

## TÍTULO DE PATENTE No. 352682

**Titular(es):** CENTRO DE INVESTIGACION Y ASISTENCIA EN TECNOLOGIA Y DISEÑO DEL ESTADO DE JALISCO, A.C.

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

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

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

**Inventor(es):** ZAHAED EVANGELISTA MARTINEZ

### SOLICITUD

**Número:** MX/a/2012/005834  
**Fecha de Presentación:** 6 de Diciembre de 2011  
**Hora:** 10:23

**Divisional de la Patente Número:** 351439

**Vigencia:** Veinte años

**Fecha de Vencimiento:** 6 de diciembre de 2031

**Fecha de Expedición:** 22 de noviembre de 2017

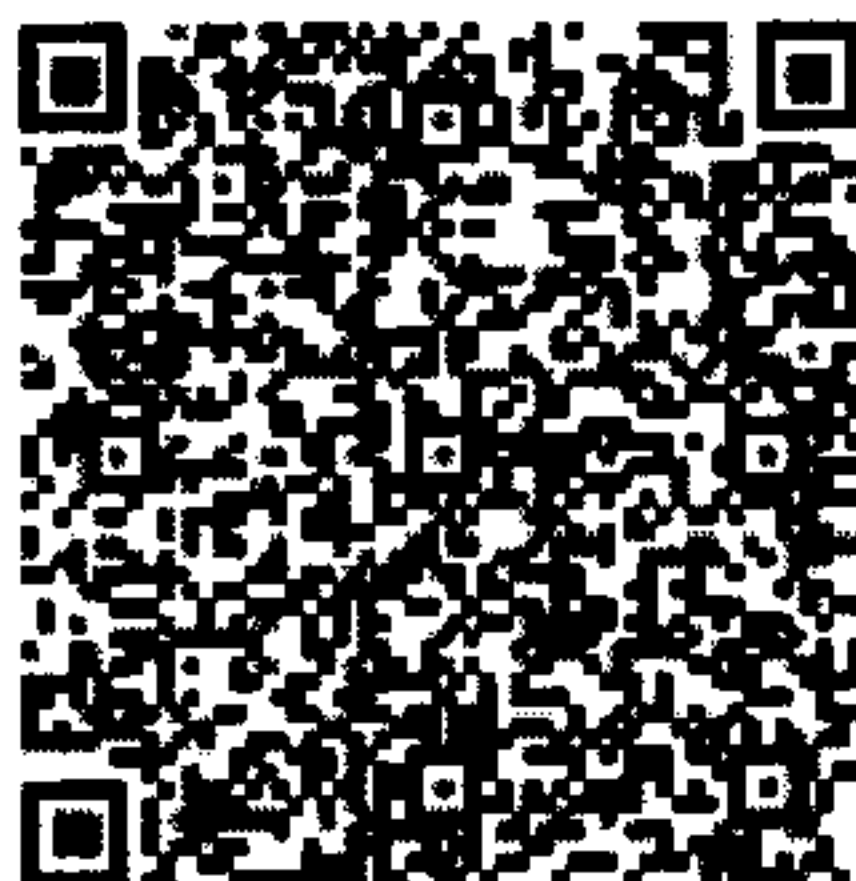
La patente de referencia se otorga con fundamento en los artículos 1º, 2º fracción V, 6º fracción III, y 59 de la Ley de la Propiedad Industrial.

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 02/08/1994, 25/10/1996, 26/12/1997, 17/05/1999, 26/01/2004, 16/06/2005, 25/01/2006, 06/05/2009, 06/01/2010, 19/06/2010, 28/06/2010, 27/01/2012 y 09/04/2012); artículos 1º, 2º 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, 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, 2º y 5º 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/a/2012/005834|Título Patente divisional Matriz|1220|RRGO|Pág(s) 1|5bU5KY7CnoHuFOm3pfZWuV9YyTs=

Sello Digital:  
DgPfa0JJsosXepkB3fHziRbU+uwxwd+pq6ZwBSSd4ausTymKNfgqJl69F5GVCc6L63HBGf/rhZEaCedk/+gzCbOXI zVM6L05XpXajK/14mRuF0BnA7/SVZSpBqjFaPHXsg9WOY2ab2z7K9DVfTtCOMufi+Ohq46XkANr0D+4g51PFkbAUZK t3qPri7HO1c0ESxPAVKHxpp7T/insphZX1xJQqXnQaWr9xET4sDws4vsGMCSLYPmMuLNdmA71zLYjc2xVFQvZvjEjzJ Kfa1p1d9FHUCbLrOmpyLfz2mcmngDLacLhY5IA08h0YgftQ43mmINDuYF9Xs8qjQlgkJGFA==



DIC

~~No con. 352622~~



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

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 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 filamentoso, son 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, 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 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 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. Plant 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*

(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

5 plantas en los que se ha observado una reducción significativa en el crecimiento del hongo (Yuan y Crawford, 1995. Appl. Environ. Microbiol.

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*

10 *al.*, 2010. Afr. J. Microbiol. Res. 4:2451-2556).

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

15 En el estado de la técnica no se encuentran documentos que mencionen específicamente a la cepa de *Streptomyces* sp. descrita 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  
20 presente solicitud y citamos a continuación las más relevantes.

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 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 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 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 *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, 5 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 10 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 15 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 20 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 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 posteriores desarrolla micelio aéreo el cual adquiere una coloración café oscura, y una vez maduro desarrolla las cadenas de esporas.

5 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*.

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 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 la SEQ ID No. 1.

20 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 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 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.

#### 10 **BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS**

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

5 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  
10 *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  
15 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  
20 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  
5 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)  
10 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  
15 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  
inoculó al mismo tiempo que Cu (0 d); en otro experimento S-1.16 se  
20 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 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  
5 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*  
10 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  
15 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  
20 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  
5 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*  
10 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  
15 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*  
20 sp. para comparar la ventaja de S-1.16CA como cepa antagonista.

**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.

5           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  
10 fitopatógenos en la planta o en la planta crecida a partir de dicha 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.

15           Adicionalmente, se describe y reclama el uso de la multicitada 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,  
20 describir y reclamar una formulación agronómica, que comprende una 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.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

### 5 **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.

15 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

20 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 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-1.16CA				
Prueba		Fuente <sup>c</sup>	C	E
Tinción Gram	+	Ninguna	+/-	-
Hidrolisis de almidón	+	D-glucosa	+	+
Hidrolisis de caseína	+	Sacarosa	+/-	-
Producción de melanina	-	L-xilosa	+/-	-
		D-xilosa	+	+
<b>Características del cultivo en ISP2 <sup>A</sup></b>				
Micelio vegetativo (reverso)	Amarillo	Maltosa	+	+
Micelio aéreo	Blanco	D-arabinosa	+	+
Masa de esporas	Amarillo claro	D-lactosa	+	+
Producción pigmentos	Amarillo brillante	D-raffinosa	+/-	-
<b>Producción de enzimas extracelulares <sup>B</sup></b>				
Lipasa	-	D-cellobiosa	+	+
		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).

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. E, esporulación; interpretación: (+), formación vigorosa de esporas; (+/-), débil formación de esporas; (-), sin esporulación.

### 15 **Condiciones de cultivo.**

Todos los medios de crecimiento se prepararon empleando 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.

20 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

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  $\text{MnCl}_2$   
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  
5 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  
10 papa, 20 gr/l de dextrosa y 15 gr/l de agar. El medio es distribuido  
comercialmente por Millipore SA de CV.

### **Hongos fitopatógenos.**

Los hongos patógenos empleados son *Aspergillus niger* NRRL-3  
and *Fusarium* sp. (CDBB:1172), obtenidos de la Colección Mexicana de  
15 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  
20 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  
5 de 100 ml de medio de cultivo inoculado con un stock de esporas con  
una densidad de aproximadamente  $1.5 \times 10^9$  ufc/ml y se mantiene en  
incubación a una temperatura de  $29^\circ$  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  $1 \times 10^8$  ufc/ml, el  
10 cual es usado directamente para inocular a la cepa en el medio de  
cultivo, empleando entre 2-5  $\mu$ 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  
15 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  $1 \times 10^8$  de ufc/ml, la cual es usada para  
20 inocular un medio de cultivo, empleando ente 2-5  $\mu$ 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  
5 mediante técnicas estándares, pero incorporando en la extracción 0.5 % de microperlas de vidrio (diámetro de 106  $\mu\text{m}$ ) 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  $\mu\text{l}$  que contiene 1X del buffer de reacción,  $\text{MgCl}_2$  a  
10 2 mM, dNTP cada uno a 0.2 mM, 2 ng de DNA cromosomal, 0.4  $\mu\text{M}$  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  
15 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:

20 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

5 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

10 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:

15

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.**

20

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  
5 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  
10 *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  
15 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,  
20 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 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 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 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 polvos finos a raíces, plántulas o semillas. Dichos polvos finos (con un tamaño de grano igual o menor a  $250 \mu\text{m}$ ) 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 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.

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.

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  
5 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  
10 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  
15 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  
investigación realizada para la concreción del invento, como en  
comparación con las cepas silvestres de referencia o de cepas  
20 comerciales.

De tal forma que, a la luz de la descripción detallada de la  
invención, a continuación se exponen los siguientes ejemplos

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

### 5 Ejemplo 1

#### **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  
10 por Shirling y Gottlieb (1966). La tabla 1 presenta los resultados  
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  
15 las características de la colonia madura como son el borde lobulado,  
aspecto crateriforme y con el micelio vegetativo amarillo, a partir de  
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  
20 pigmento amarillo brillante en forma de gota en cultivo en medio  
sólido (en la foto), que se difunde en el medio de cultivo. La  
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 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 comento.

## 10 **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 µl de la suspensión de esporas de concentración 1 X 10<sup>8</sup> 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:  $PI (\%) = \frac{FR - AR}{FR} \times 100$ , 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

<b>ACTIVIDAD ANTAGONISTA DE <i>Streptomyces</i> sp NRRL B-50597 (%)</b>			
	<b>Porcentaje de inhibición +/- desv. Estándar *</b>		
<b>Patógeno</b>	<b>0 DIAS</b>	<b>3 DIAS</b>	<b>5 DIAS</b>
<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 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 contra los fitopatógenos que se mencionan tienen la finalidad de

10

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 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 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.

Tabla 3

ACTIVIDAD ANTAGONISTA DE <i>Streptomyces</i> sp NRRL B-50597 (%) *			
Porcentaje de inhibición (+/- DE)			
Patógeno	0 días	3 días	5 días
<i>Fusarium</i> sp. CDBB:1172	54.8 (0.5)	64.8 (1.4)	71 (2.3)



<i>Fusarium</i> sp. Chile hab	52.9 (1.8)	74.1 (4.2)	77.6 (1.0)
<i>Alternaria</i> sp.	47.6 (1.2)	60.6 (1.7)	61.4 (3.0)
<i>Curvularia</i> sp.	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 composición agronómica para promover resistencia contra microorganismos fitopatógenos en plantas, caracterizada porque  
5 comprende: una cepa de *Streptomyces* sp., que contiene una secuencia de ADN ribosomal 16S conforme a la SEQ ID No. 1, y que está depositada en la ARS Culture Collection (NRRL) bajo el número de acceso NRRL B-50597; y un portador agronómicamente aceptable.
2. La composición agronómica de conformidad con la reivindicación 1,  
10 caracterizada además porque la cepa de *Streptomyces* sp., que contiene la secuencia identificada como SEQ ID No.1 está presente en la composición en una cantidad de  $10^6$  a  $10^{11}$  ucf/g.
3. La composición agronómica de conformidad con una de las  
15 reivindicaciones 1 - 2, caracterizada además porque está en la forma de presentación de gránulos, polvos, o de suspensiones líquidas.
4. Uso de la composición agronómica de las reivindicaciones 1 - 3, para promover la resistencia contra microorganismos fitopatógenos en plantas, en donde los microorganismos fitopatógenos son particularmente hongos.
5. Uso de conformidad con la reivindicación 4, en donde los hongos incluyen  
20 a los géneros *Fusarium*, *Curvularia*, *Helminthosporium*, *Aspergillus*, *Alternaria*, *Phytophthora*, *Colletotrichum* y *Rizoctonia*.
6. Un método para promover resistencia contra microorganismos fitopatógenos en plantas, caracterizado porque comprende aplicar una

---

composición como la que se describe en las reivindicaciones 1 - 3, a una plántula, semilla de planta, o directamente al suelo.

7. El método de conformidad con la reivindicación 5, en donde la aplicación es a nivel invernadero o a nivel de campo.

5

10

15



## RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención describe y reclama una cepa de *Streptomyces* sp., con  
5 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.  
Asimismo se describe un método para tratar plantas infectadas con la misma.

**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 ttggtggggt aatggcctac caaggcgacg 240
acgggtagcc ggcctgagag ggcgaccggc cacactggga ctgagacacg gccagactc 300
ctacgggagg cagcagtggg gaatattgca caatgggcca aagcctgatg cagcgacgcc 360
gcgtgagggg tgacggcctt cggggtgtaa acctctttca gcagggaaga agcgaagtg 420
acggtacctg cagaagaagc gccggctaac tacgtgccag cagccgcggt aatacgtagg 480

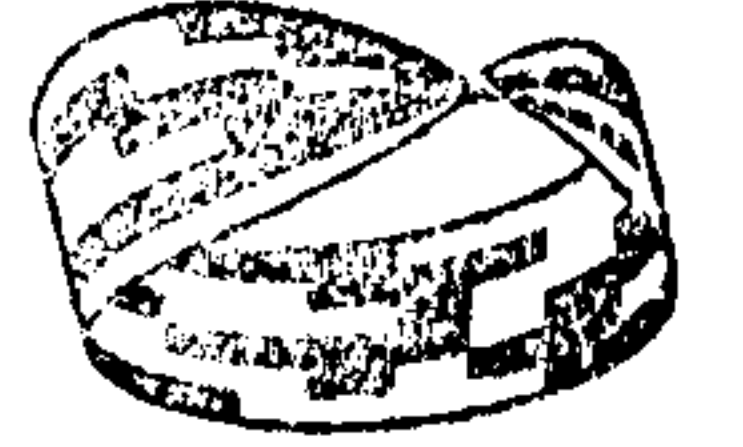
```



gcgcaagcgt tgtccggaat tattgggcgt aaagagctcg taggcggcctt gtcacgtcgg 540

atgtgaaagc ccggggctta accccgggctc tgcattcgat acgggctagc tagagtgtgg 600

taggggagat cggaattcct ggtgtagcgg tgaaatgcgc a 641

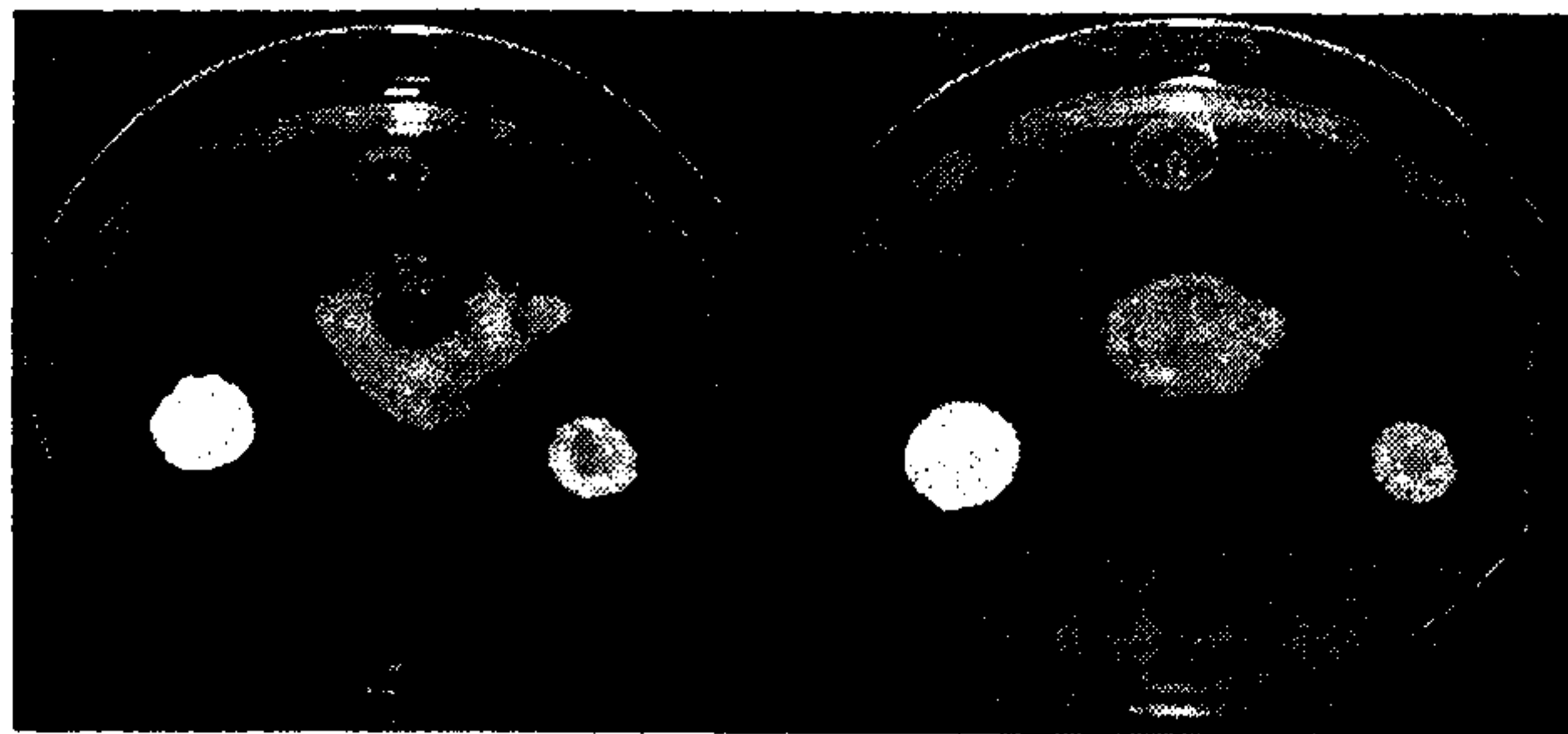


**FIGURA 1**



**CONTROL**

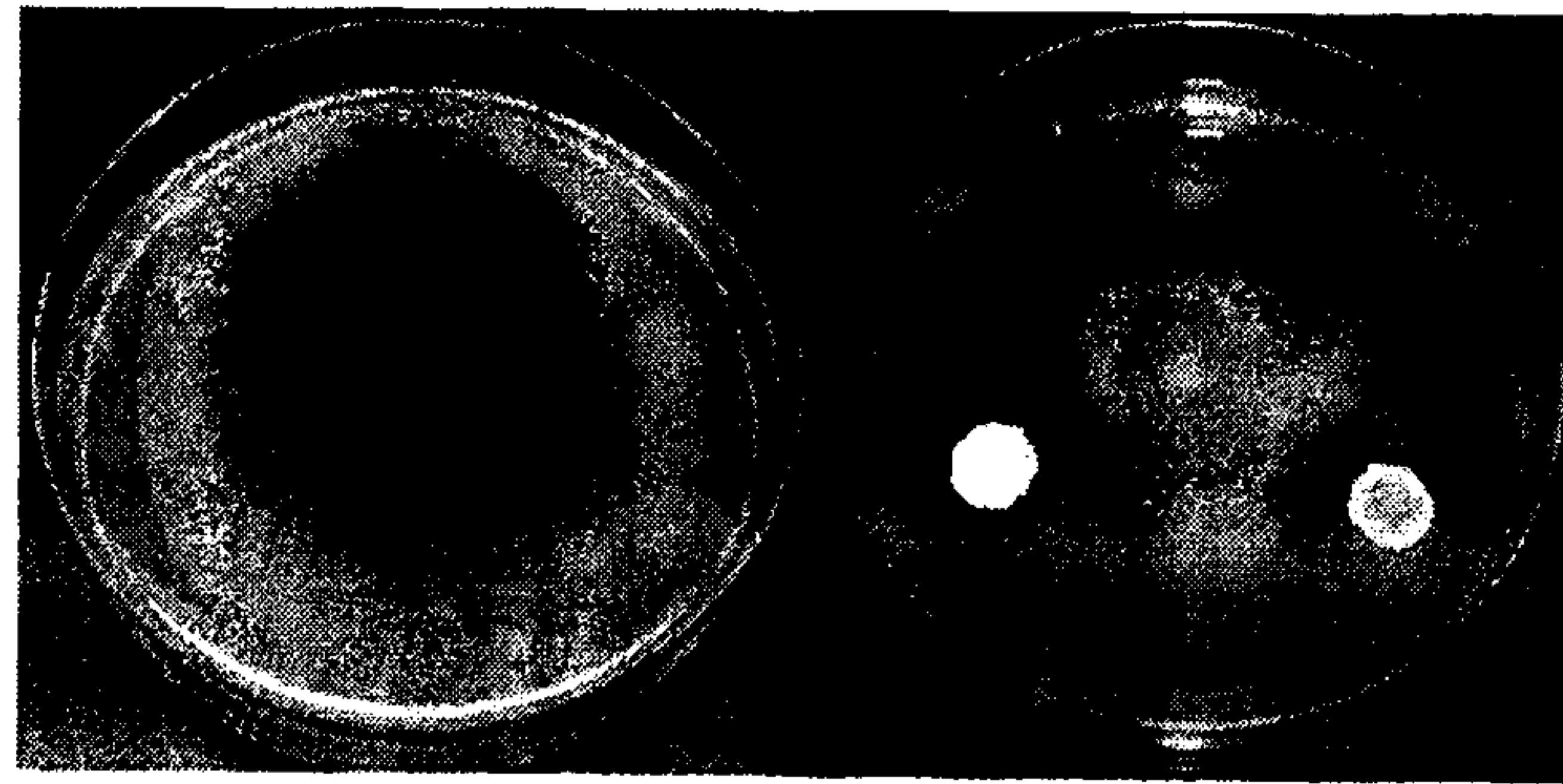
**0d**



**3d**

**5d**

**FIGURA 2**



CONTROL

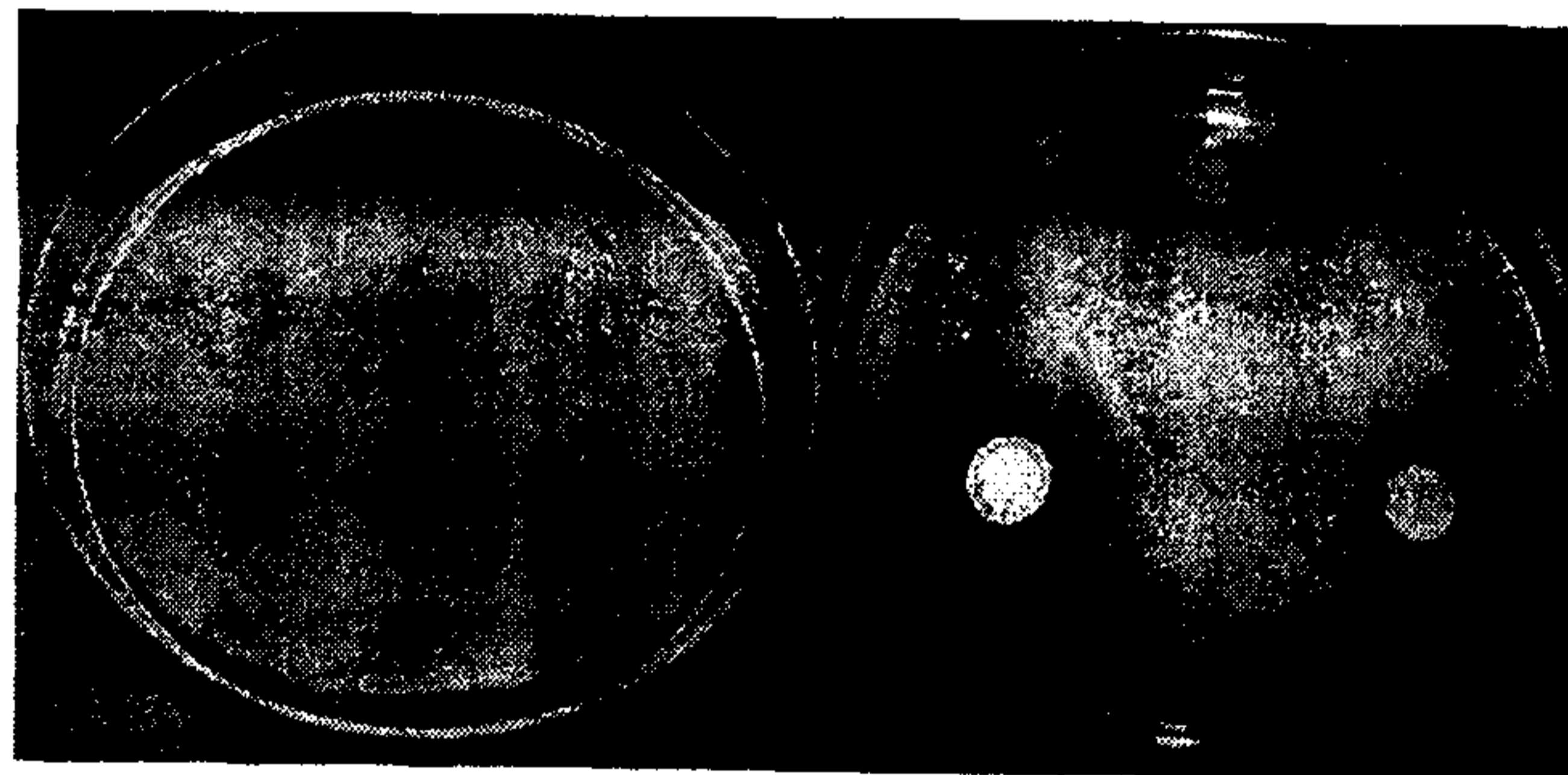
0d



3d

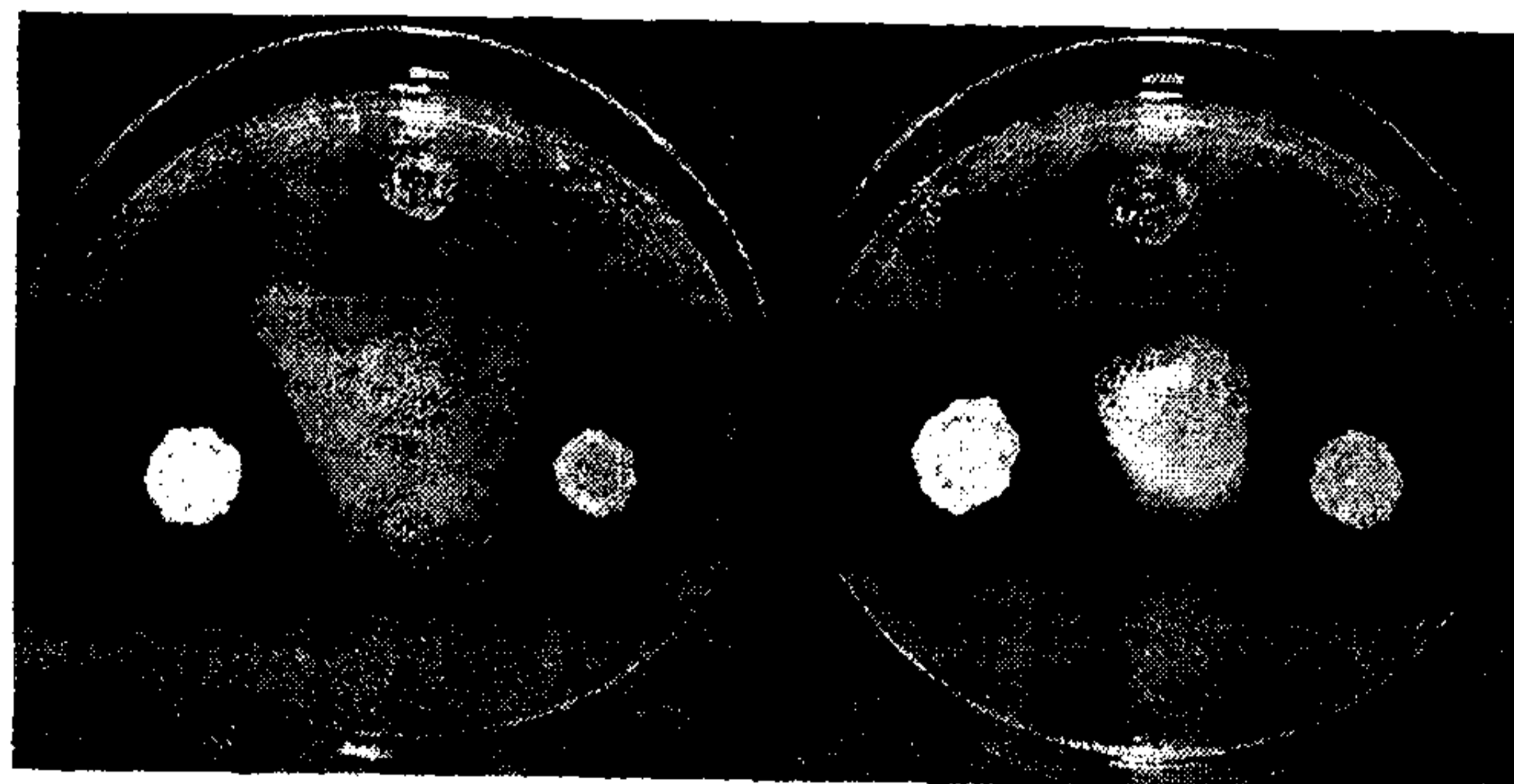
5d

FIGURA 3



CONTROL

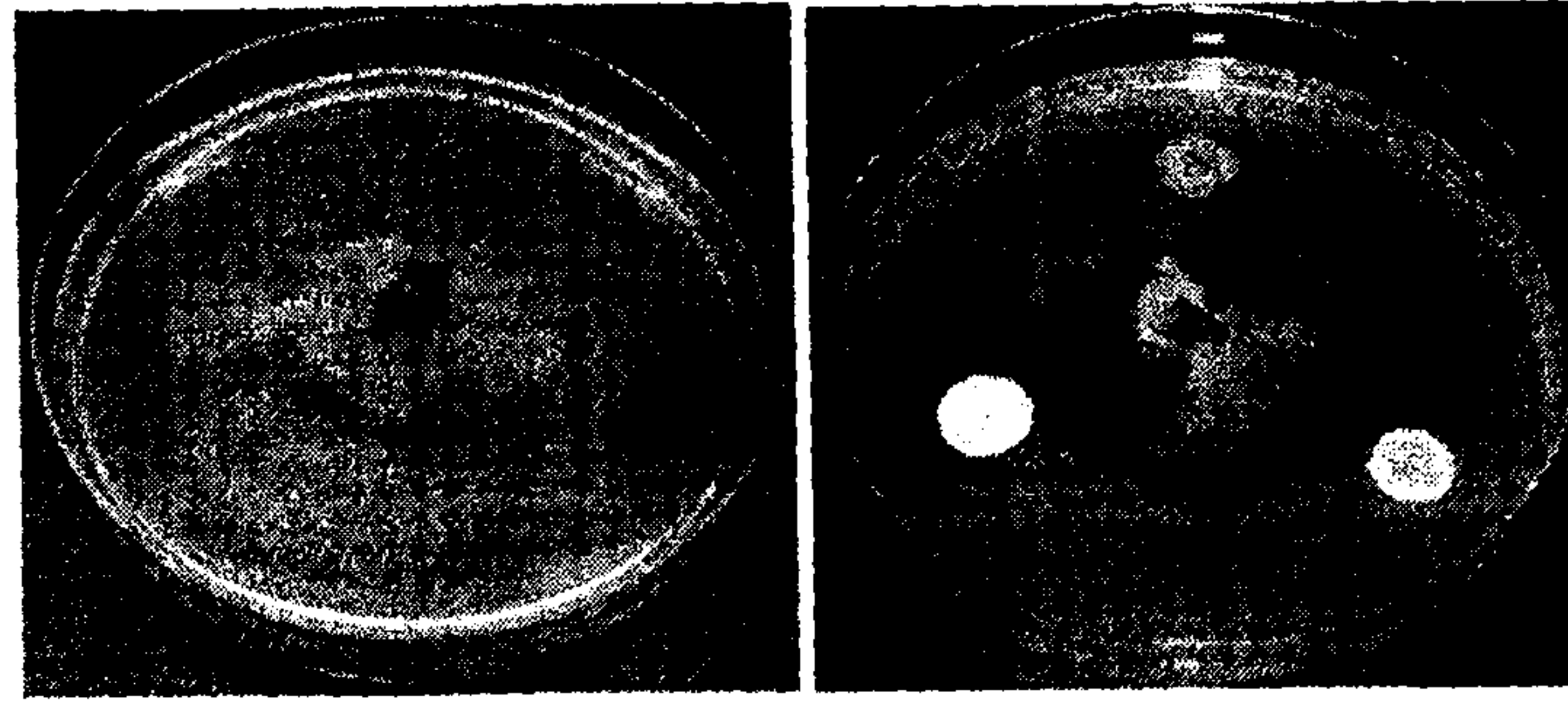
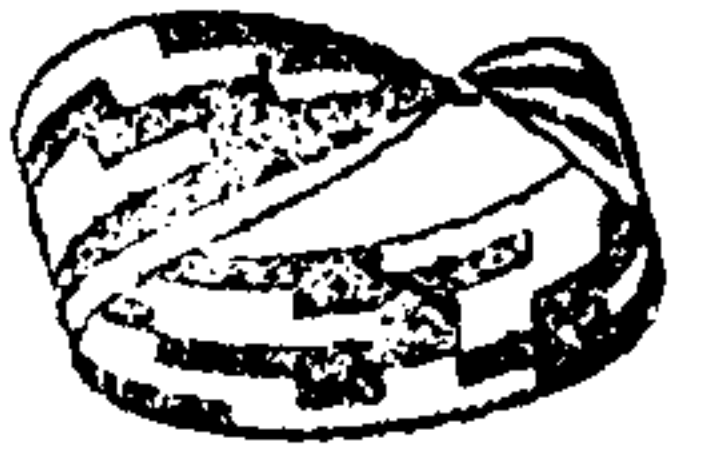
0d



3d

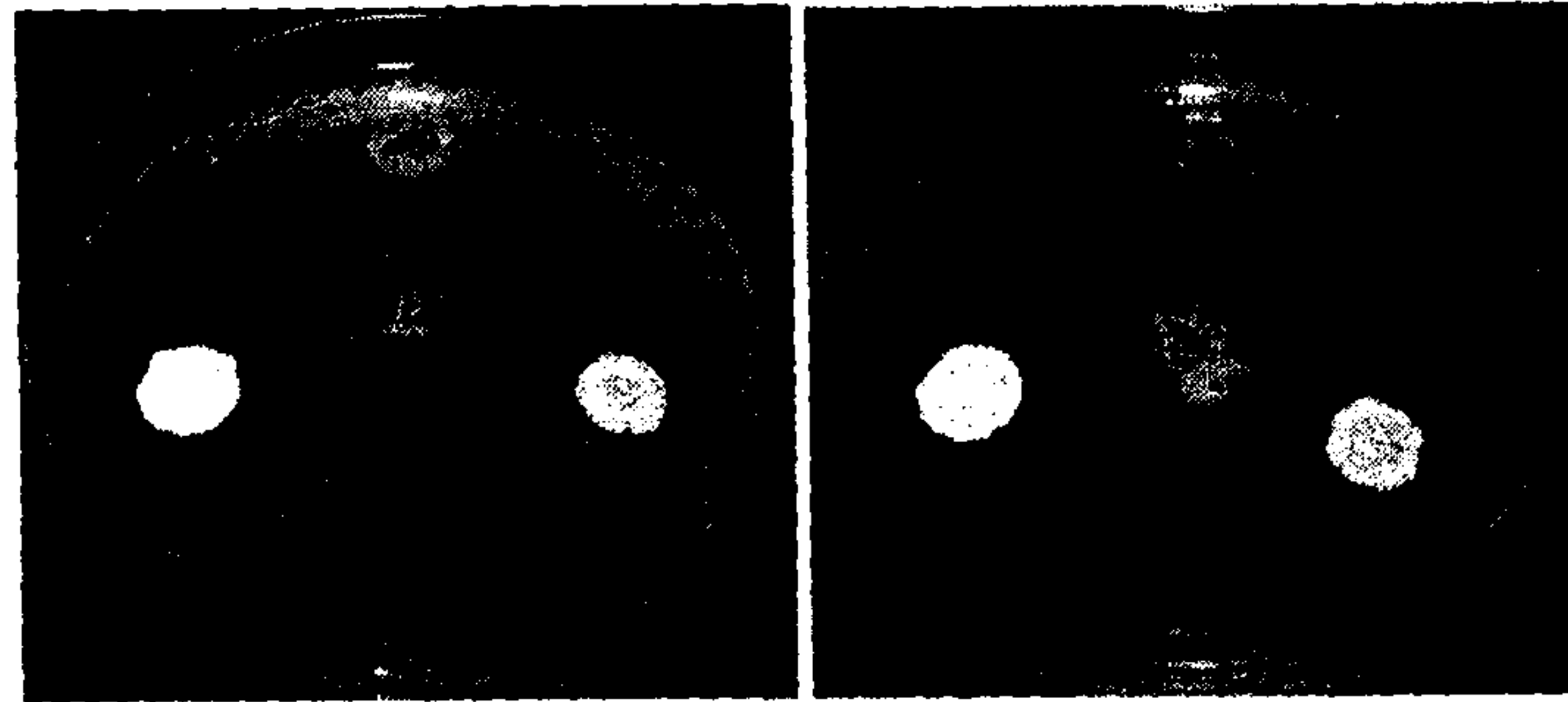
5d

FIGURA 4



Control

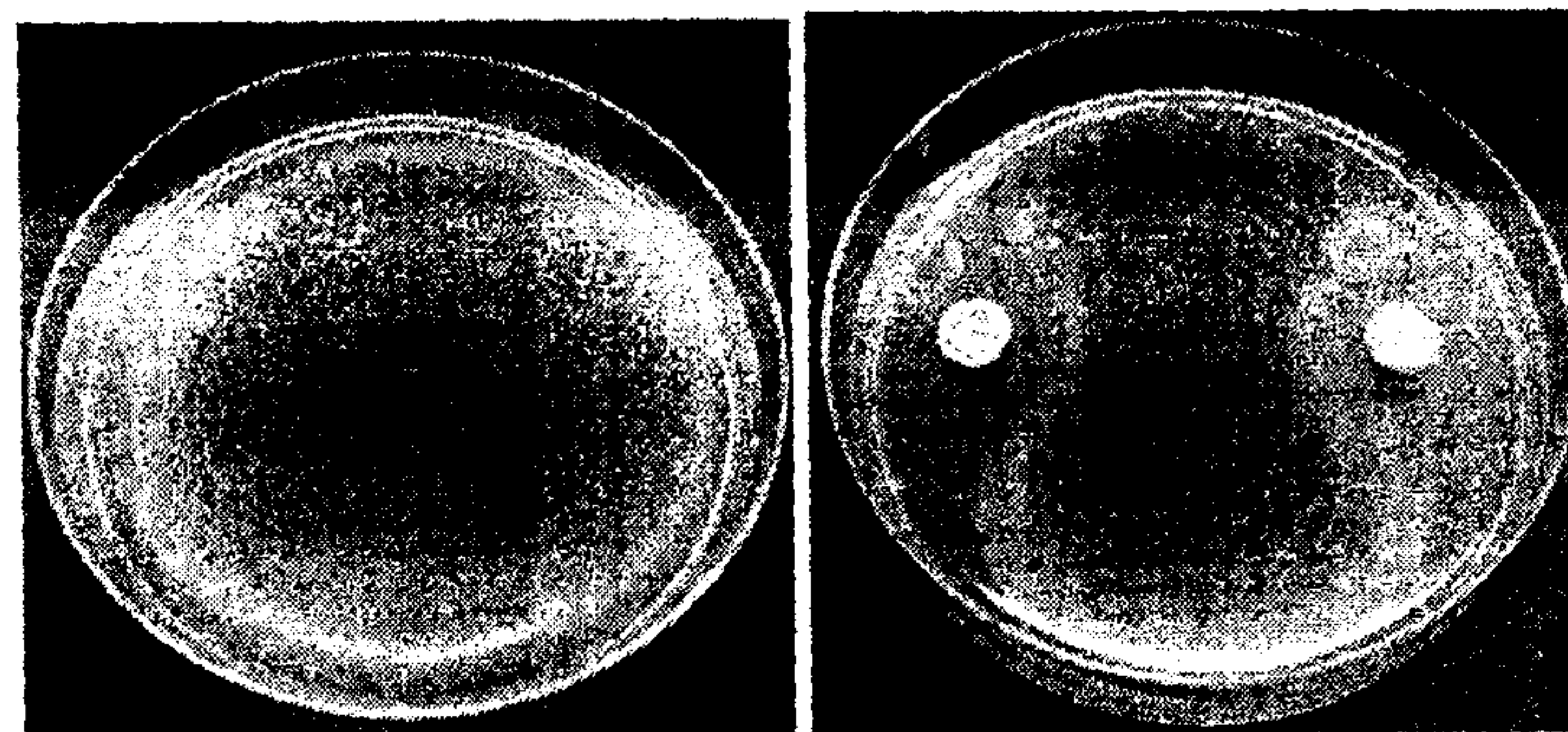
0d



3d

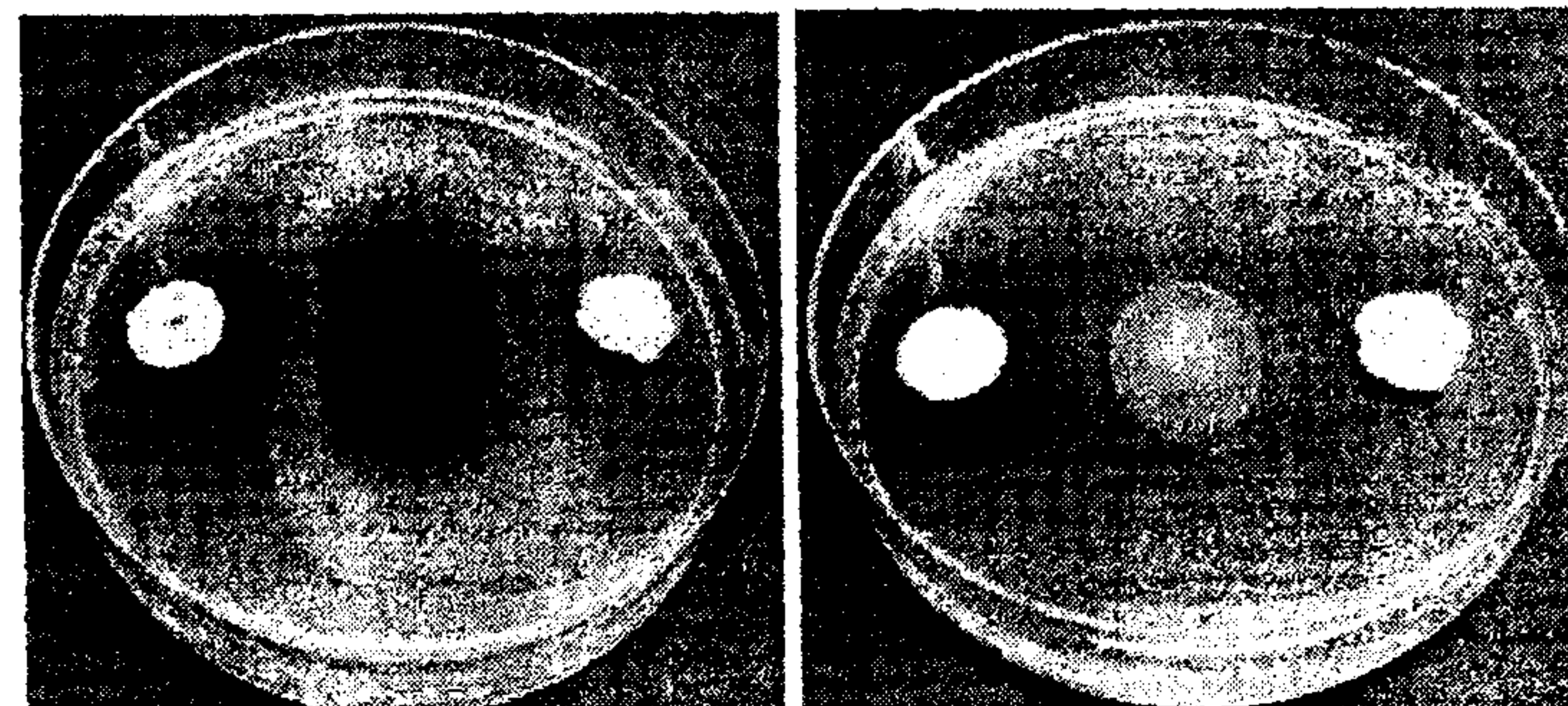
5d

FIGURA 5



CONTROL

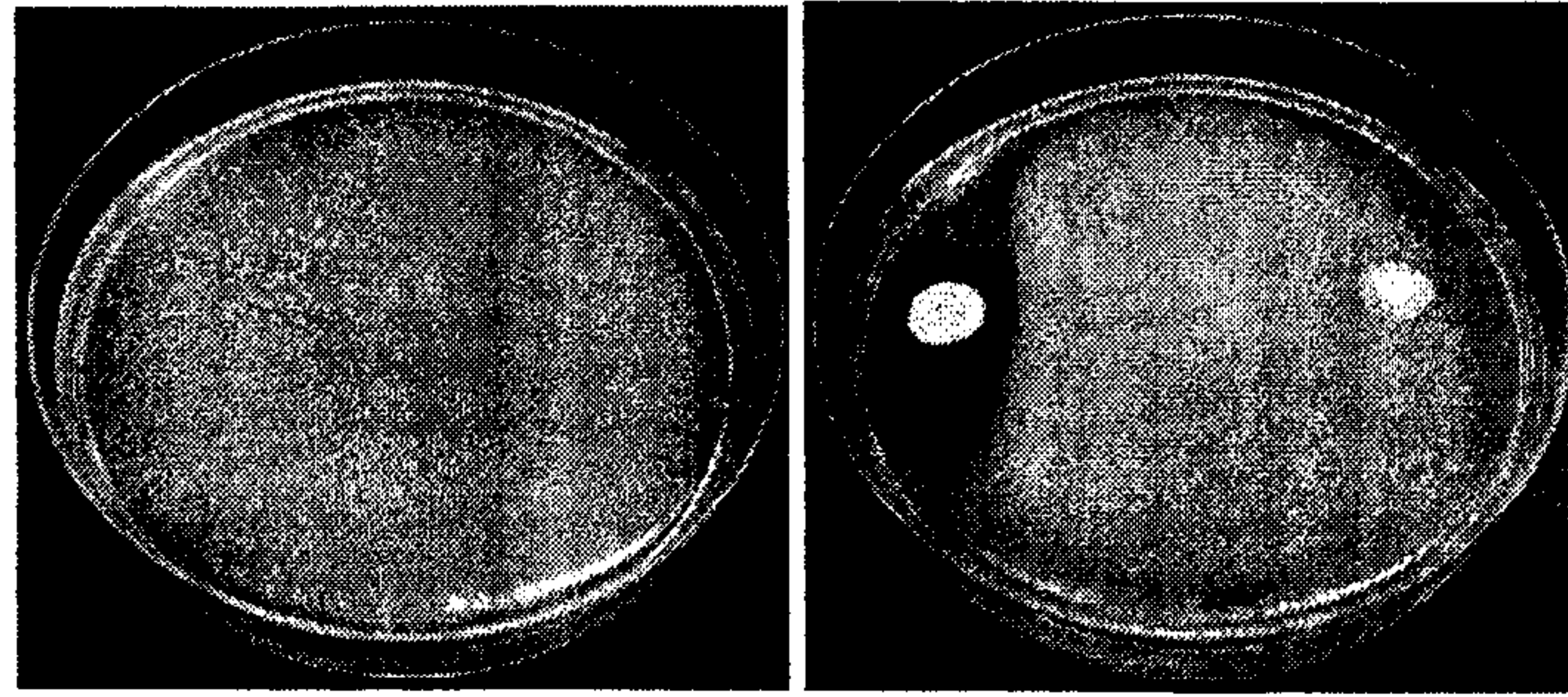
0d



3d

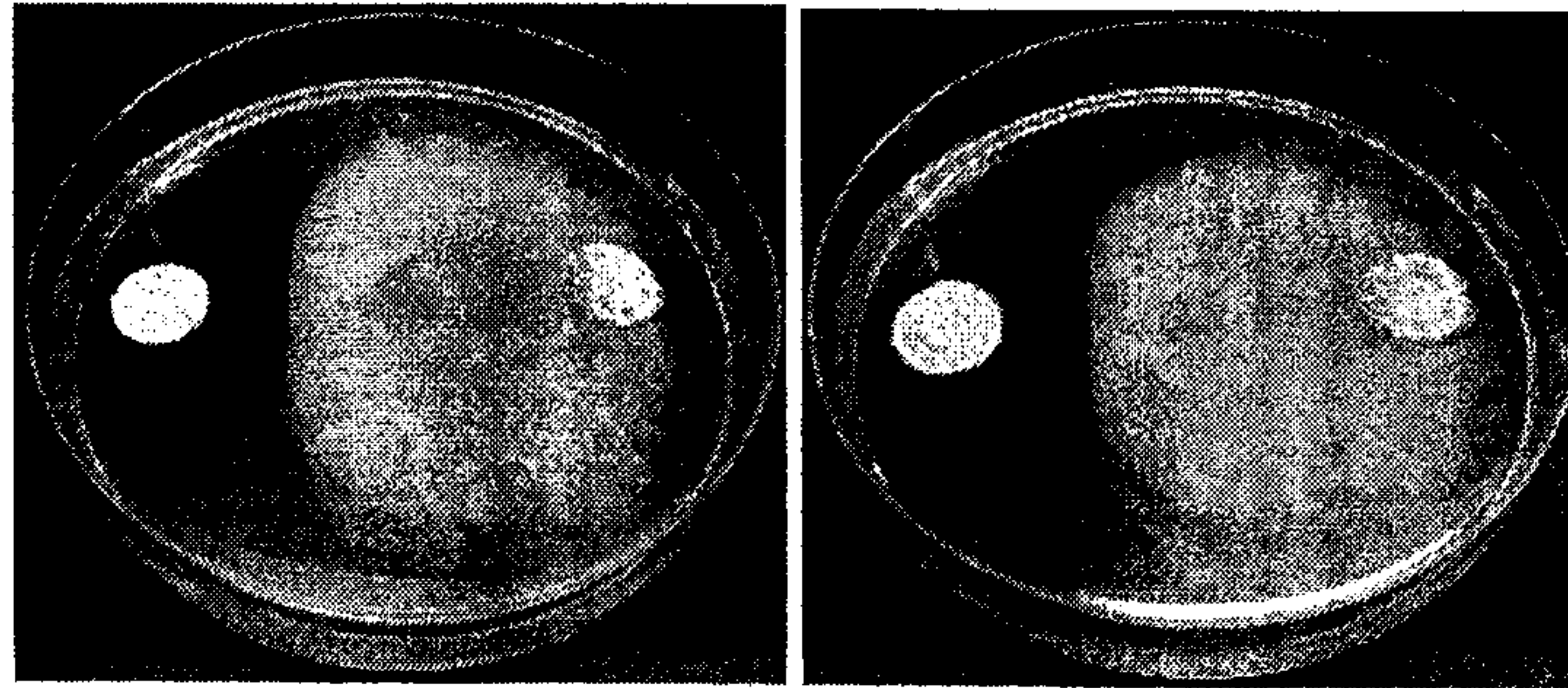
5d

FIGURA 6



Control

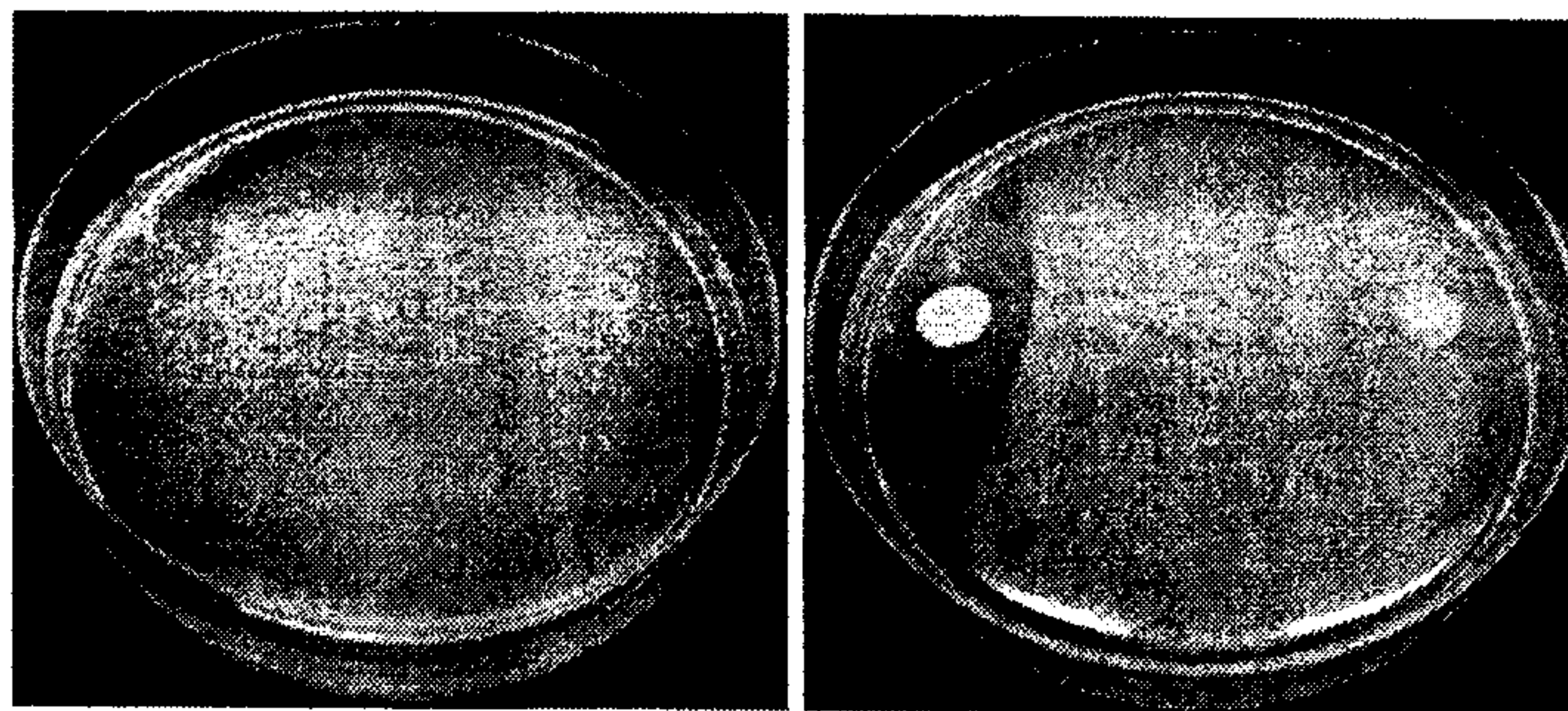
0d



3d

5d

FIGURA 7



Control

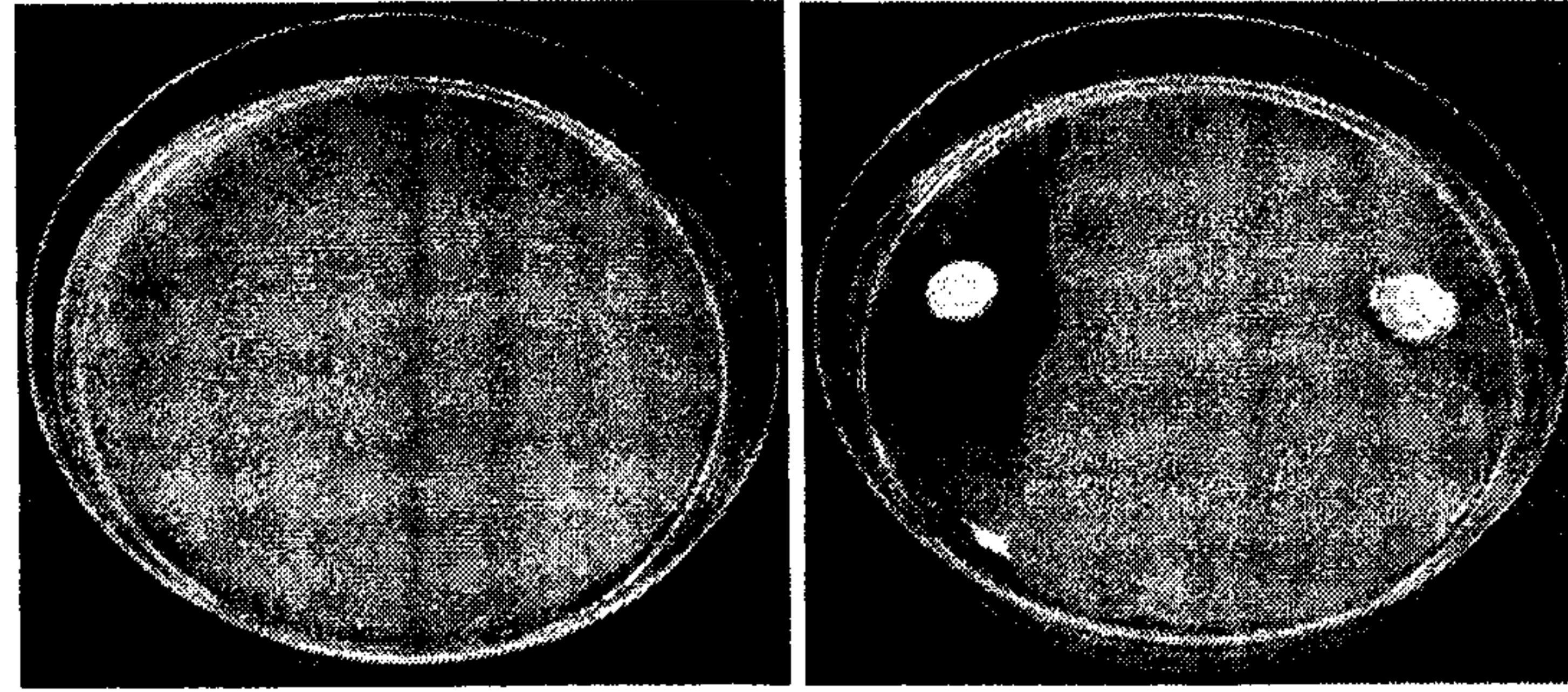
0d



3d

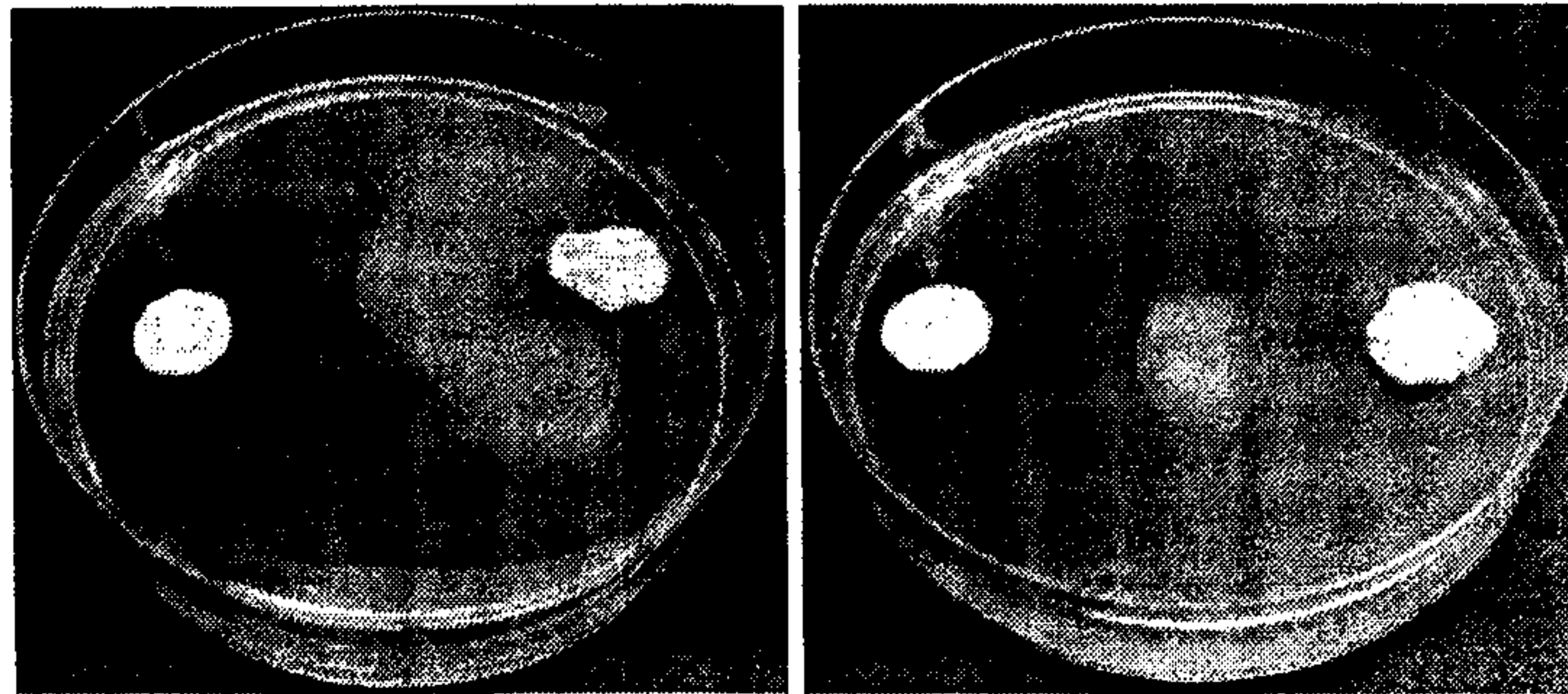
5d

FIGURA 8



CONTROL

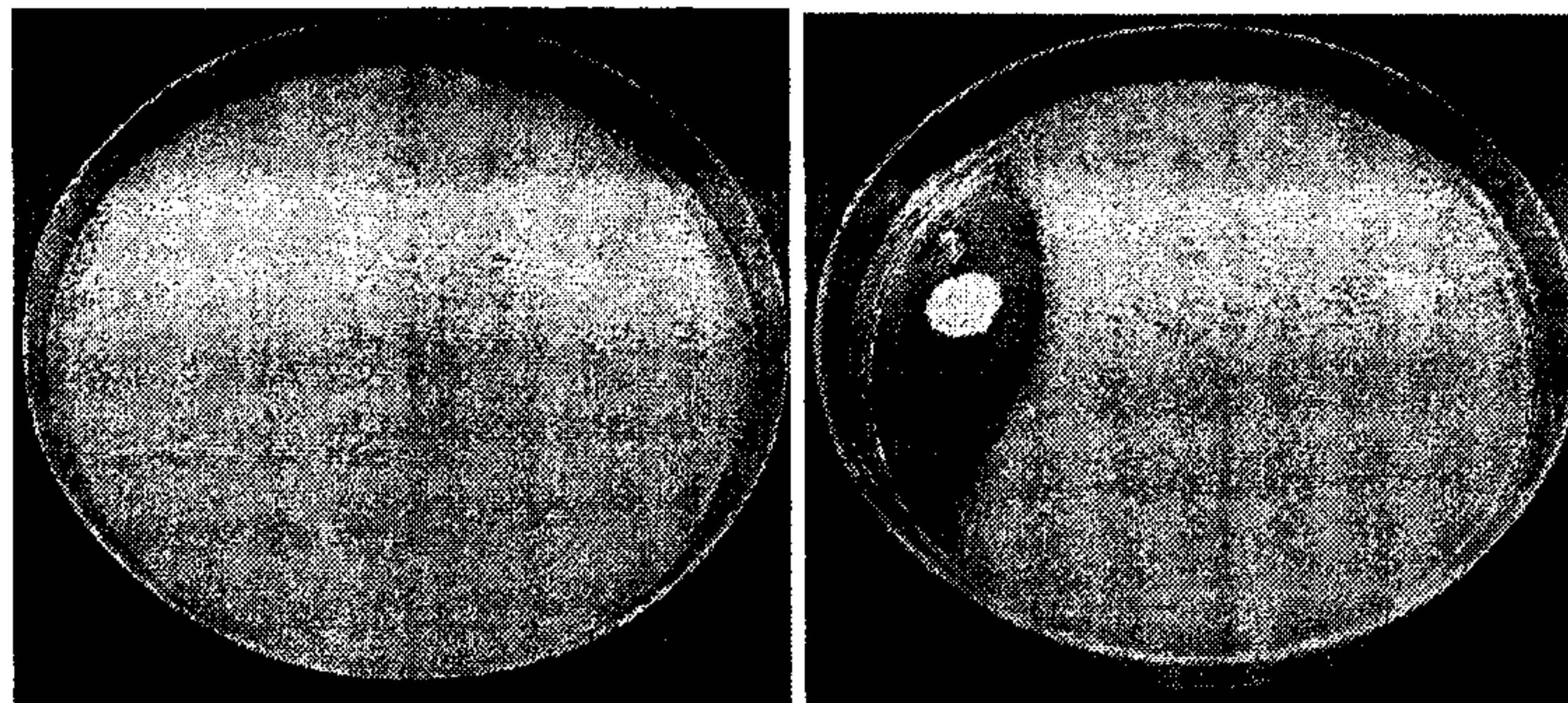
0d



3d

5d

FIGURA 9



CONTROL

0d



3d

5d

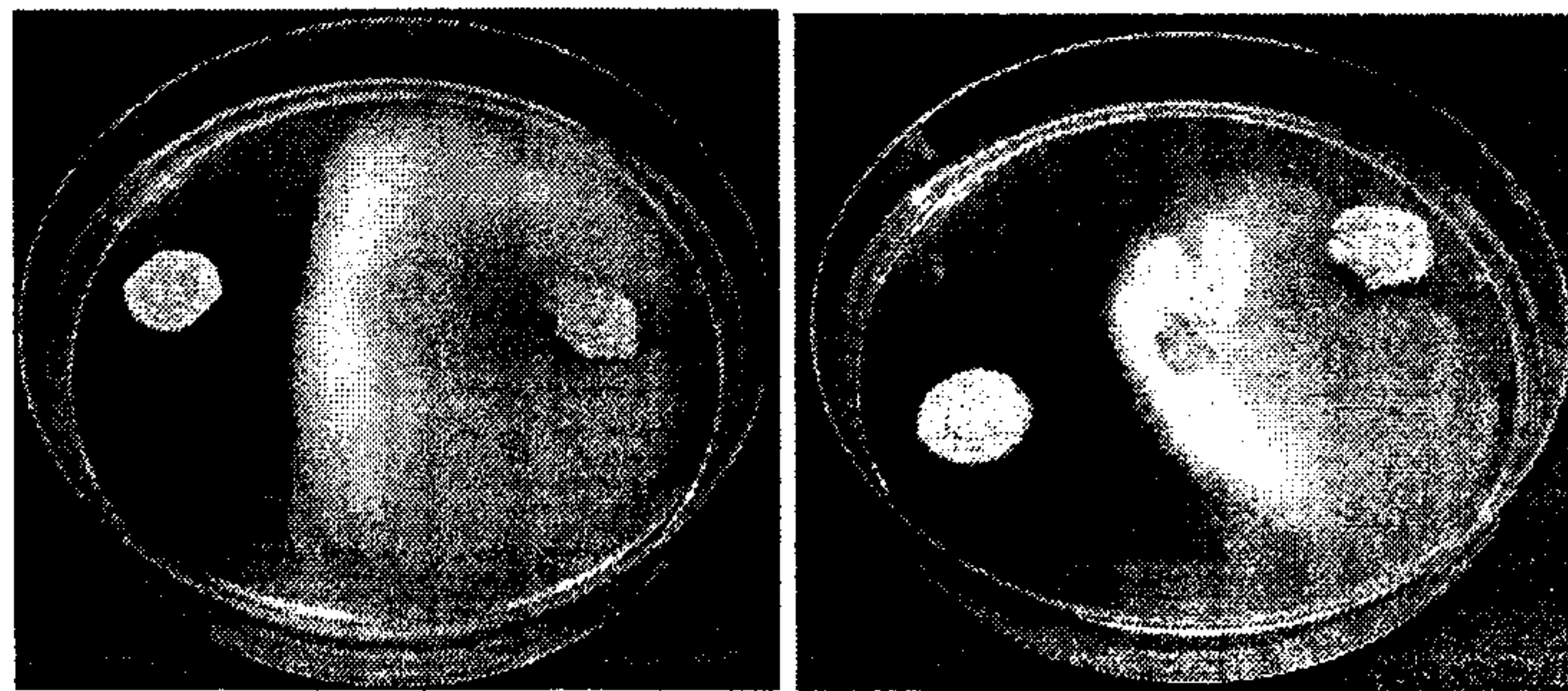
FIGURA 10





CONTROL

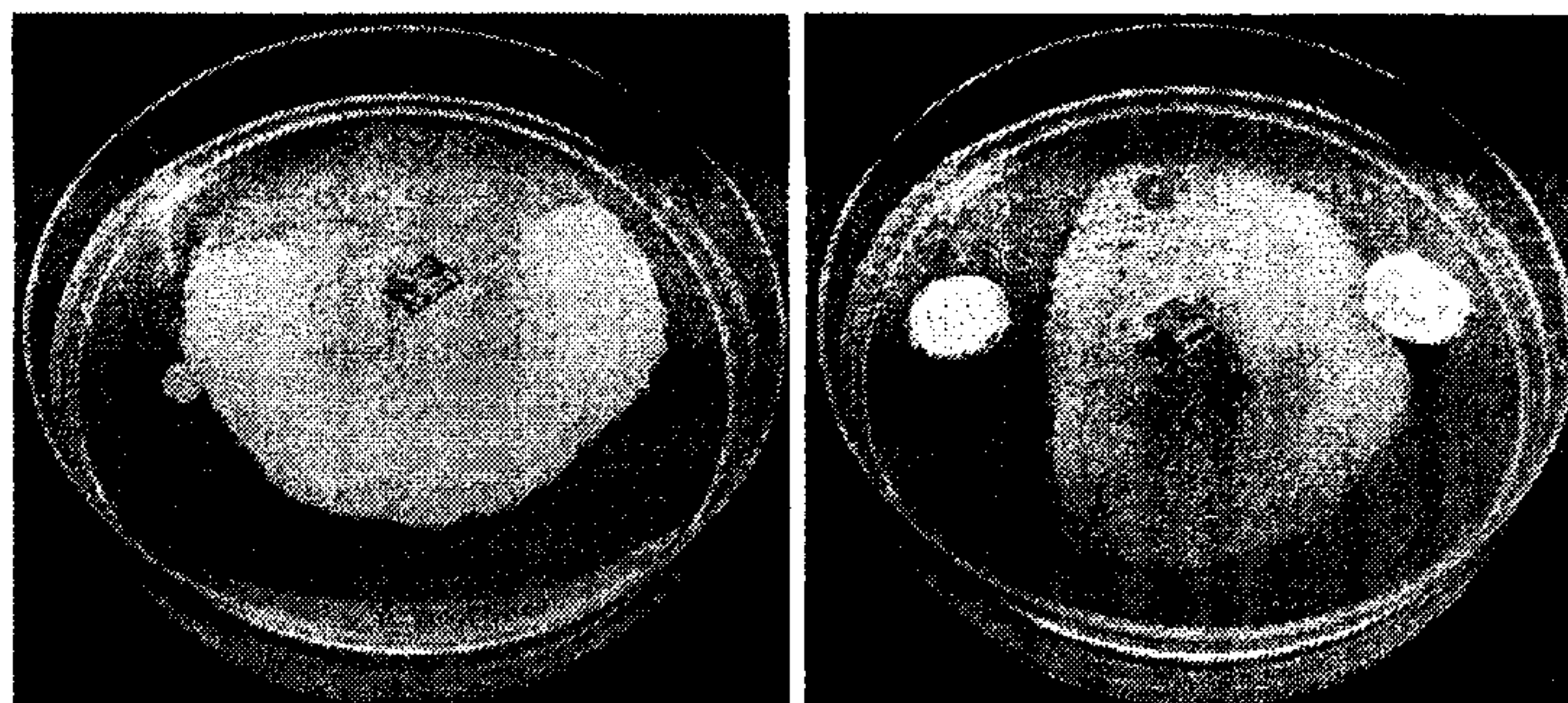
0d



3d

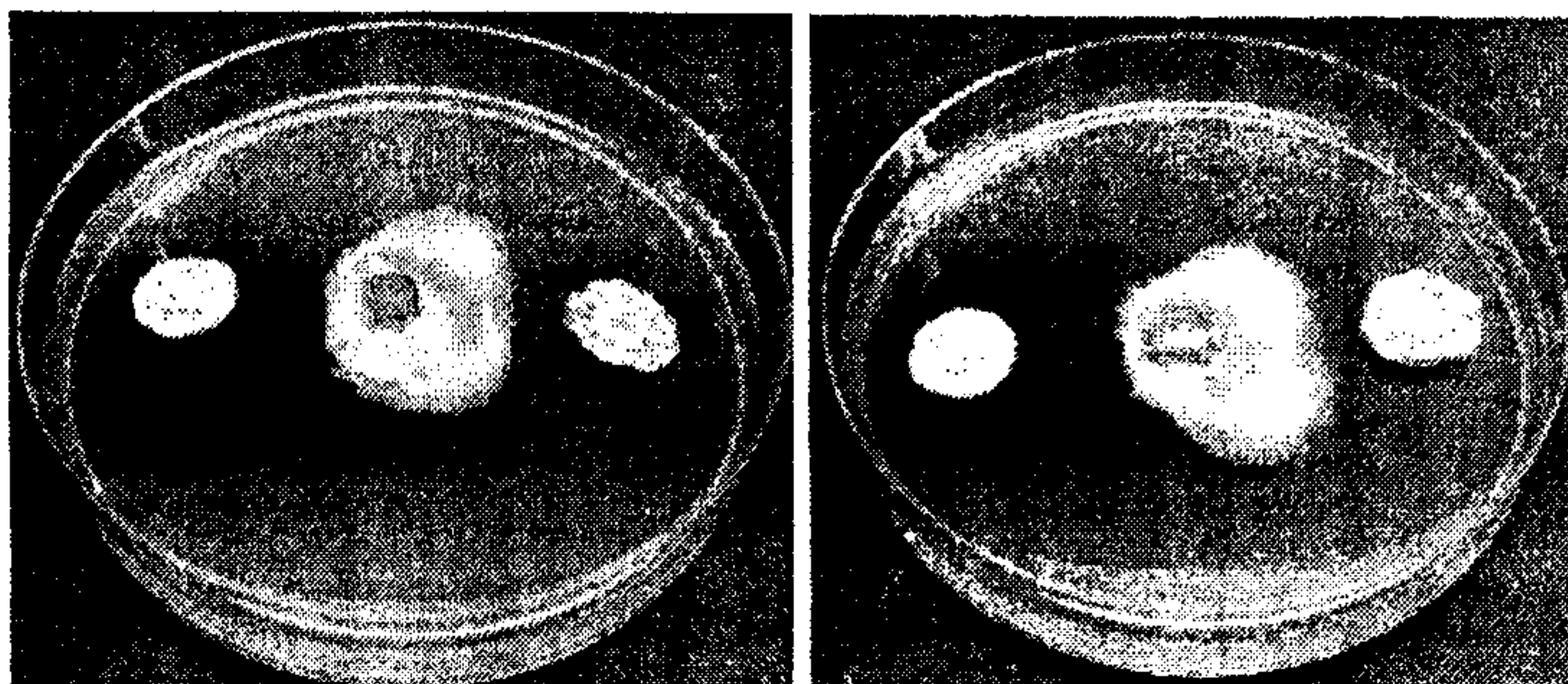
5d

FIGURA 11



CONTROL

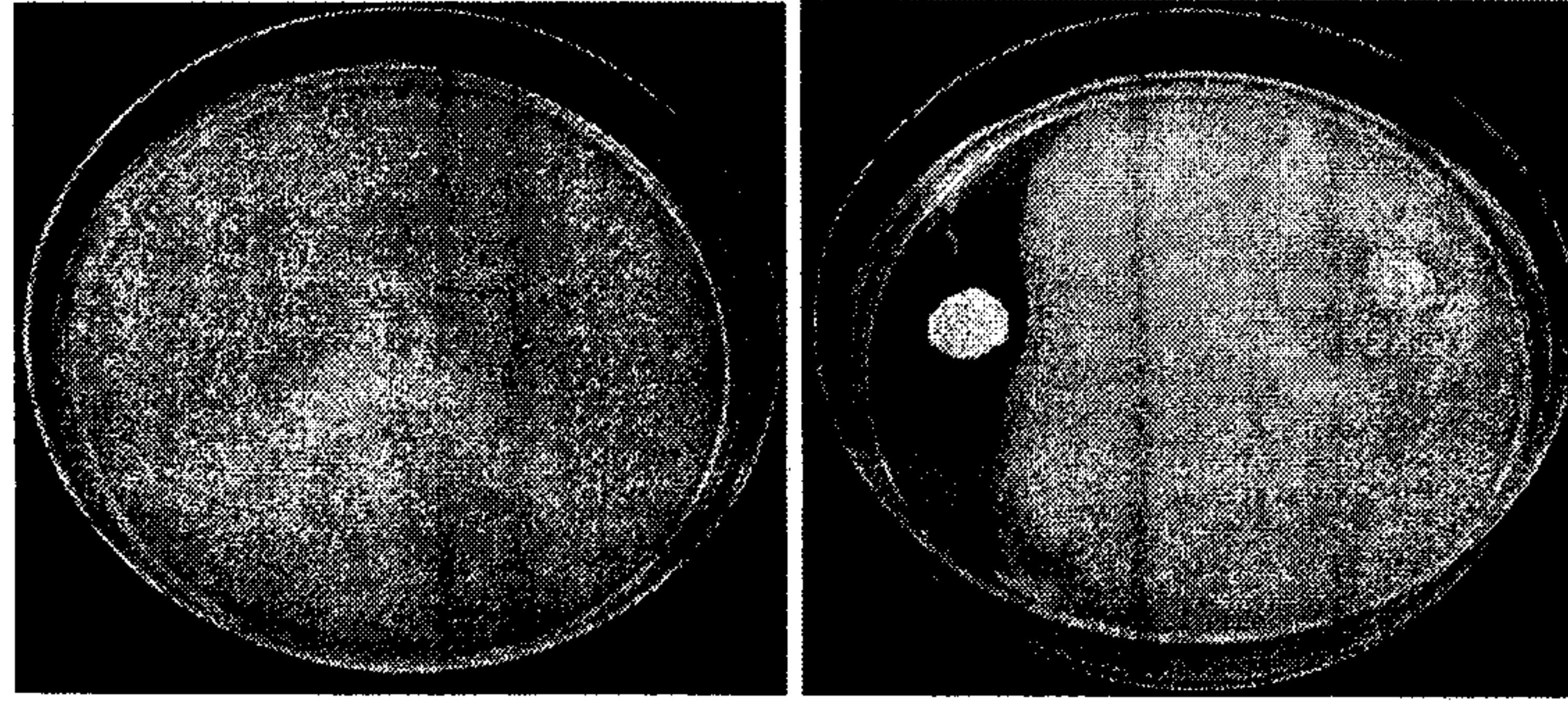
0d



3d

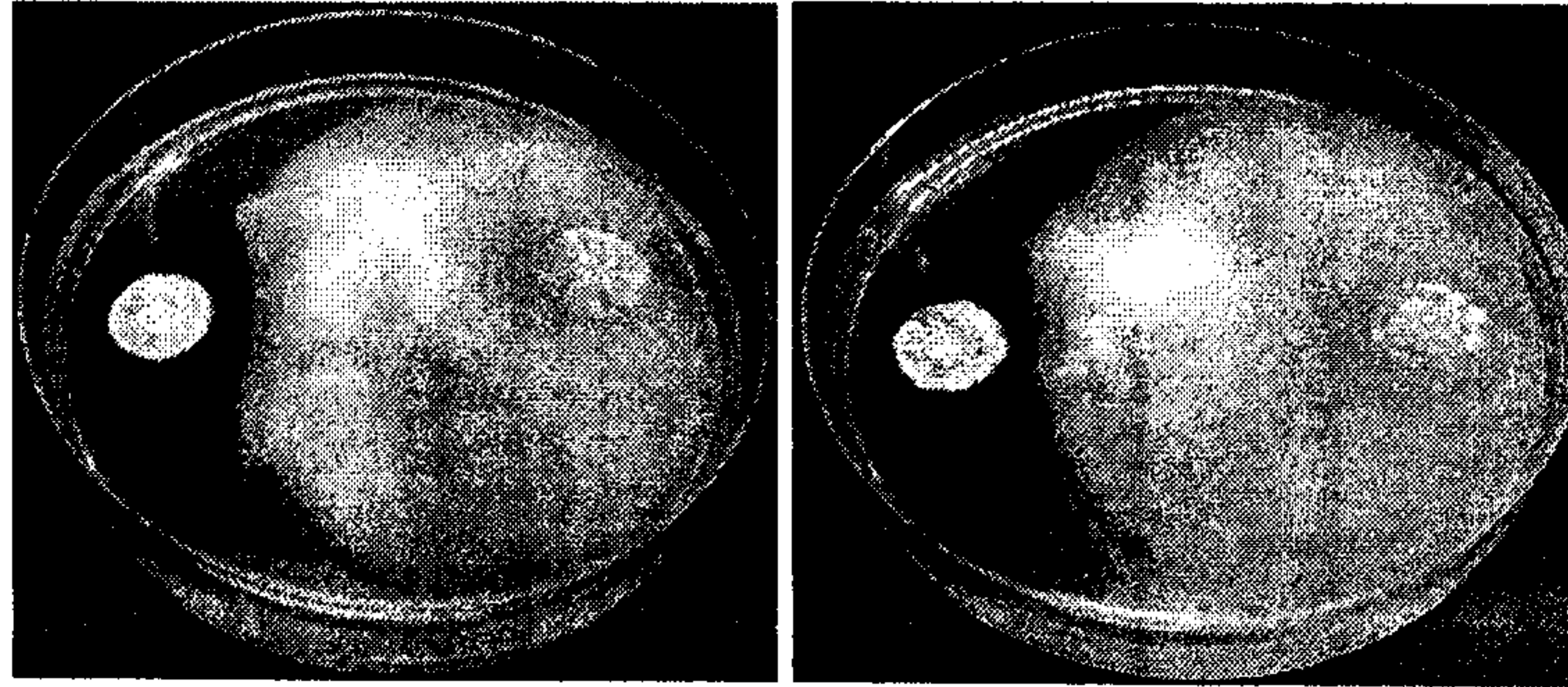
5d

FIGURA 12



CONTROL

0d



3d

5d

FIGURA 13