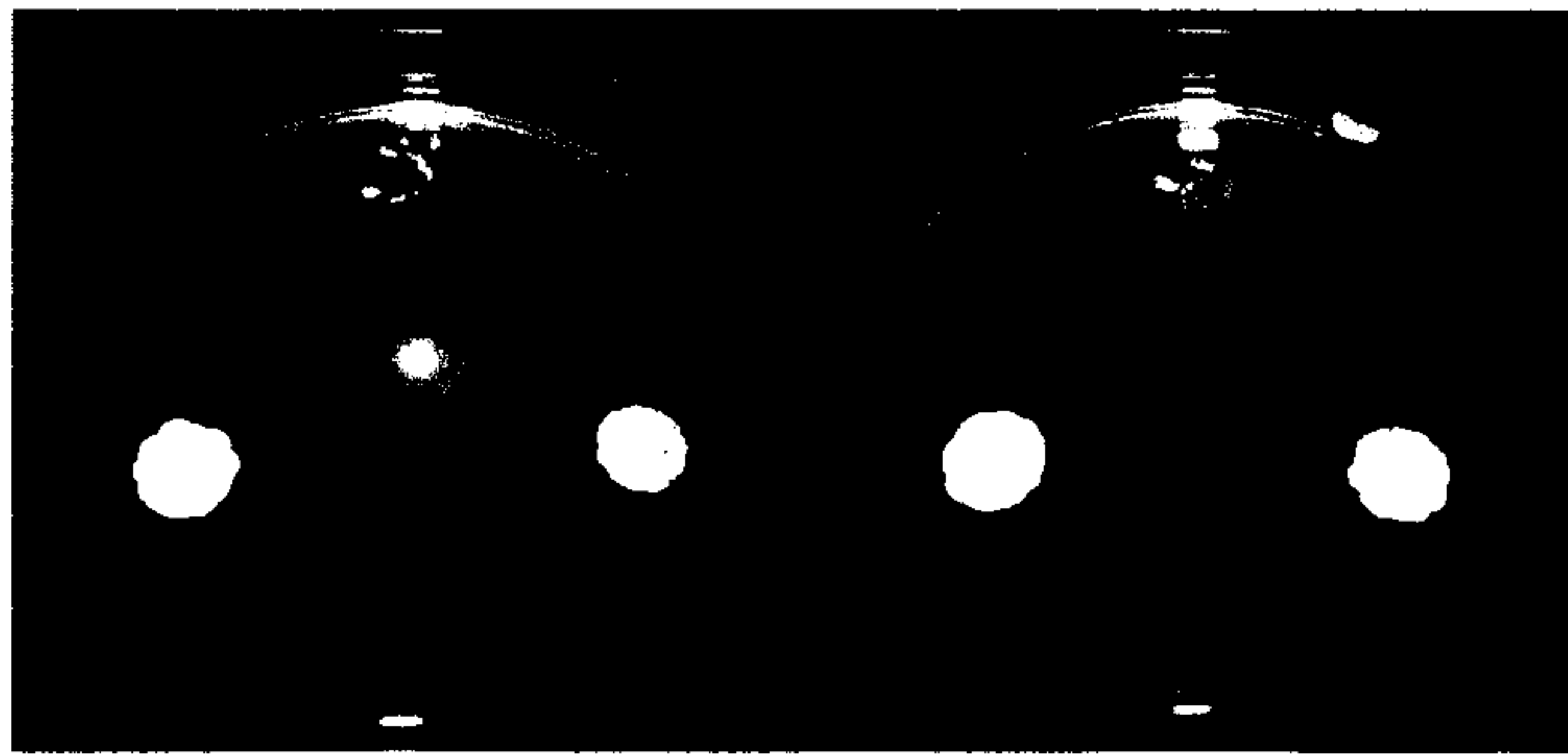
5d

FIGURA 2



CONTROL

0d



3d

5d

FIGURA 3



CONTROL

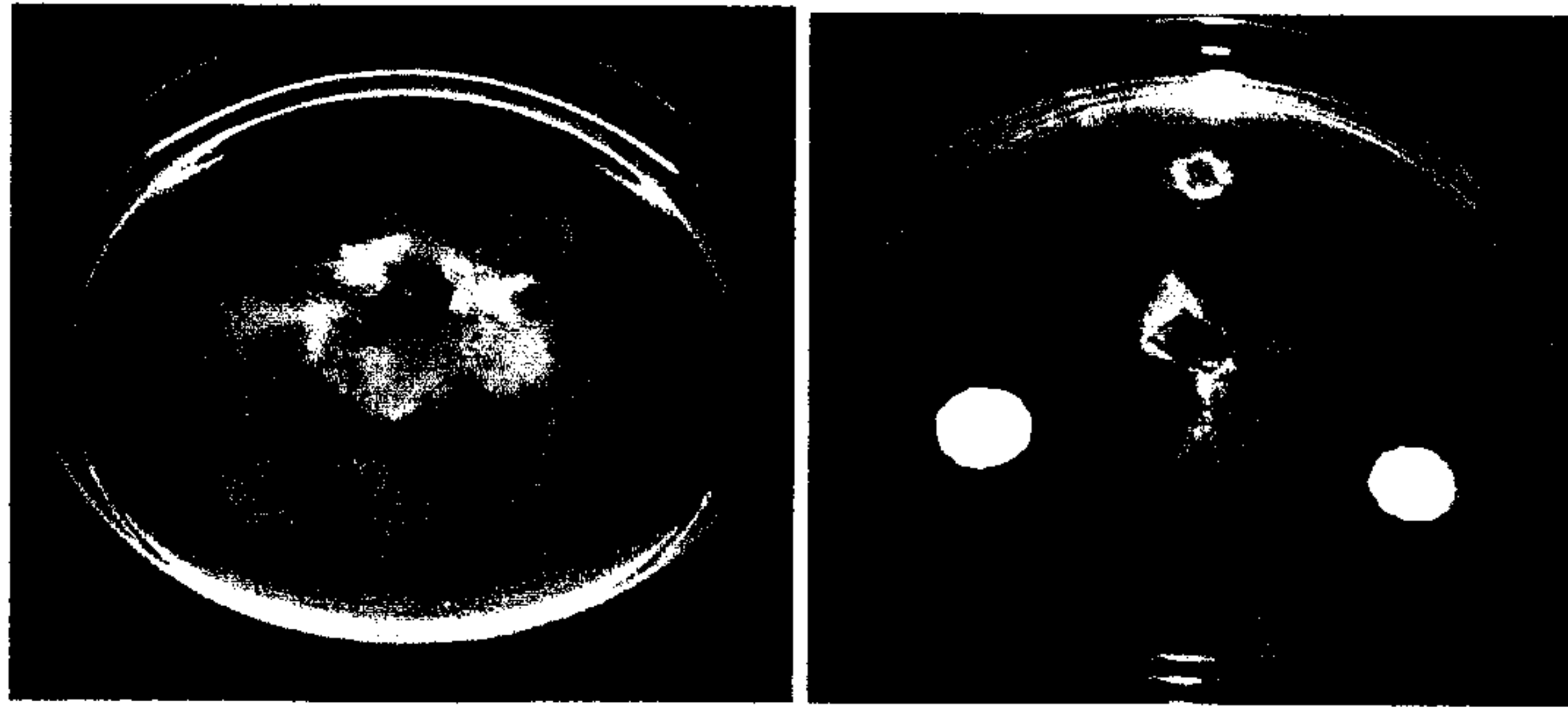
0d



3d

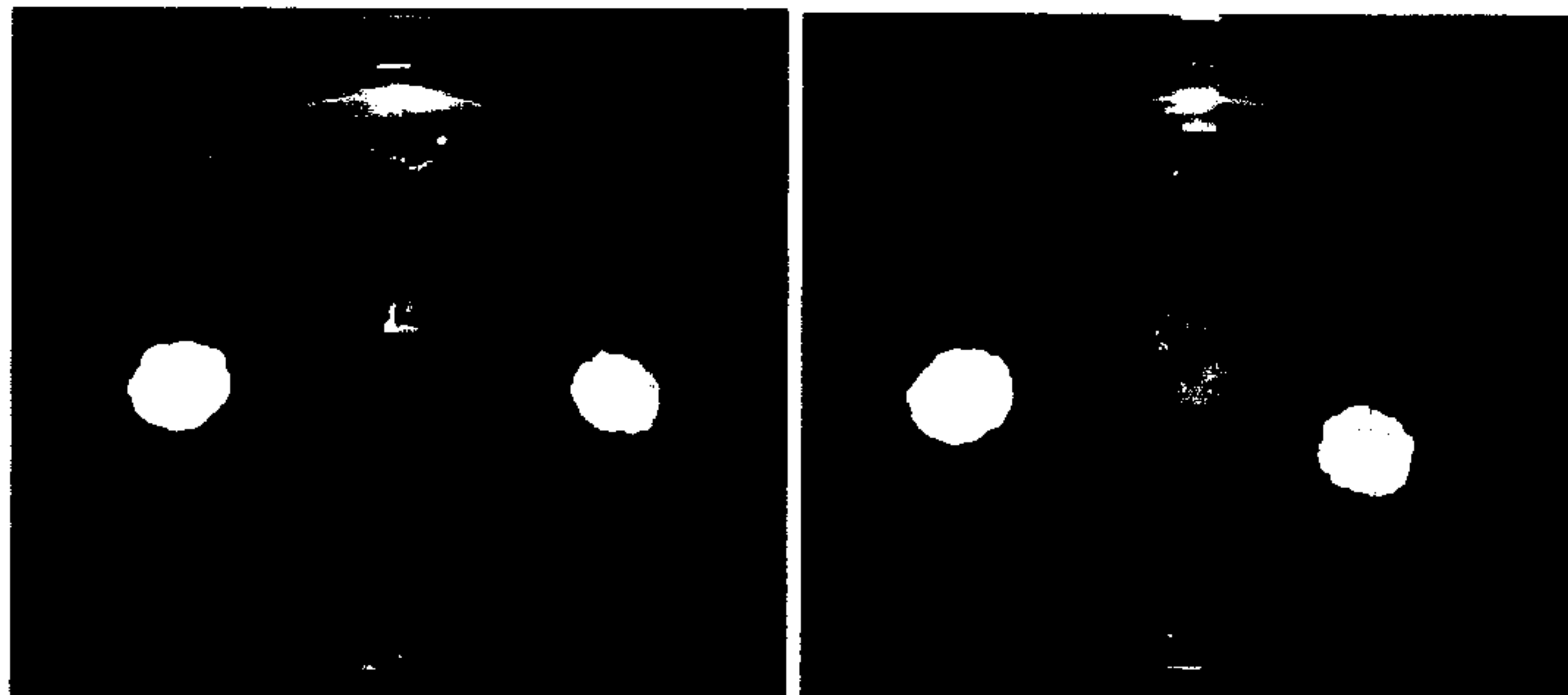
5d

FIGURA 4



Control

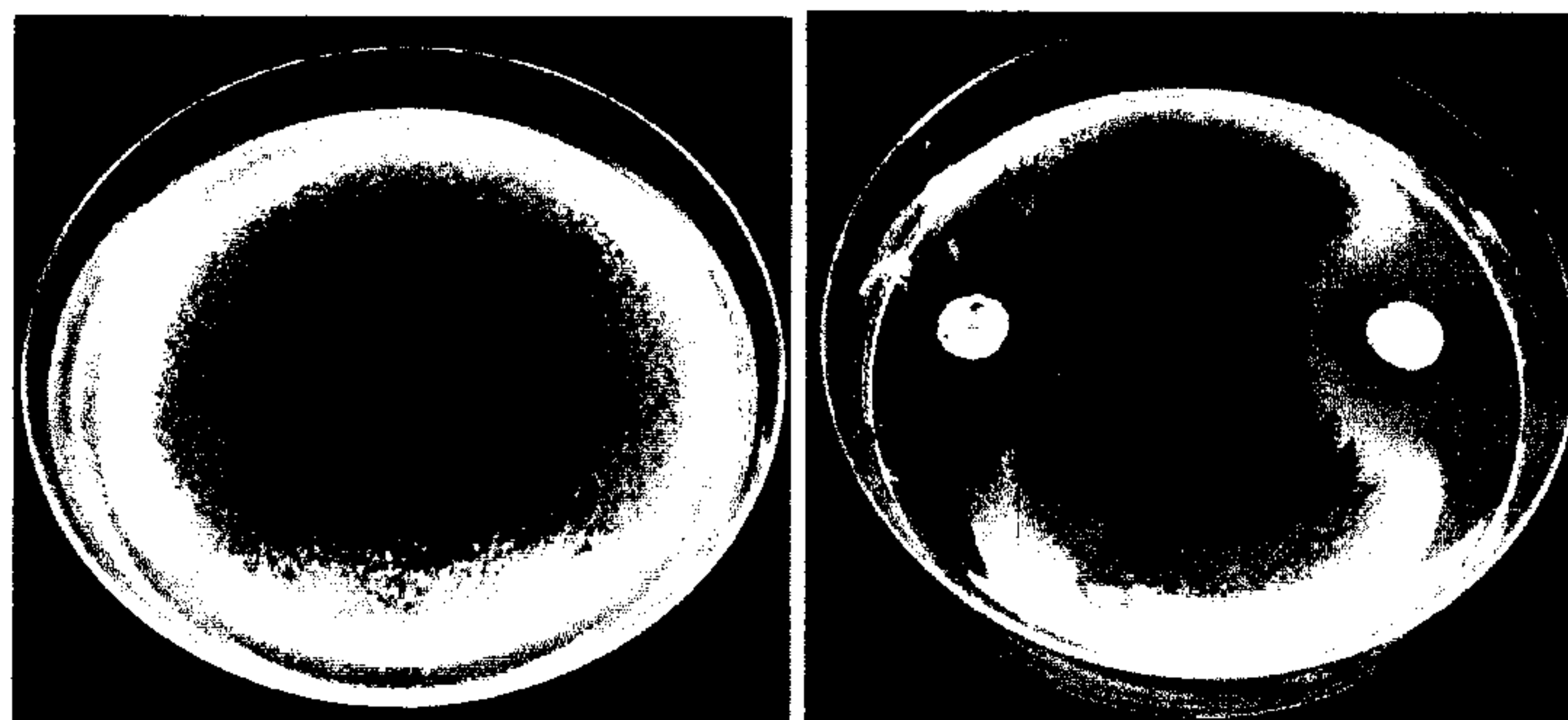
0d



3d

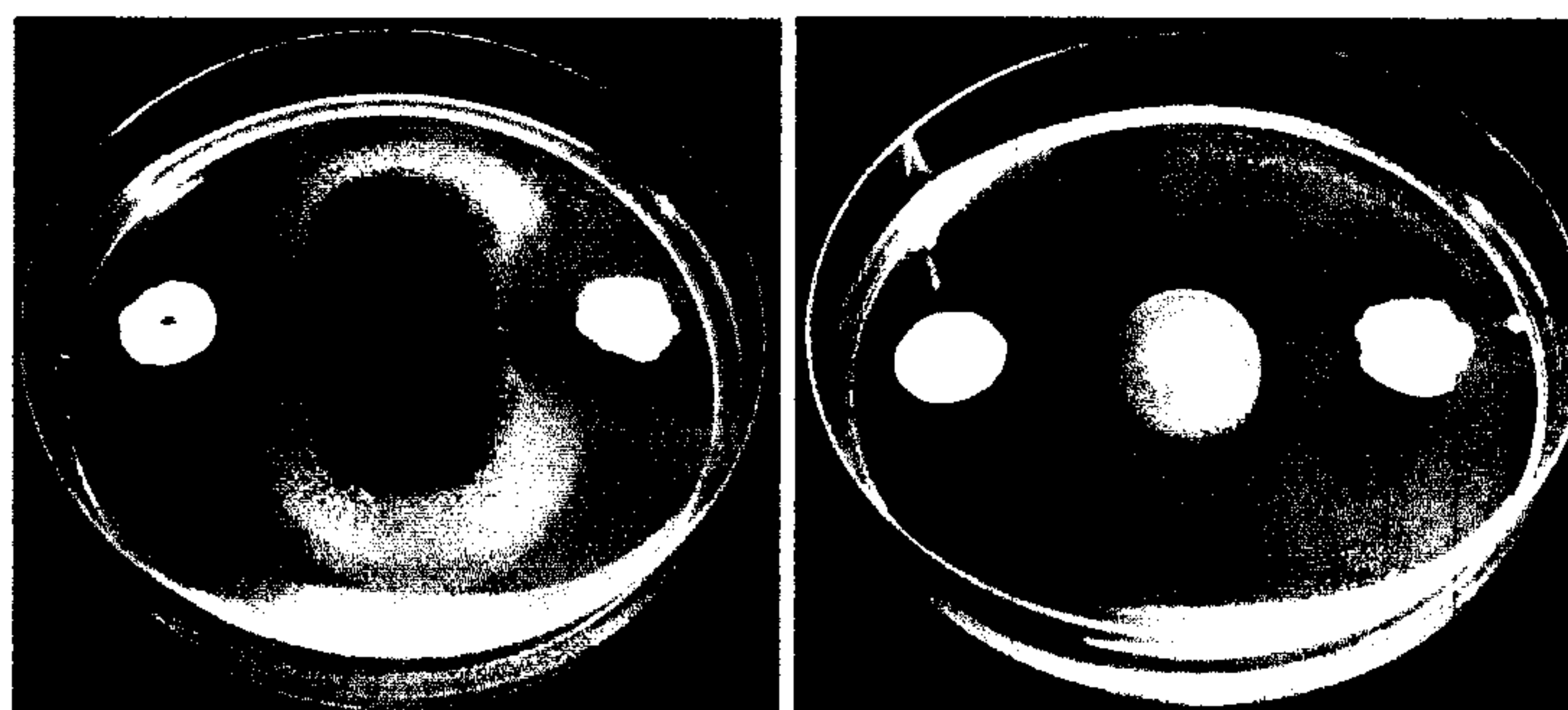
5d

FIGURA 5



CONTROL

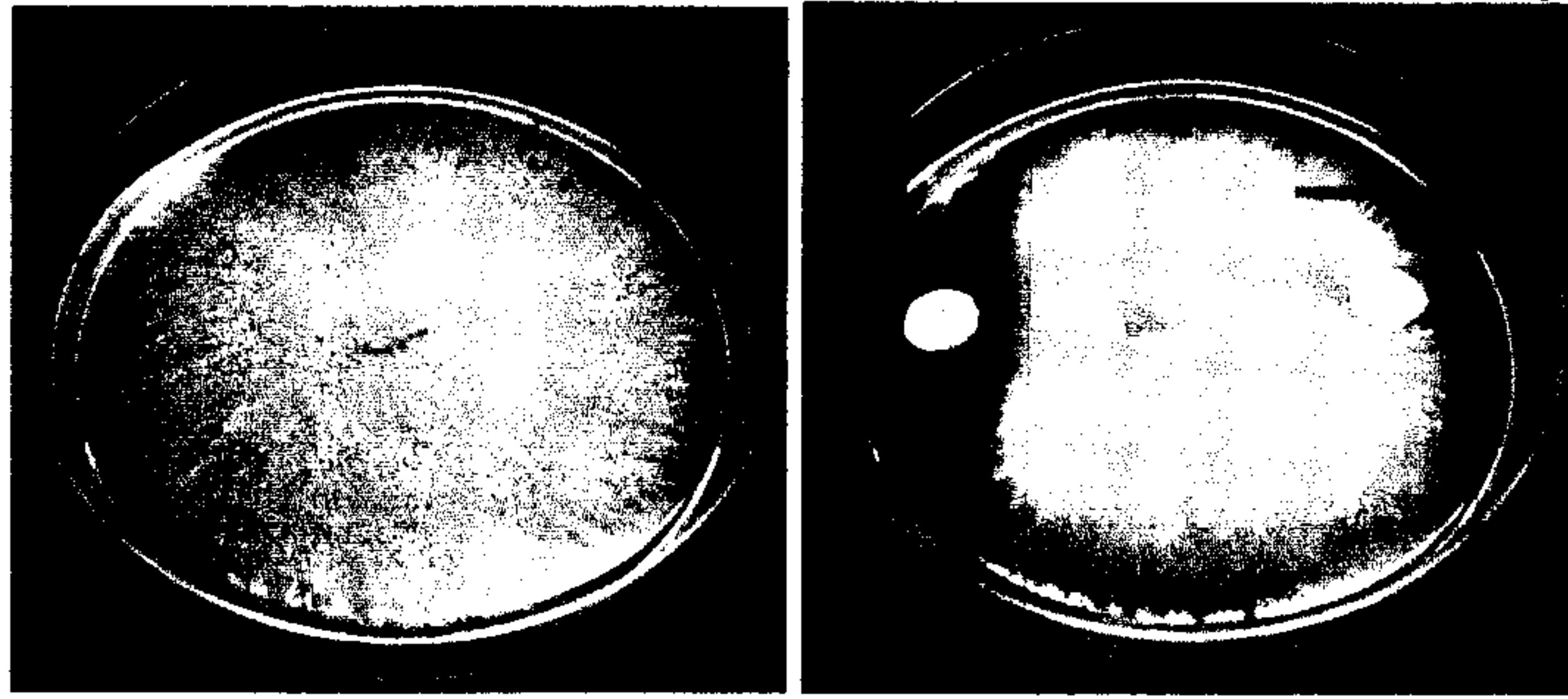
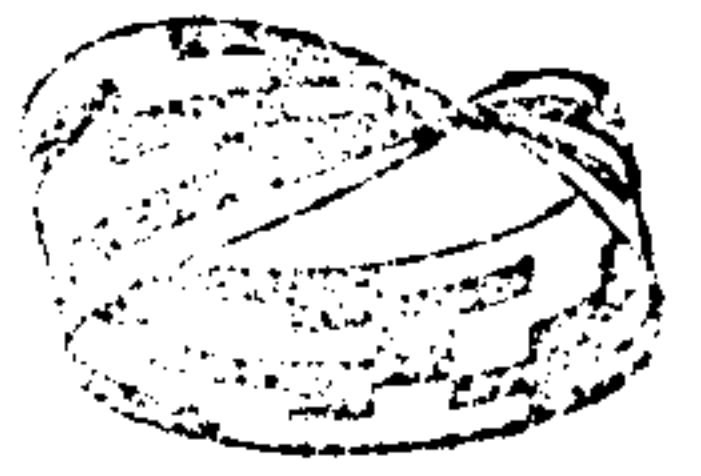
0d



3d

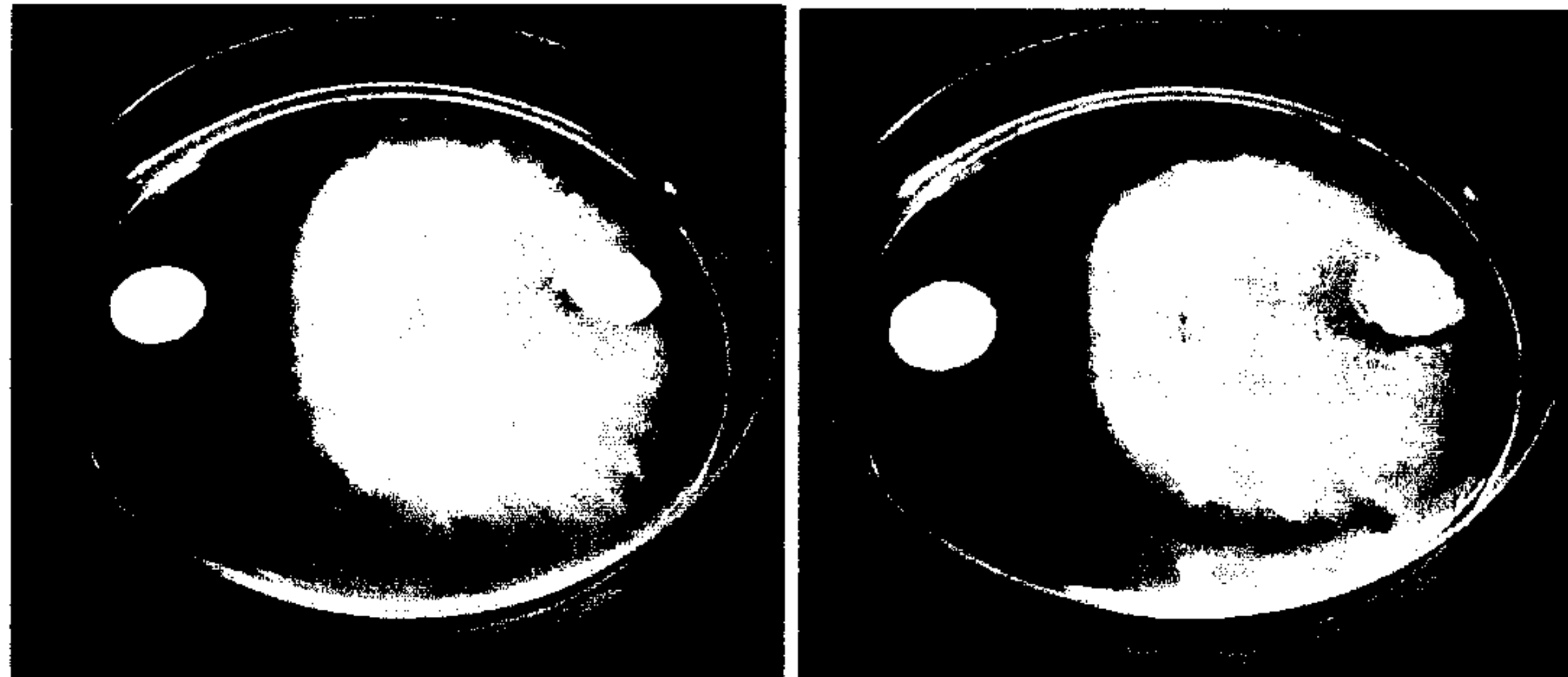
5d

FIGURA 6



Control

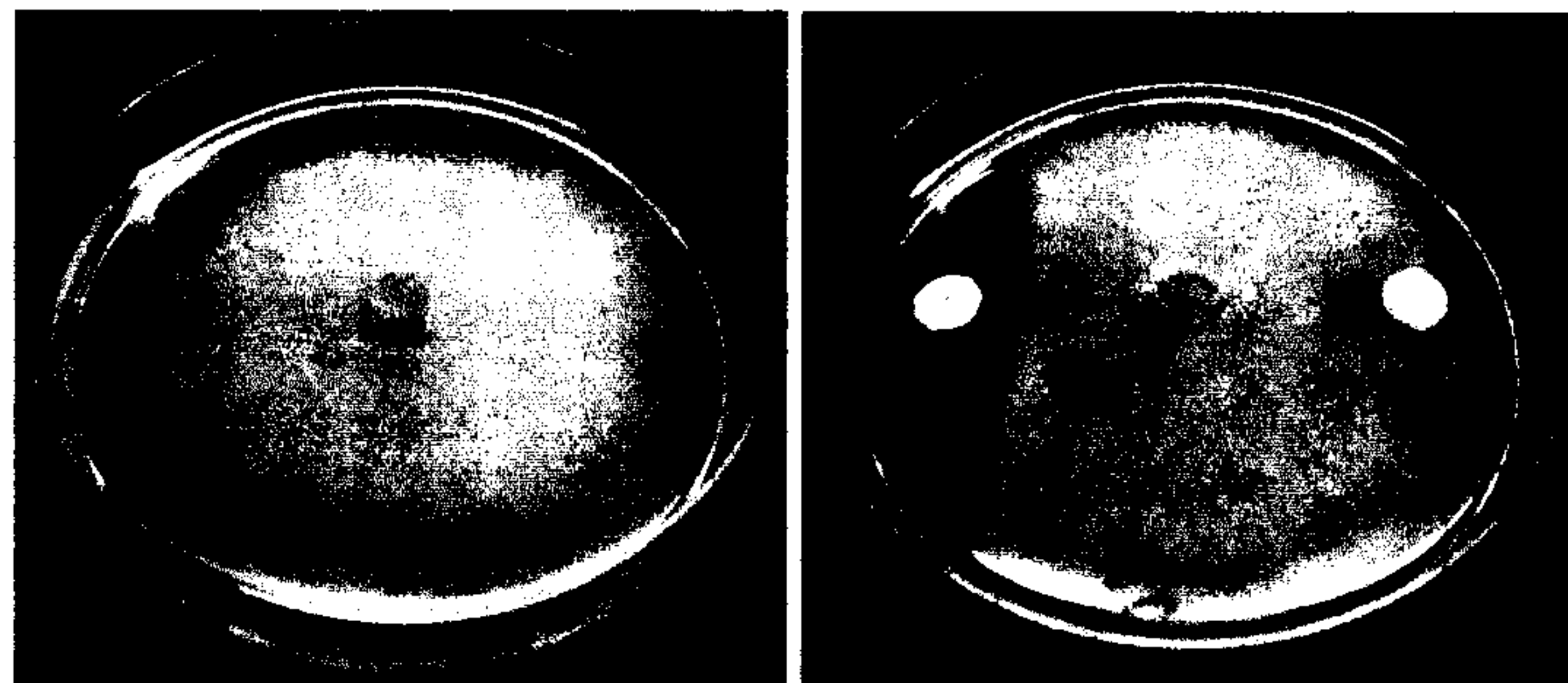
0d



3d

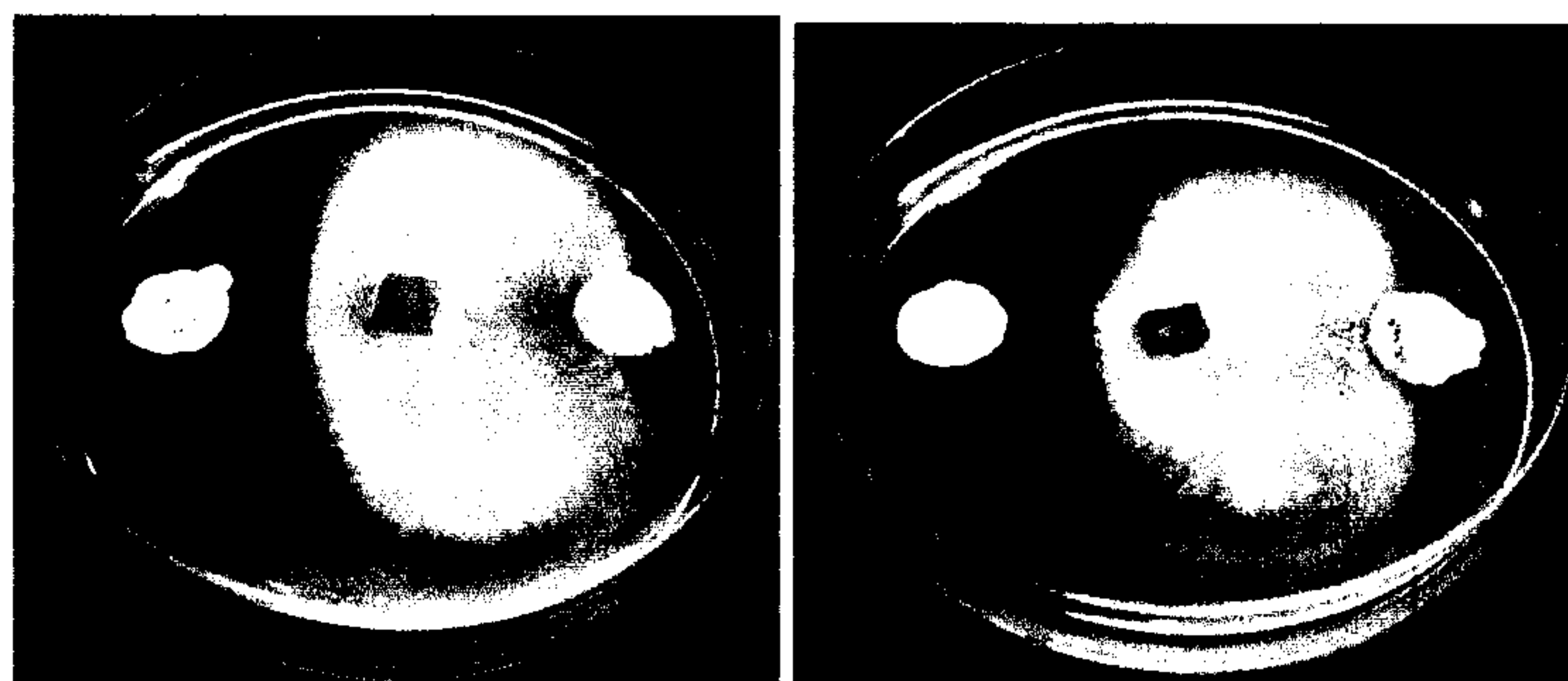
5d

FIGURA 7



Control

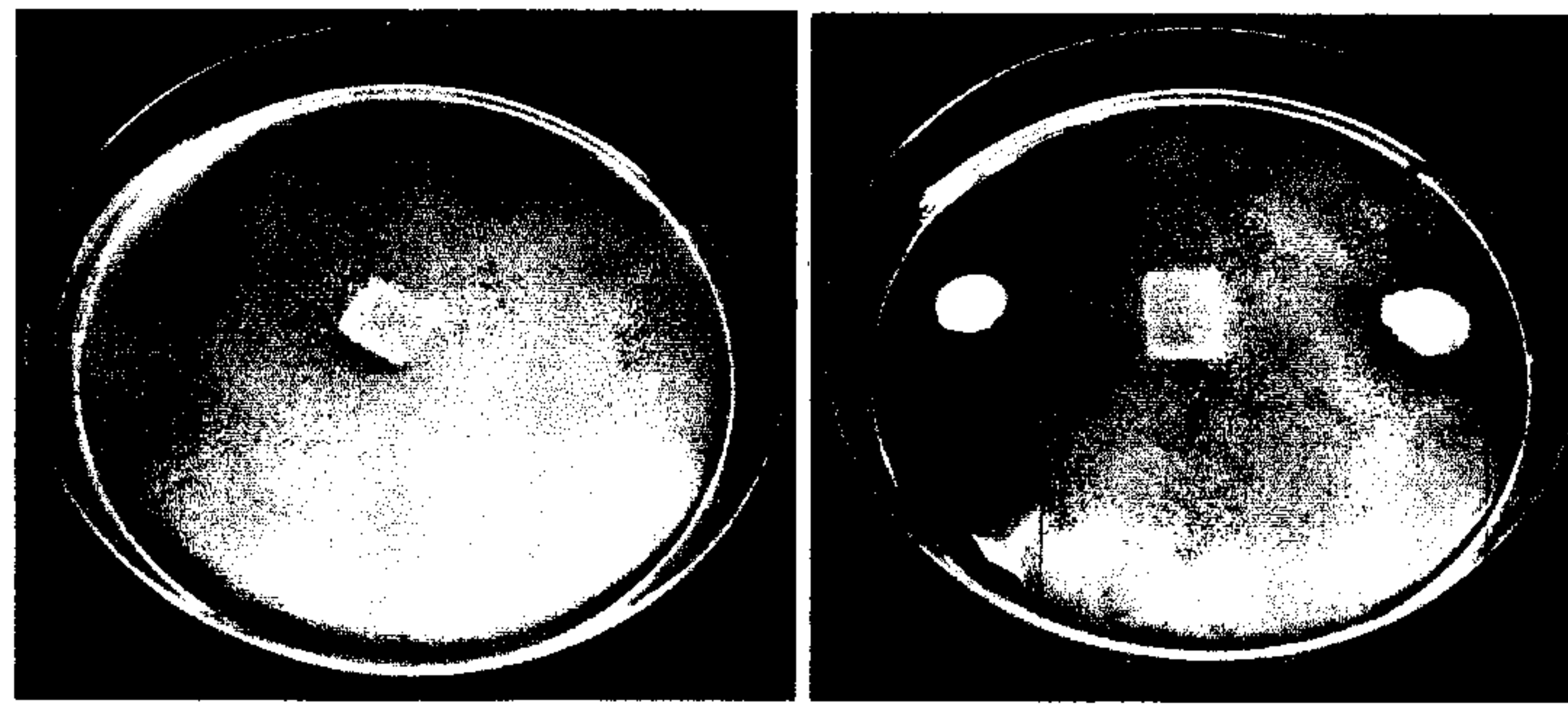
0d



3d

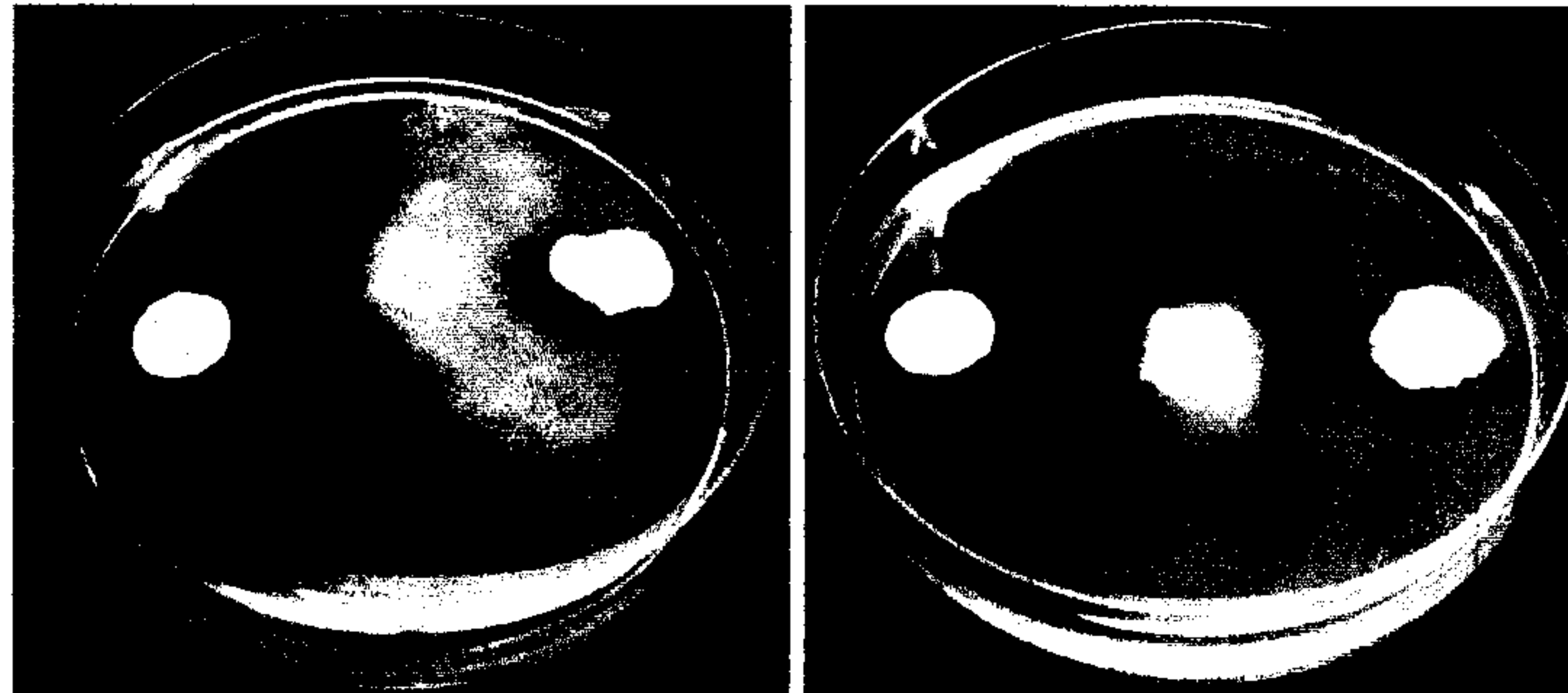
5d

FIGURA 8



CONTROL

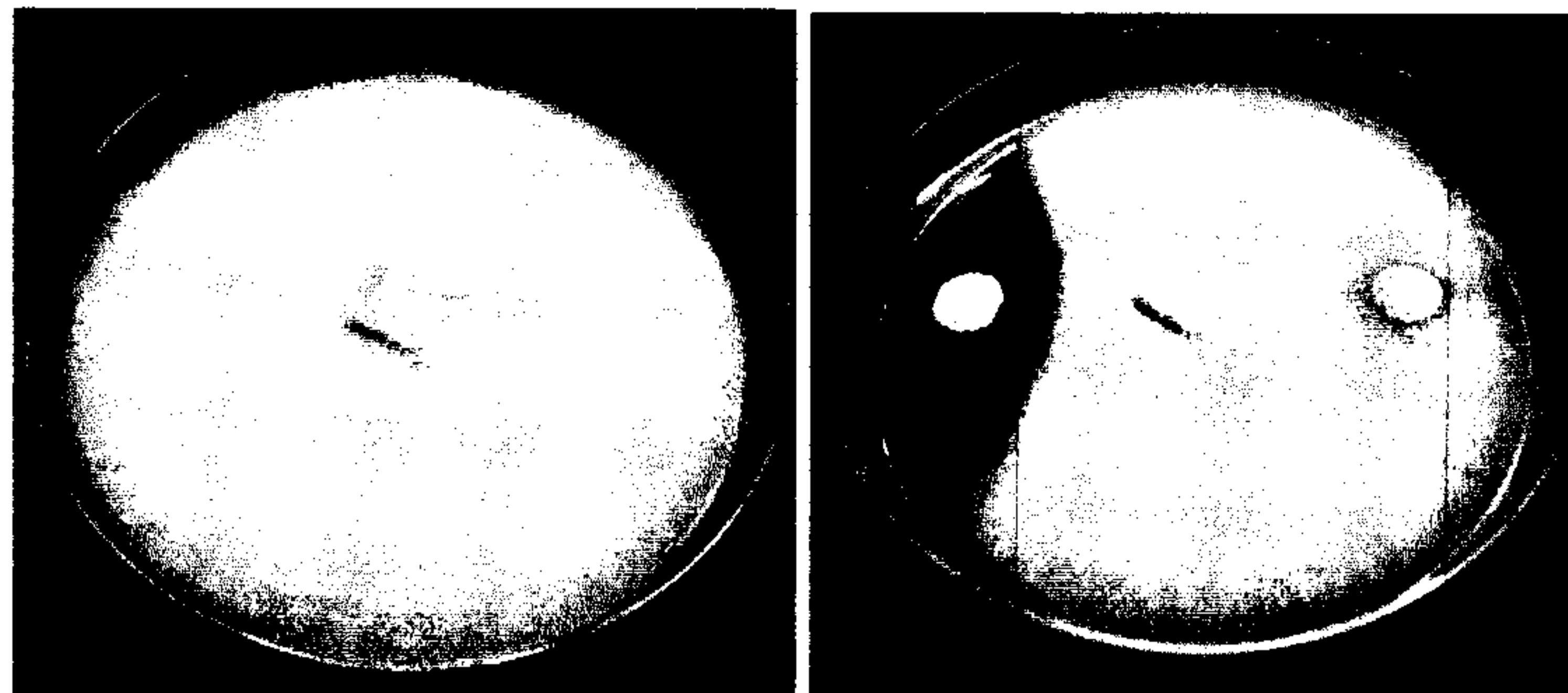
0d



3d

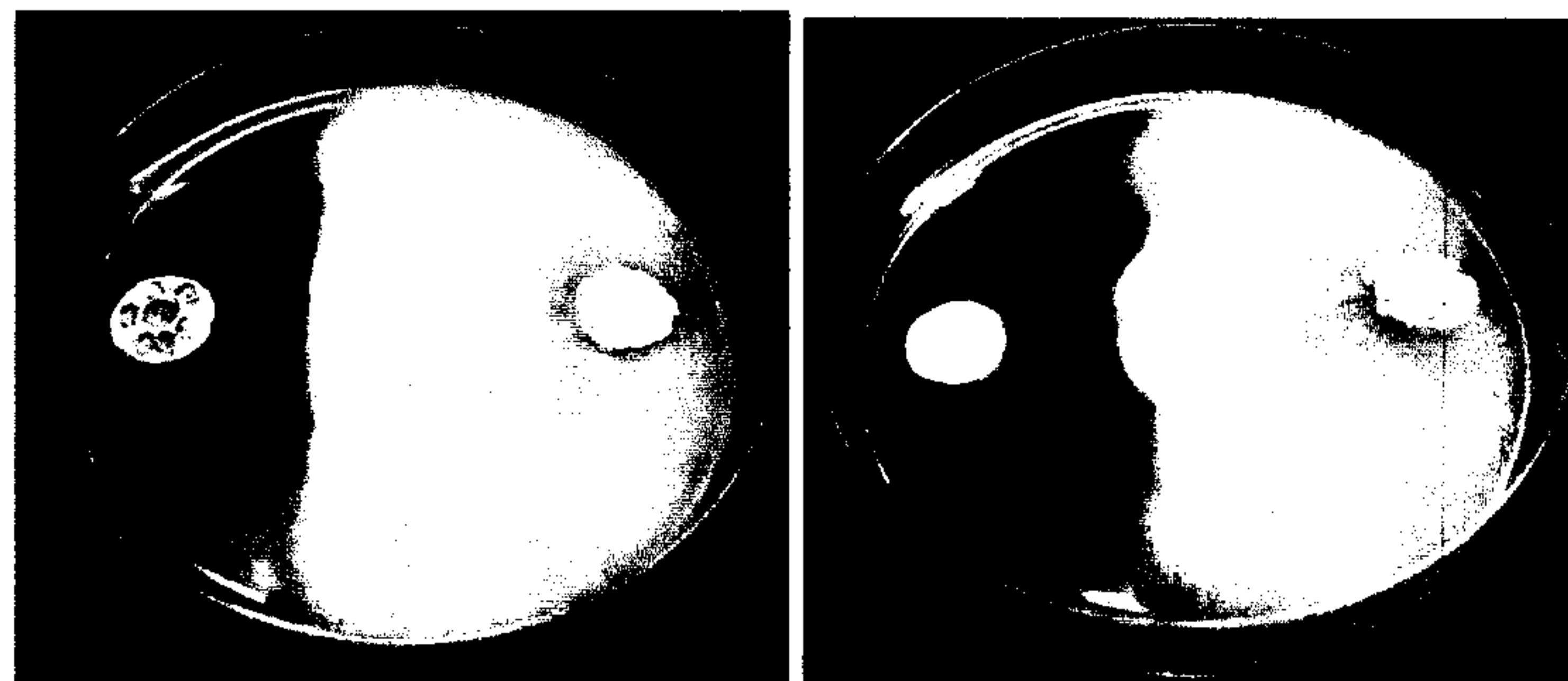
5d

FIGURA 9



CONTROL

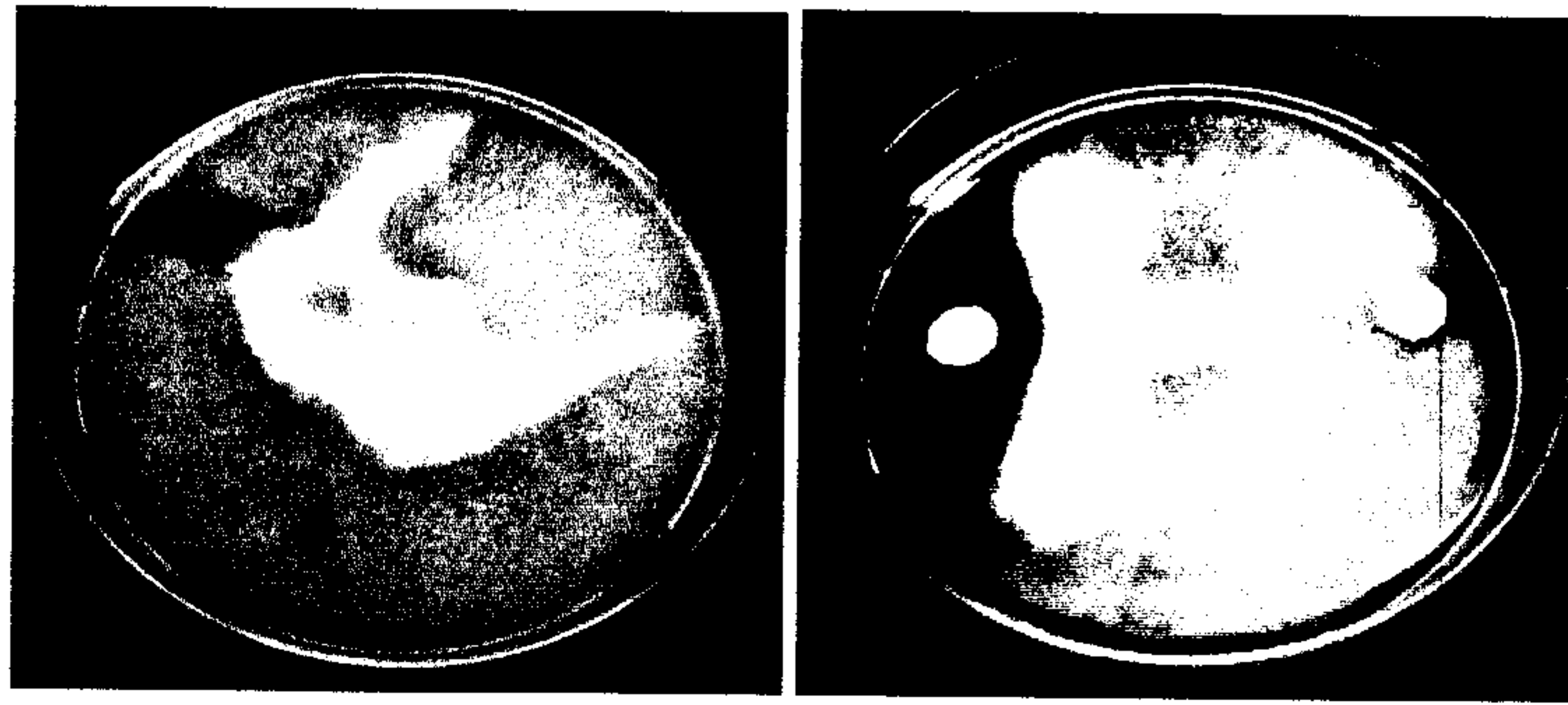
0d



3d

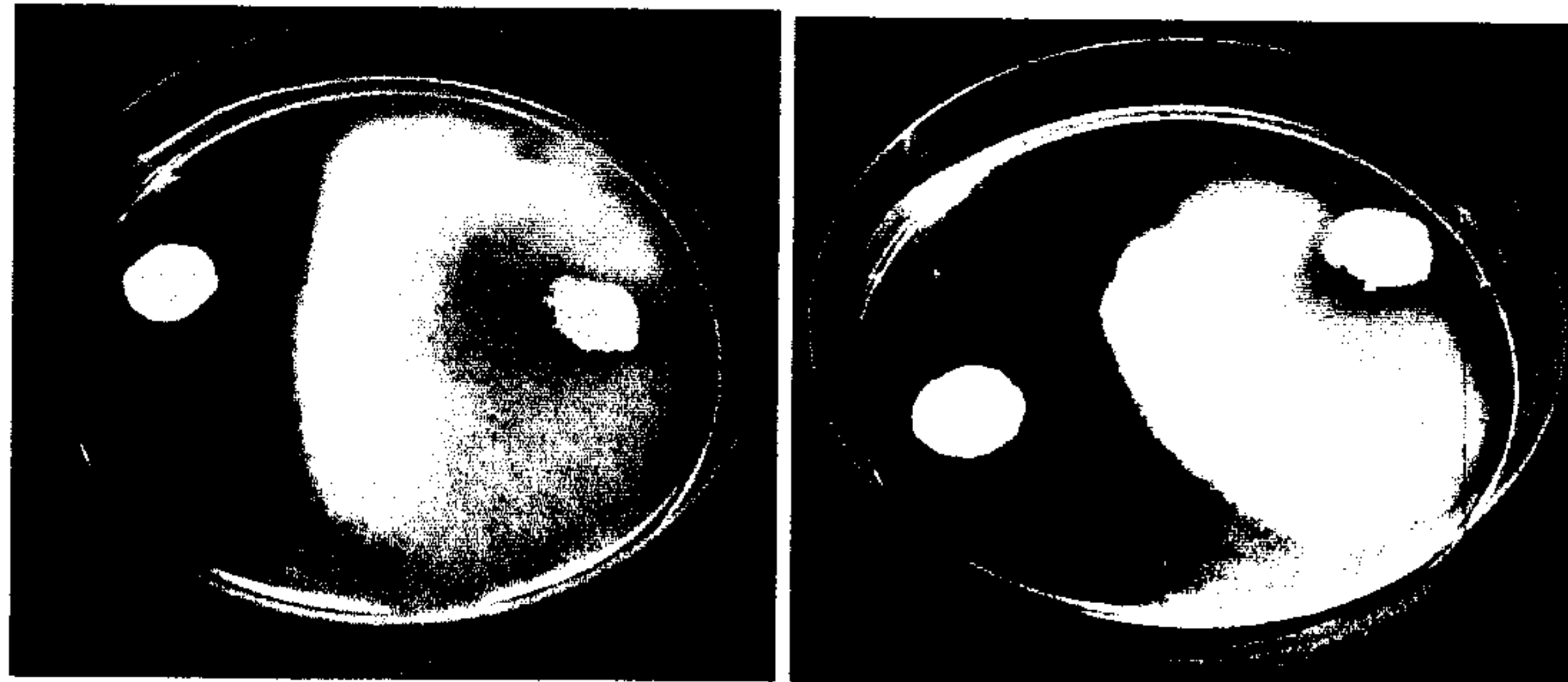
5d

FIGURA 10



CONTROL

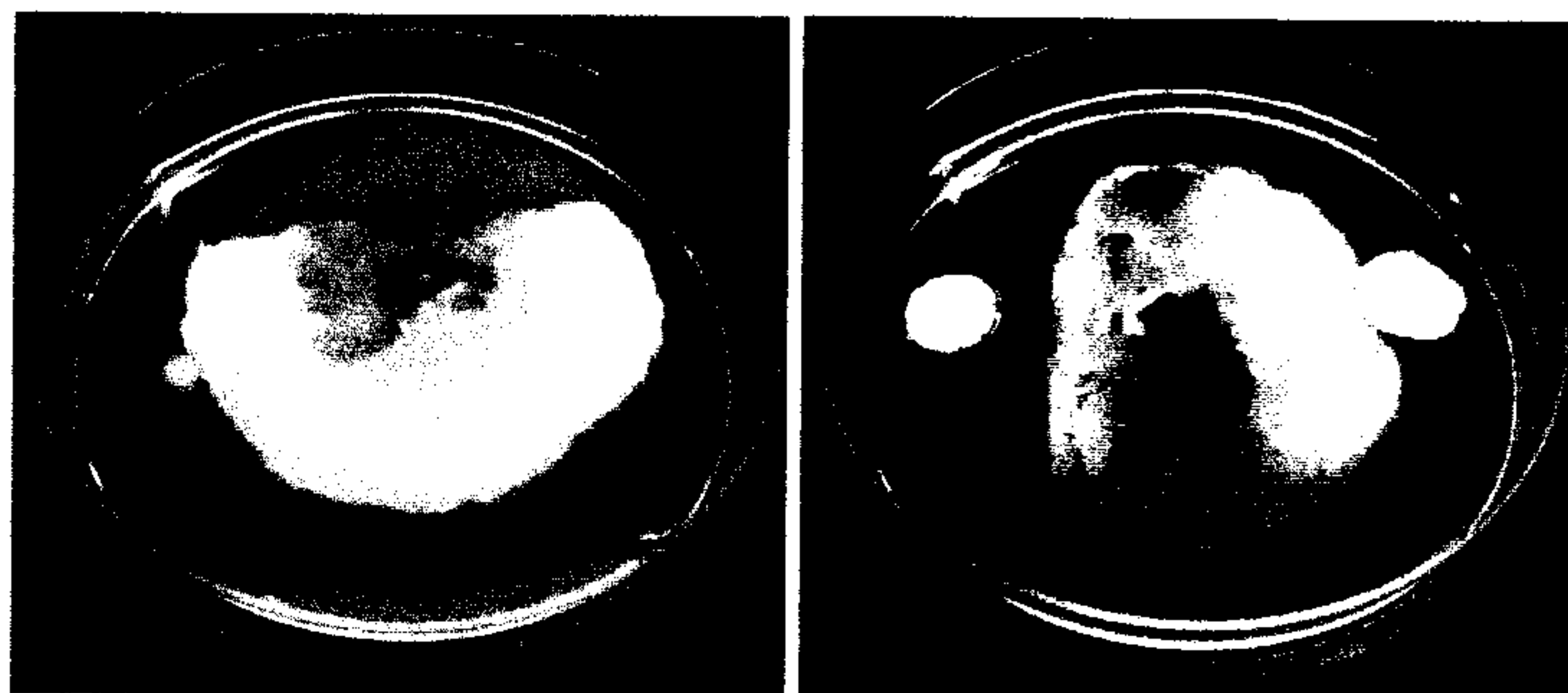
0d



3d

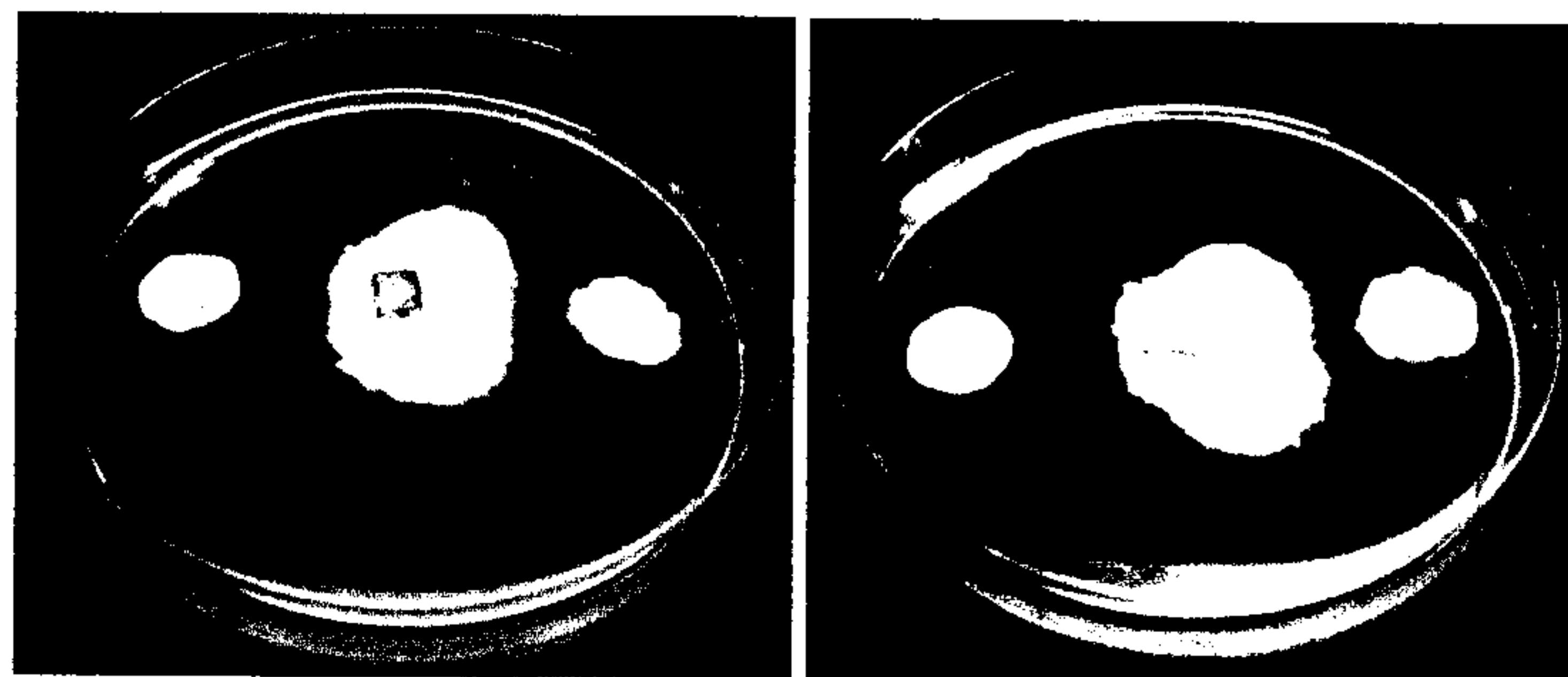
5d

FIGURA 11



CONTROL

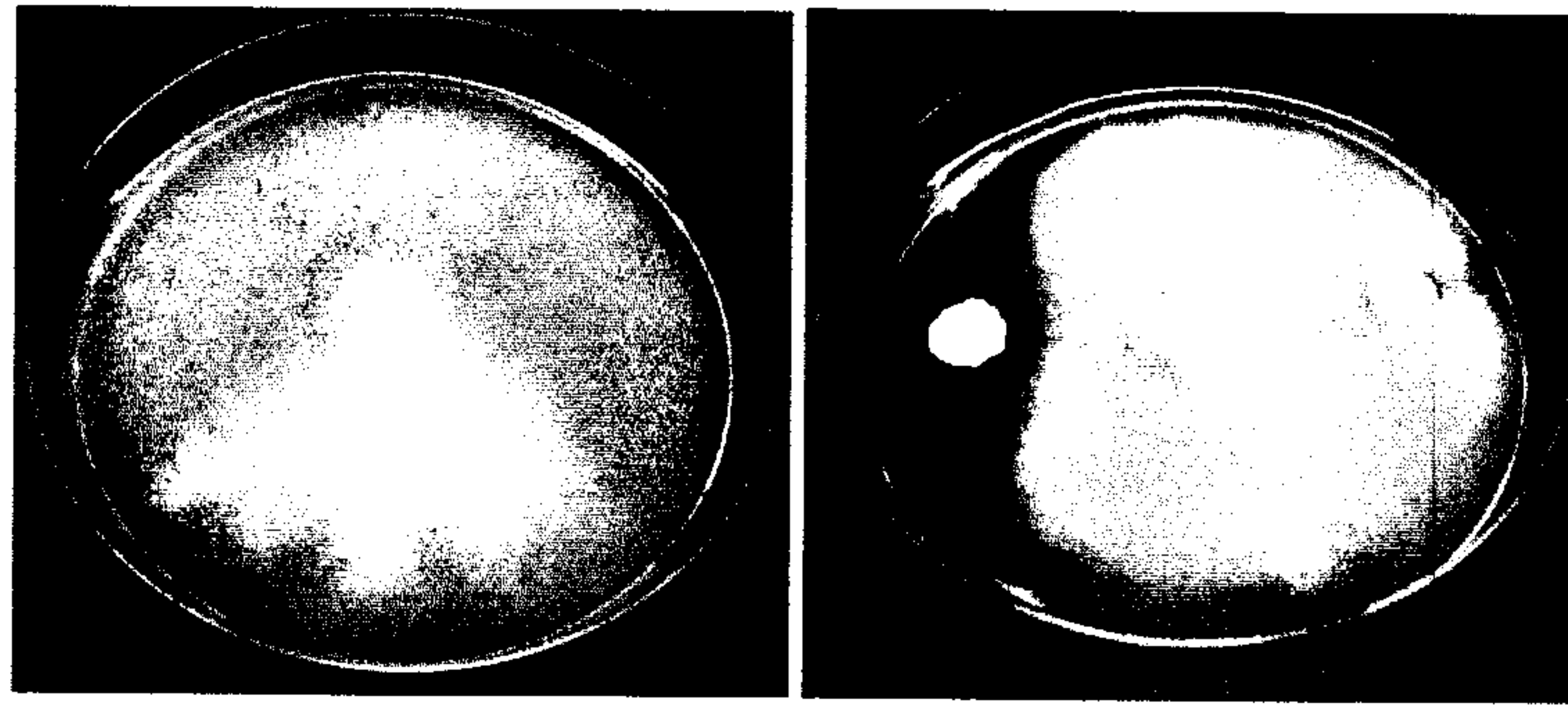
0d



3d

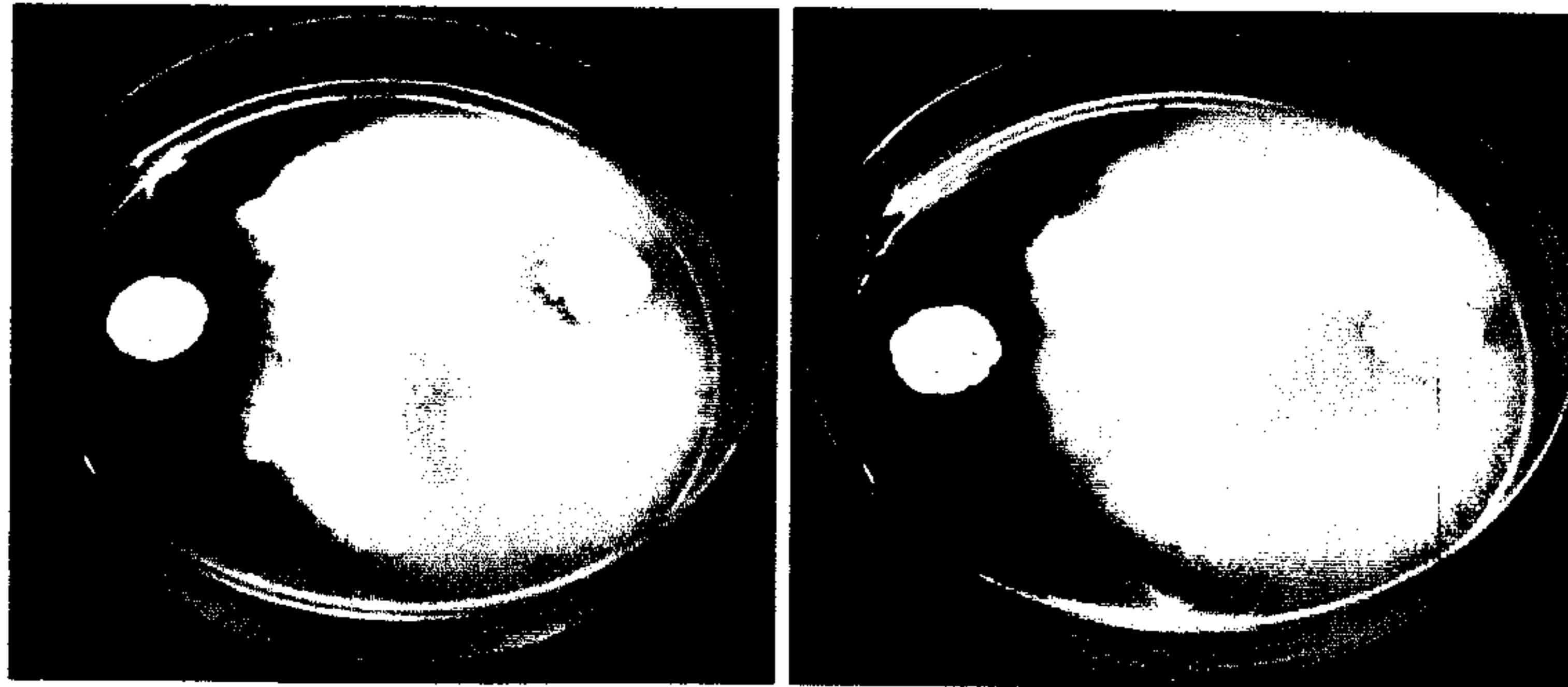
5d

FIGURA 12



CONTROL

0d



3d

5d

FIGURA 13

LISTADO DE SECUENCIAS

- (1) INFORMACION GENERAL
- (i) SOLICITANTE: Zahaed Evangelista Martínez
 - (ii) TÍTULO DE LA INVENCION: "Cepa de Streptomyces sp con actividad antagónica, composición que la contiene y uso de la misma.."
 - (iii) CAUSAHABIENTE: Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A.C
 - (iv)
 - (iv) NUMERO DE SECUENCIAS 1
 - (v) FORMA QUE PUEDE SER LEIDA EN COMPUTADORA: PatentIn Ver. 2.0

(2) INFORMACION PARA LA SEQ. ID NO.1

- (i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 - (A) LONGITUD: 641 pb
 - (B) TIPO: ADN
 - (C) TIPO DE CADENA: sencilla
 - (D) TOPOLOGIA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLECULA: ácido nucleico
 - (A) DESCRIPCION: ADN genómico
- (vi) FUENTE ORIGINAL:
 - (A) ORGANISMO: Streptomyces sp. NRRL- B-50597
- (ix) CARACTERISTICAS: gen
 - (A) NOMBRE/CLAVE: **Secuencia parcial ADN ribosomal 16S**
 - (B) LOCALIZACION: cromosoma
- (xi) DESCRIPCION DE LA SEQ ID NO: 1

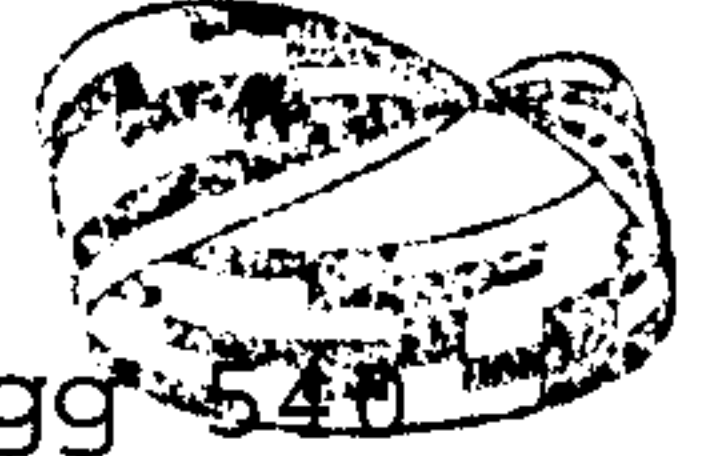
```

ctggcggcgt gcttaacaca tgcaagtcga acgatgaagc cacttcggtg gtggattagt 60
ggcgaacggg tgagtaacac gtgggcaatc tgcccttcac tctgggacaa gccctggaaa 120
cggggtctaa taccggataa cactctgtcc cgcattgggac ggggttgaaa gctccggcgg 180
tgaaggatga gcccgcggcc tatcagcttg ttggtggggg aatggcctac caaggcgacg 240
acgggtagcc ggccctgagag ggcgaccggc cacactggga ctgagacacg gcccgactc 300
ctacgggagg cagcagtggg gaatattgca caatgggcca aagcctgatg cagcgacgcc 360
gcgtgagggg tgacggcctt cggggttgtaa acctctttca gcaggaaga agcgaagtg 420
acggtacctg cagaagaagc gccggctaac tacgtgccag cagccgcggg aatacgtagg 480

```

IMPI

INSTITUTO MEXICANO
DE LA PROPIEDAD



gcgcaagcgt tgc ccggaat tattgggcgt aaagagctcg taggcggctt gtc ccggtcgg 540

atgtgaaagc ccggggctta accccggggtc tgcattcgat acgggctagc tagagtgtgg 600

taggggagat cggaattcct ggtgtagcgg tgaaatgcgc a