

# TÍTULO DE PATENTE No. 352683

**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. PARA CONTROL BIOLÓGICO, COMPOSICIÓN QUE LA CONTIENE Y USO DE LA MISMA.

**Clasificación:** CIP: A01N63/02; A01P3/00; C12N1/20; C12R1/465  
CPC: A01N63/02; C12N1/20; C12R1/465

**Inventor(es):** ZAHAEDEVANGELISTA MARTINEZ

**SOLICITUD**

<b>Número:</b>	<b>Fecha de Presentación:</b>	<b>Hora:</b>
MX/a/2012/005836	6 de Diciembre de 2011	10:28

**Divisional de la Patente Número: 361438**

**Vigencia:** Veinte años

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

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

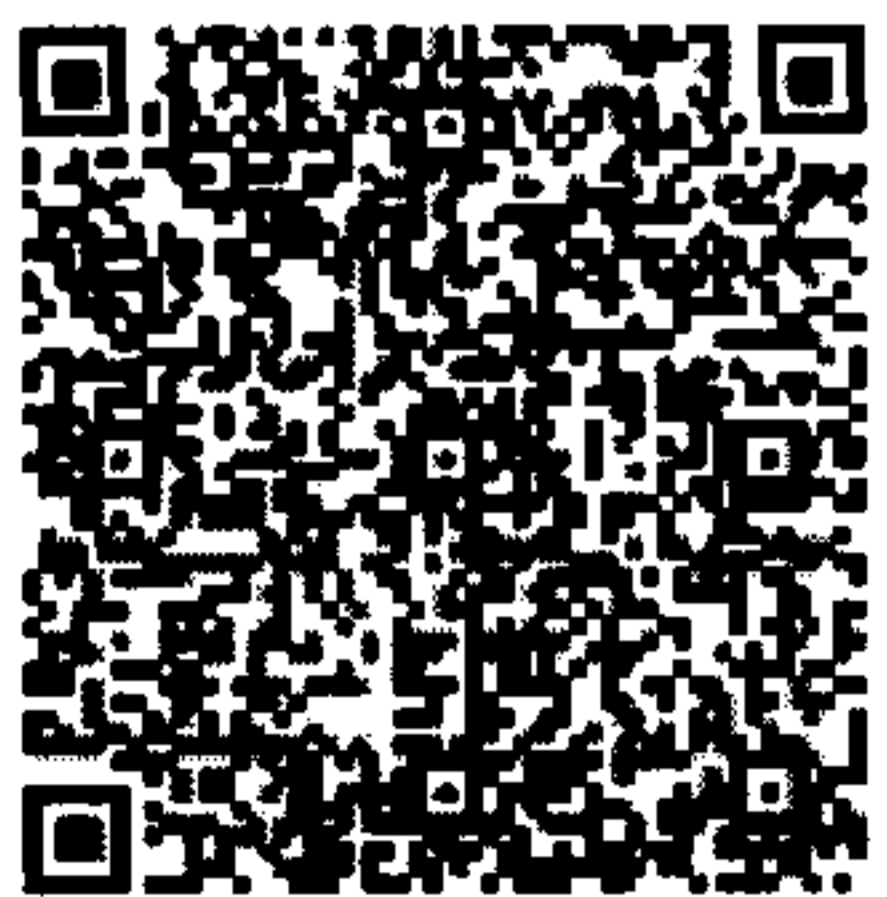
La patente de referencia se otorga con fundamento en los artículos 1º, 2º fracción V, 6º fracción III, y 59 de la Ley de la Propiedad Industrial.

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, 18/06/2010, 28/06/2010, 27/11/2012 y 19/04/2012); artículo 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. 14/12/1991, reformado el 01/07/2002, 15/07/2004, 28/07/2004 y 7/09/2007); artículos 1º, 3º, 4º, 5º fracción V inciso a), 15 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, 24/06/2004 y 13/09/2007); 1º, 3º y 5º incisos 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/2017/99235|MX/a/2012/005836|Título Patente divisional Matriz|1220|RRGO|Pág(s) 1|sq08nK1KwFDuC3pVzOz0Zo2pW4c=

Sello Digital:  
 sRDgIAo6bjKKbeFtD+9N1zAKBSFT70u0NYSeH7Of2PIFQBQ62c4xfhD4u+6sNivmmSkCHriYo/NeddUyviT83FMnic swGnpyKz+aQaOOzDgOU4/+ouGXWmc287DnLo3fTdwFrFnan/05kOXe/Gq0ivLy3kzBqB1SyC0G+qoy40S2315b4NkF umBdF/9HzPehbr7Zj9N8AsDgpqNnr754oiL9stC6v6EFMnGK+MLC+fSdGgPmdVUrXWT3nMVONO9FzkiGbfUvPNGqT sR72y7R6haYmzUjLUROzDA/BsquGClbxzKAiqzhKfN0BP89divv3CzCNI2XwfGVkcu9zeRiQ==



**Cepa de *Streptomyces* sp. para control biológico, composición que la  
contiene y uso de la misma.**

### **CAMPO DE LA INVENCION**

5 La presente invención pertenece al campo de la agrobiotecnología, dado que describe y reclama una cepa nueva de la bacteria *Streptomyces* sp, llamada CACIA-1.46HGO que es capaz de inhibir el crecimiento de hongos fitopatógenos que afectan diversos cultivos hortícolas. Dicha cepa de *Streptomyces* fue aislada del suelo  
10 en el Estado de Hidalgo, México, específicamente en el municipio de Mineral del Monte. La utilización de esta cepa 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 medio ambiente y la salud de los  
15 humanos.

### **ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

Las plagas que afectan a las plantas se encuentran entre los más importantes agentes bióticos que causan pérdidas y daños graves a los productos agrícolas. Las plagas que afectan a los cultivos pueden ser  
20 insectos, nematodos, hongos, bacterias y virus. Por tanto, estas plagas necesitan ser controladas para asegurar la producción de los alimentos que provienen del campo. Históricamente las prácticas de cultivo y



agronómicas han hecho uso frecuentemente de la aplicación de productos químicos para controlar las diversas plagas. Sin embargo, la contaminación ambiental causada por el uso excesivo de los agroquímicos ha generado un cambio de actitud hacia su uso.

5 En la actualidad, existen estrictas regulaciones sobre el uso de productos químicos en el campo, muchos de los cuales han sido retirados del mercado. En consecuencia, se han venido desarrollando diversas alternativas al uso de estos compuestos para el control de las plagas y enfermedades de las plantas (Baker KF. 1987. Annu. Rev. 10 Phytopathol. 25:67-85; Cook RJ. 1993. Annu. Rev. Phytopathol. 31:53-80).

EL Control Biológico de las enfermedades de las plantas ha sido considerado como un método alternativo y viable para el manejo de las enfermedades de las plantas. Se considera que el control biológico es ambientalmente seguro y en muchos casos es la única opción 15 disponible para proteger a las plantas contra los organismos que las atacan.

El control biológico emplea enemigos naturales de plagas y patógenos para erradicar o controlar su población. Esta práctica se lleva a cabo mediante la introducción de especies exóticas, o bien, 20 mediante el uso de especies nativas obtenidas directamente de la región o lugar en el que se presenta la enfermedad de las plantas.

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 por la presencia de agentes de control biológico en el suelo donde se realizan los cultivos, refiriéndose a estos agentes 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.

Los hongos que causan enfermedades en las plantas son consideradas como los agentes microbianos más importantes que causan serias pérdidas económicas anualmente en la agricultura. Enfermedades que se desarrollan sobre la madera, hojas, flores, raíces y frutas han sido controladas usando agentes biológicos (Agrios NA. 1988. Plant Pathology. 3ª. Edición. Academic Press, USA. pp. 220-222).

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 ampliamente distribuidas en ambientes terrestres y acuáticos, son gram positivas, la mayoría presenta crecimiento miceliar filamentososo y son preferentemente aerobias (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). Una característica que se les ha explotado a estas bacterias es la 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). El género *Streptomyces* es quien presenta el mayor número de especies y del cual han sido purificadas las moléculas (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, que pueden ser de los géneros *Colletotrichum* (Ahn *et al.*, 2008. Plant Pathol. J. 24:24-30; Intra *et al.*, 2011. BMC Research Notes. 4:98), *Helminthosporium solani* (Elson, 1997. Plan Dis. 81:647-652); especies de los géneros *Aspergillus*, *Fusarium*, y

*Trichoderma* (Kokare *et al.*, 2004. *Current Science*. 86:593-597);  
*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 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 al.*, 2010. *Afr. J. Microbiol. Res.* 4:2451-2556).

A este respecto, en la presente invención se ha detectado una cepa nativa de *Streptomyces* sp. aislada de suelo, capaz de presentar actividad contra patógenos, principalmente hongos patógenos de plantas. En donde la cepa de *Streptomyces* sp. está adaptada a las condiciones edáficas, climáticas y relación planta-microorganismo necesaria para actuar como antagonista de los hongos que provocan las enfermedades existentes en los cultivos nacionales, principalmente de cultivos locales.

En el estado de la técnica no se encuentran documentos que  
mencionen específicamente a la cepa de *Streptomyces* sp. descrita  
en la presente solicitud, considerando que su desarrollo morfológico y  
bioquímico está diferenciado de las cepas de *Streptomyces*  
5 mencionadas en el estado de la técnica, como se mostrará en las  
figuras y tablas respectivas.

Han sido publicadas diversas patentes y solicitudes de patente  
sobre los usos de cepas de *Streptomyces* con actividad antifúngica  
contra hongos fitopatógenos, pero que no afectan la patentabilidad  
10 de la 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,  
mediante el uso de él sobrenadante de un cultivo líquido de una cepa  
de *Streptomyces*, que ha crecido en un medio de sales minerales  
15 suplementado 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  
20 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  
5 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  
10 brillante. A diferencia de la patente en cuestión, la cepa de  
*Streptomyces* de la presente solicitud, desarrolla micelio vegetativo  
amarillo claro que conforme madura la colonia adquiere una  
coloración café, micelio aéreo blanco, formación de esporas en color  
gris, y secreta un pigmento al medio de color amarillo muy tenue. Estas  
15 características de la cepa, a diferencia de la reclamada en la patente  
Norteamericana, no cambian al emplear un medio de cultivo distinto,  
es decir, las características de la cepa son siempre la de presentar un  
micelio vegetativo amarillo claro que conforme madura la colonia  
adquiere una coloración café, micelio aéreo blanco y formación de  
20 esporas en color gris. Aunado a lo anterior es claro que la morfología  
colonial de la presente invención es diferente respecto a la patente en

comento, caracteres que en el grupo de los estreptomicetos nos indican que son cepas diferentes a nivel genético.

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 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 comentario, la presente invención describe el uso de una cepa de *Streptomyces* que presenta como rasgo importante la de desarrollar micelio aéreo blanco que desarrollan para formar una masa de esporas de color gris, sin llegar a adquirir color negro en el medio de esporulación.

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 gris 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* 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. 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 que de la patente en cuestión, radica en el presente invento está basado en la actividad sobresaliente de una cepa de *Streptomyces* sp. contra hongos fitopatógenos, en donde la cepa de la presente invención presenta claramente características morfológicas diferentes respecto a la cepa de la patente en comento. Asimismo, la cepa de la presente invención, presenta actividades antagonistas contra hongos fitopatógenos de los géneros *Fusarium*, *Helminthosporium*, *Rhizoctonia*, *Aspergillus* y *Curvularia*. 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.

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 en 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 adaptada a las condiciones edáficas, climáticas y relación planta-microorganismo necesaria para actuar como antagonista de los hongos que provocan las enfermedades existentes en los cultivos nacionales, principalmente de cultivos locales. 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 CACIA-1.46HGO. Cultivo puro  
5 crecido en medio ISP2 durante 21 días a una temperatura de 29° C; se  
observan colonias maduras de forma circular y borde redondeado con  
proyecciones filamentosas muy finas, superficie papilada y aspecto  
crateriforme, con desarrollo de micelio vegetativo de color café, del  
cual se desarrolla micelio aéreo blanco, del cual surge la masa de  
10 esporas de color gris.

**Figura 2.** Características morfológicas respecto a la asimilación  
de fuente de carbono de *Streptomyces* sp CACIA-1.46HGO. Placa de  
24 pozos conteniendo 2 ml de medio agar ISP9 suplementado con  
diferentes fuentes de carbono al 1%. De izquierda a derecha y de  
15 arriba hacia abajo se muestran los pozos con las fuentes de carbono:  
Sin fuente de carbono (control), glucosa, sacarosa, fructosa, rhamnosa,  
raffinosa, D-xilosa, L-xilosa, glicerol, mio-inositol, manitol, almidón,  
fructosa, celobiosa y caseína. En cada pozo se inocularon 2 µl de la  
suspensión de esporas y se mantuvieron en incubación por 14 días a  
20 una temperatura de 29° C. Se evaluó el crecimiento y desarrollo de  
micelio, y formación de esporas como procesos morfofisiológicos de la  
cepa en cada una de las condiciones de cultivo. Estas características



de la cepa de la presente invención las diferencia de manera importante de las cepas de las patentes norteamericanas previamente discutidas.

**Figura 3.** Ensayos de confrontación de *Streptomyces* sp. vs *Helminthosporium* sp (He). La cepa de *Streptomyces* sp. cepa CACIA-1.46HGO (S-1.46) 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-1.46 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-1.46 y He se inocularon al mismo tiempo (0 d); en otro experimento S-1.46 se inoculó 3 días (3d) antes inocular al hongo, y finalmente S-1.46 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 *Aspergillus niger* (An). La cepa de *Streptomyces* sp. cepa CACIA-1.46HGO (S-1.46) se confrontó contra el hongo An 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-1.46 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-1.46 y An se inocularon al mismo tiempo (0 d); en otro experimento S-1.46 se inoculó 3 días (3d) antes de inocular al hongo, y finalmente S-1.46 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 *Fusarium* sp CDBB:1172 (Fu). La cepa de *Streptomyces* sp. cepa CACIA-1.46HGO (S-1.46) se confrontó contra el hongo fitopatógeno Fu 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-1.46 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 respecto al tiempo. Inicialmente, S-1.46 y Fu se inocularon al mismo tiempo (0 d); en otro experimento S-1.46 se inoculó 3 días (3d) antes de inocular al hongo, y finalmente S-1.46 se inoculó 5 días (5d) antes de inocular al hongo. C; control de crecimiento del hongo.

**Figura 6.** Ensayos de confrontación de *Streptomyces* sp. vs *Curvularia* sp (Cu). La cepa de *Streptomyces* sp. cepa CACIA-1.46HGO (S-1.46) se confrontó contra el hongo fitopatógeno Cu 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-1.46 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-1.46 se  
inoculó al mismo tiempo que Cu (0 d); en otro experimento S-1.46 se  
5 inoculó 3 días (3d) antes inocular al hongo, y finalmente S-1.46 se  
inoculó 5 días (5d) antes de inocular al hongo. C; control de  
crecimiento del hongo.

**Figura 7.** Ensayos de confrontación de *Streptomyces* sp. vs  
*Rhizoctonia* sp (Rh). La cepa de *Streptomyces* sp. cepa CACIA-  
10 1.46HGO (S-1.46) se confrontó contra el hongo fitopatógeno Rh 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-1.46 se llevó a cabo a diferentes tiempos  
antes de inocular el hongo (0, 3 y 5 días), de manera que se  
15 evidenciará la capacidad de inhibir el crecimiento de Rh respecto al  
tiempo. Se incorporó otra cepa de *Streptomyces* sp. como control de  
la actividad antagonista de S-1.46. En este caso se muestra el efecto  
antagonista de S-1.46 (lado izquierdo de la imagen) al inocularla al  
mismo tiempo que Rh (0 d).

20 **Figura 8.** Actividad inhibitoria del crecimiento de hongos  
fitopatógenos por *Streptomyces* sp. CACIA-1.46CA (S-1.46) respecto a  
otros estreptomicetos, mediante ensayos de confrontación *In vitro*. La

cepa S-1.46 se confrontó contra *Fusarium* sp CDBB:1172 en cultivos  
duales mantenidos en crecimiento por 7 días a 29° C en medio AN. Se  
incorporó en el ensayo tres cepas de estreptomicetos aisladas del  
mismo sitio de muestreo para comparar la ventaja de S-1.46 como  
5 cepa antagonista. Todas las cepas se inocularon al mismo tiempo,  
incluyendo al hongo.

**Figura 9.** Actividad antifúngica de sustancias difusibles  
producidas por *Streptomyces* sp. CACIA-1.46HGO. Inicialmente se  
inoculan 3 µl de la suspensión de esporas en el centro de una placa  
10 Petri con medio agar ISP2 y se incuban por 15 días a 29° C. Enseguida,  
cerca del borde de la colonia (0.3 cm de distancia) se toman con un  
sacabocado discos de agar de 0.8 cm de diámetro, los cuales se  
colocan al centro de una placa Petri con medio PDA y al mismo  
tiempo se colocan dos bloques de agar de 0.4 X 0.4 cm con el micelio  
15 de *Phytophthora capsici* (Pc) en la orilla de la placa y se mantienen  
por 7 días a 29° C. La placa control solo contiene los dos bloques de  
agar de Pc ( foto del lado izquierdo).

**Figura 10.** Actividad antifúngica de sustancias difusibles  
producidas por *Streptomyces* sp. CACIA-1.46HGO. Inicialmente se  
20 inoculan 3 µl de la suspensión de esporas en el centro de una placa  
Petri con medio agar ISP2 y se incuban por 15 días a 29° C. Enseguida,  
cerca del borde de la colonia (0.3 cm de distancia) se toman con un



sacabocado discos de agar de 0.8 cm de diámetro, los cuales se colocan al centro de una placa Petri con medio PDA y al mismo tiempo se colocan dos bloques de agar de 0.4 X 0.4 cm con el micelio de *Curvularia sp* (Cu) en la orilla de la placa y se mantienen por 7 días a 29° C. La placa control (foto del lado izquierdo) solo contiene los dos bloques de agar de Pc.

### **BREVE DESCRIPCION DE LA INVENCION**

La presente invención se refiere a una cepa de *Streptomyces sp.*, con número de acceso NRRL B-50596, capaz de antagonizar con hongos fitopatógenos de plantas que afectan cultivos hortícolas.

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 el crecimiento y la resistencia a 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.

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, describir y reclamar una formulación agronómica, que comprende una  
5 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 hongos fitopatógenos en plantas, en donde dicha formulación está en forma de polvo, suspensión líquida o gránulos.

## 10 **DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN**

### **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  
15 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  
20 incrementar la población de los actinomicetos que forman esporas. Diez gramos del suelo tratado se disolvió en 100 ml de agua destilada y de esta mezcla se prepararon diluciones seriales mismas que se

inoculan en medios de cultivo empleados en el aislamiento de los  
estreptomicetos mediante procedimientos microbiológicos  
convencionales. Adicionalmente, el procedimiento de aislamiento  
consiste en la adición de ácido nalidíxico a una concentración de 12.5  
5  $\mu\text{g/ml}$  y ciclohexamida a 50  $\mu\text{g/ml}$  en el medio de aislamiento,  
pudiendo emplearse el medio ISP2. 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  
10 inoculación de las cepas aisladas en cajas Petri con medio ISP2 por tres  
a cuatro semanas 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  
15 grupo de bacterias (Shirling y Gottlieb, 1966. Int. J. Syst. Bacteriol. 16:313-  
340).

#### **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  
20 procedimiento descrito por Shirling y Gottlieb (1966). La cepa de  
*Streptomyces* sp CACIA-1.46HGO inicialmente produce colonias de  
forma circular con borde redondeado que conforme maduran



sobresalen proyecciones filamentosas muy finas, superficie papilada y aspecto crateriforme, con desarrollo de micelio vegetativo de color café, que al madurar desarrolla micelio aéreo blanco del cual surge la masa de esporas de color gris.

- 5 Diversas características fisiológicas y bioquímicas se determinaron para la cepa de la presente invención, mismas que se presentan en la Tabla 1 y Figura 2.

Tabla 1

Características de <i>Streptomyces</i> sp. cepa CACIA-1.46CA					
Prueba			Fuente <sup>C</sup>	C	E
Tinción Gram	+		Ninguna	+/-	-
Hidrolisis de almidón	+		D-glucosa	+	+
Hidrolisis de caseína	+		Sacarosa	+/-	-
Producción de melanina	-		L-xilosa	-	-
<b>Características del cultivo en ISP2<sup>A</sup></b>			D-xilosa	+	-
Micelio vegetativo (reverso)	Marrón-Café		Maltosa	+	-
Micelio aéreo	Blanco		caseína	+	+
Masa de esporas	Gris oscuro		almidón	+	+
Pigmentos difusibles al medio	Amarillo claro		D-raffinosa	+	+/-
<b>Producción de enzimas extracelulares<sup>B</sup></b>			D-cellobiosa	+	+

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).

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.

10 \*\* 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.

- 5 El medio de cultivo agar ISP2 (International Streptomyces Project media 2): 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; se preparó de acuerdo a Shirling y Gottlieb (1966).

El agar nutritivo (AN) consistió de 5 gr/l de peptona de gelatina, 3  
10 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.

15 **Hongos fitopatógenos.**

Los hongos patógenos empleados son *Aspergillus niger* NRRL-3 y *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  
20 Cristobal Alejo del laboratorio de Fitopatología del Instituto Tecnológico de Conkal, Yucatán, Mexico. La cepa de *Rhizoctonia* sp fue proporcionada por el Dr. Alberto Uc Vázquez del Centro de



Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco

AC Unidad Sureste. Esta cepa fue aislada de plantas enfermas de cultivos de *Jatropha curcas*.

#### **Obtención del inóculo.**

5 El micelio de *Streptomyces* sp. CACIA-1.46HGO se obtiene a partir 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

10 el micelio se concentra para tener una suspensión de cerca de  $1 \times 10^8$  ufc/ml, el 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 CACIA-1.46HGO en medio sólido, que puede ser ISP2,

15 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

20 preparó una suspensión de esporas a  $1 \times 10^8$  de ufc/ml, la cual es usada para 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. CACIA-1.46HGO 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 (106  $\mu\text{m}$ ) y realizando agitaciones con vortex tres veces en periodos de 1 minuto en cada uno. El PCR para amplificar el fragmento se realizó en un volume final de 50  $\mu\text{l}$  que contiene 1X del buffer de reacción,  $\text{MgCl}_2$  a 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. J. Bacteriol. 173:697-703) 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 la cepa:

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

La cepa de *Streptomyces* sp 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 CACIA-1.46HGO	21 de noviembre de 2011	NRRL B-50596

**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-50596, 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-50596, 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-50596 de la presente invención puede ser formulada o mezclada para preparar gránulos, 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-50596 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-50596 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-50596 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-50596, 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-50596 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 promoción de crecimiento y resistencia a fitopatógenos**

La cepa de *Streptomyces* sp. NRRL B-50596 de la presente invención, es óptima para utilizarse tanto sola, como en combinación con vehículos agronómicamente aceptables, para preparar formulaciones para promover el crecimiento y 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 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**

### **Ejemplo 1**

#### **Caracterización morfológica y molecular de *Streptomyces* sp. cepa CACIA-1.46HGO.**

10 La cepa de *Streptomyces* sp. CACIA-1.46HGO aislada del suelo se caracterizó de acuerdo a los procedimientos establecidos por Shirling y Gottlieb (1966). La figura 1 muestra colonias maduras de la cepa creciendo en el medio ISP2 y mantenidas a 29° C por 21 días. Se observan colonias maduras de forma circular y borde redondeado con  
15 proyecciones filamentosas muy finas, superficie papilada y aspecto crateriforme, con desarrollo de micelio vegetativo de color café, que al madurar desarrolla micelio aéreo blanco del cual surge la masa de esporas de color gris. Asimismo, la tabla 1 y figura 2 se presentan los resultados obtenidos en las diferentes pruebas que se llevaron a cabo  
20 para evaluar sobre las características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas de la cepa aislada. 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 721 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 y Figura 1 anteriormente presentadas, se resumen las características esenciales de la cepa en comento.

### **Ejemplo 2**

#### **10        Ensayo de antagonismo de la cepa de *Streptomyces* sp. NRRL B-50596 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. *Phytophthora capsici*, *Curvularia* sp. y *Helminthosporium* sp. estas dos últimas fueron aisladas de plantas ornamentales, específicamente plantas de crisantemo (*Dendranthema grandiflora*), y *Rhizoctonia* sp de plantas enfermas de cultivos de *Jatropha curcas*.

20        Este ensayo probando diversas cepas de *Streptomyces* aisladas del suelo se realizó con la finalidad de seleccionar la cepa con mejores características de actividad antagonista. En las Figuras 3 a 6 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-50596 y otros estreptomicetos aislados fueron confrontados contra los fitopatógenos

5 *Helminthosporium* sp. (He, Fig. 3), *Aspergillus niger* NRRL-3 (An, Fig. 4), *Fusarium* sp. CDBB:1172 (Fu-CDBB, Fig. 5), *Curvularia* sp. (Cu, Fig. 6) y *Rhizoctonia* sp (Rh, Fig. 7) en cultivos duales que fueron mantenidos en crecimiento, después de que ambos microorganismos estaban inoculados, por 7 días a 29° C en medio AN para determinar su

10 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  $1 \times 10^8$  esporas/ml cerca del borde de la placa y se incubaron por 0, 3 y 5 días antes de inocular al hongo

15 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 en crecimiento del hongo. Al tiempo cero ambos microorganismos se inocularon de manera simultánea. En todos los casos, después de inocular al hongo las placas Petri fueron incubadas

20 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-50596 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. CACIA-1.46HGO de la presente. Con estos datos, la cepa de la presente invención supera a las otras cepas de estreptomicetos probadas, considerando los aspectos de porcentaje de antagonismo, características de la cepa y los aspectos relacionados a la facilidad y versatilidad con la que la cepa es

manejada, crecida y preservada, por lo que la cepa de *Streptomyces* sp. CACIA-1.46HGO supera ampliamente a otras cepas de estreptomicetos.

Tabla 2.

<b>ACTIVIDAD ANTAGONISTA DE <i>Streptomyces</i> sp CACIA-1.46HGO</b>			
<b>Porcentaje de inhibición (+/- D.E)*</b>			
<b>Patógeno</b>	<b>0 DIAS</b>	<b>3 DIAS</b>	<b>5 DIAS</b>
<i>Curvularia</i> sp.	46.3 (2.5)	58.1 (2.9)	69.8 (3.1)
<i>Helminthosporium</i> sp.	37.1 (6.4)	54.7 (3.8)	67.1 (1.6)
<i>A. niger</i>	36.7 (7.7)	50.9 (9.8)	81.5 (7.2)
<i>Fusarium</i> sp.	37 (1.7)	42.6 (0.7)	57.3 (4.5)
<i>Rhizoctonia</i> sp.	36.1 (4.5)	43 (1.2)	56.8 (4.9)

5 \* Cada ensayo consistió de tres replicas.

Un ensayo que muestra la ventaja de *Streptomyces* sp. cepa CACIA-1.46HGO sobre otros estreptomicetos para antagonizar el desarrollo de los hongos patógenos de plantas, es el que se muestra en la Figura 8 en la que se observa la actividad antagonista de la cepa de la presente invención contra el hongo *Fusarium* sp CDBB:1172; se observa claramente que S-1.46 forma una línea de inhibición contra *Fusarium* que las tres cepas de estreptomicetos no forman, por lo cual

10



se ven invadidos por el crecimiento de *Fusarium*. Este resultado muestra claramente la ventaja competitiva de *Streptomyces* sp. NRRL B-50596 de la presente invención.

### **Ejemplo 3**

#### **5        Ensayo de actividad antifúngica de sustancias difusibles producidas por la cepa de *Streptomyces* sp. CACIA-1.46HGO NRRL B- 50596.**

Se realizaron ensayos sobre la actividad antifúngica de sustancias difusibles en el medio de cultivo producidas por la cepa de la presente invención. Se emplearon discos de agar de 0.8 cm de diámetro tomados de una placa de Petri con ISP2 que contenía creciendo a S-1.46. Los discos de agar se colocaron al centro de una Placa Petri con medio AN y al borde de la caja se coloca un bloque de agar con micelio activo de *Phytophthora capsici*, como el que se muestra en la Figura 9, y de *Curvularia* sp, como el que se muestra en la Figura 10. Se observa el efecto inhibitorio de las sustancias contenidas en el bloque de agar acumuladas durante el crecimiento de *Streptomyces* sp CACIA-1.46HGO. En la tabla 3 se indican los valores de los halos de inhibición producidos en los hongos patógenos probados, con lo que se demuestra una vez más la ventaja de la cepa de la presente invención respecto a otras cepas de estreptomicetos.

Tabla 3.

<b>ACTIVIDAD ANTAGONISTA DE <i>Streptomyces</i>-sp CACIA-1.46HGO</b>	
	<b>Halo de inhibición (mm*)</b>
<b>Patógeno</b>	
<i>Curvularia</i> sp.	19.4 (0.02)
<i>Fusarium</i> sp.	15.9 (0.2)

\* Cada ensayo consistió de tres replicas.

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-50596; y un portador agronómicamente aceptable.
2. La composición agronómica de conformidad con la reivindicación 1,  
10 caracterizada además porque está en la forma de presentación de gránulos, polvos, o de suspensiones líquidas.
3. Uso de la composición agronómica de las reivindicaciones 1 y 2, para promover la resistencia contra microorganismos fitopatógenos en plantas, en donde los microorganismos fitopatógenos son particularmente hongos.
- 15 4. Uso de conformidad con la reivindicación 3, en donde los hongos incluyen a los géneros *Fusarium*, *Curvularia*, *Helminthosporium*, *Aspergillus*, *Colletotrichum* y *Rizoctonia*.
5. Un método para promover resistencia contra microorganismos fitopatógenos en plantas, caracterizado porque comprende aplicar una  
20 composición como la que se describe en las reivindicaciones 1 y 2, a una plántula, semilla de planta, directamente al suelo.
6. El método de conformidad con la reivindicación 5, en donde la aplicación es a nivel invernadero o a nivel de campo.



## RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención describe y reclama una cepa de *Streptomyces* sp., con  
5 No. de Acceso NRRL B-50596, 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. para control biológico, 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) 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: 721 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-50596
  - (ix) CARACTERISTICAS: gen
    - (A) NOMBRE/CLAVE: **Secuencia parcial ADN ribosomal 16S**
    - (B) LOCALIZACION: cromosoma
  - (xi) DESCRIPCION DE LA SEQ ID NO: 1

```

catgcaagtc gaacgatgaa gcccttcggg gtggattagt ggcgaaacggg tgagtaacac 60
gtgggcaatc tgccctgcac tctgggacaa gccctggaaa cggggtctaa taccggatga 120
caccctct cgcattgggag ggggttgaaa gctccggcgg tgcaggatga gcccgcgcc 180
tatcagcttg ttggtgaggt agaagctcac caaggcgacg acgggtagcc ggcctgagag 240
ggcgaccggc cacactggga ctgagacacg gccagactc ctacgggagg cagcagtggg 300
gaatattgca caatgggcca aagcctgatg cagcgacgcc cgcgtgagg atgacggcct 360
ttcgggttg aaacctctt tcagcaggga agaaagcga agtgacggta cctgcagaaa 420
aaagcgccgg ctaactacgt gccagcagcc gcggtaatac gtagggcgca agcgttgtcc 480
ggaattattg ggcgtaaaga gctcgtagcc ggcttgctac gtcggttgtg aaagcccggg 540
gcttaacccc gggctctgcag tcgatacggg caggctagag tgtggtaggg gagatcgga 600

```

IMPI  
INSTITUTO MEXICANO  
DE LA PROPIEDAD  
INDUSTRIAL



ttcctggtgt agcgggtgaaa tgcgcagata tcaggaggaa caccggtggc gaaggcggat 660

ctctgggcca ttactgacgc tgaggagcga aagcgtgggg agcgaacagg ~~attagatacc 720~~

c

721



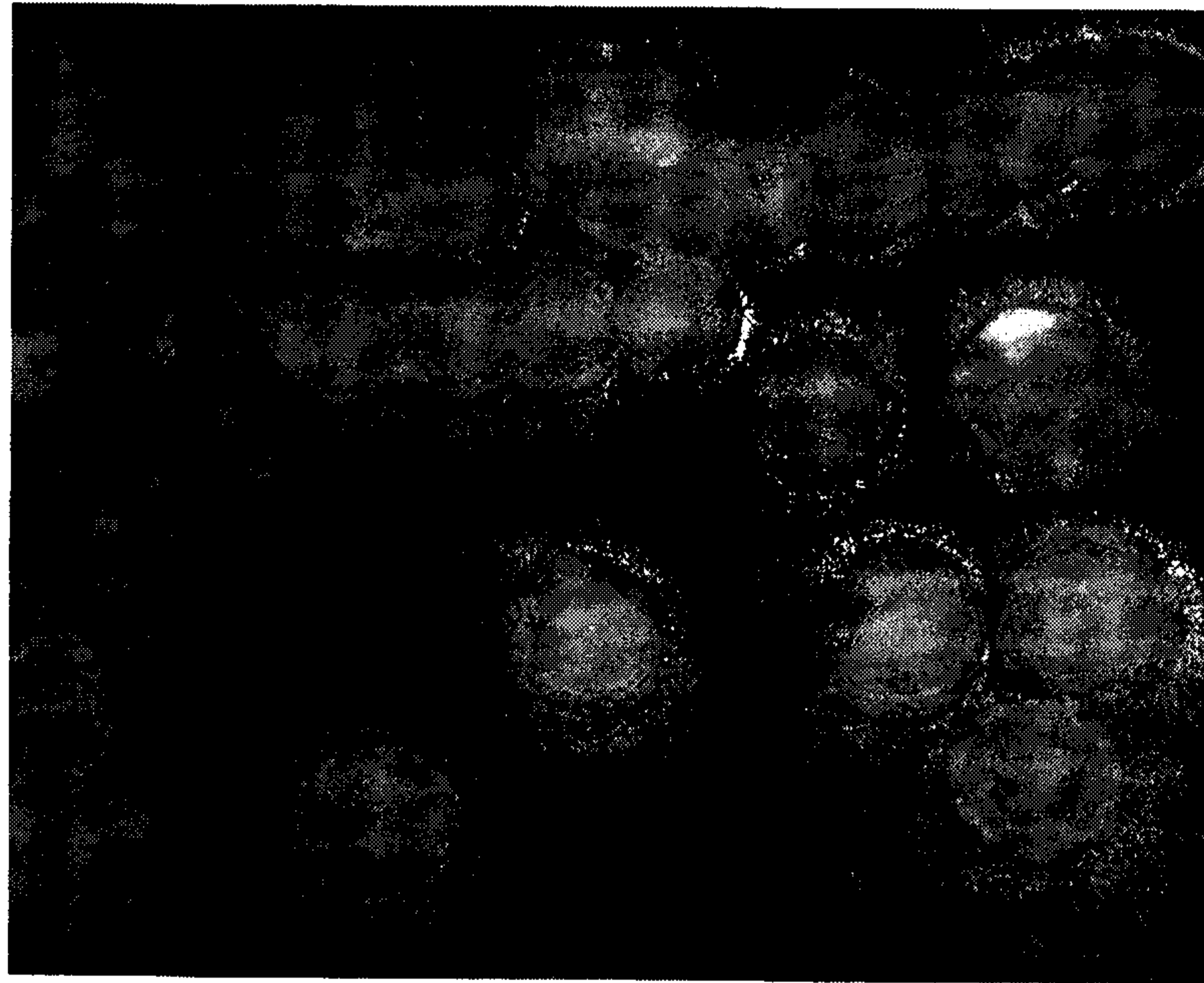


FIGURA 1

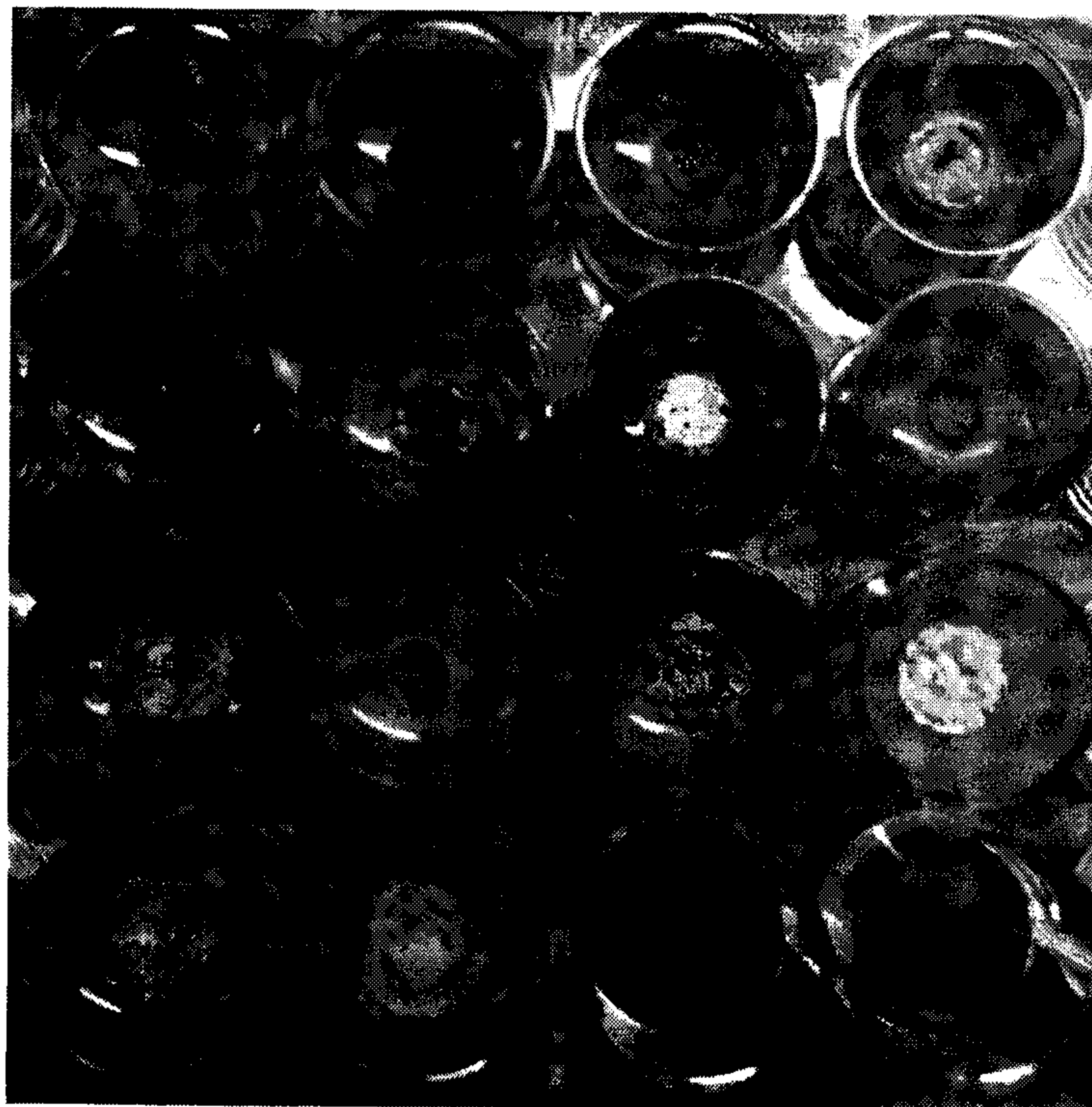
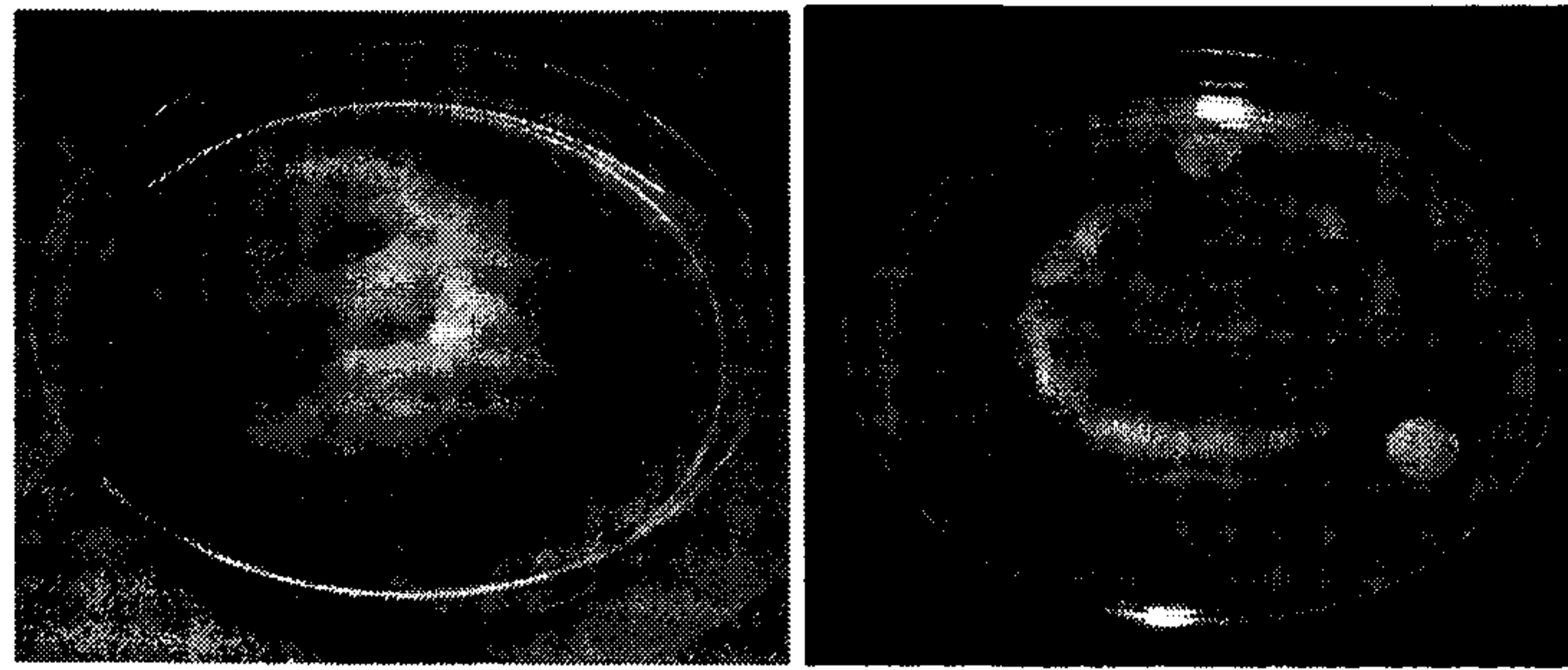
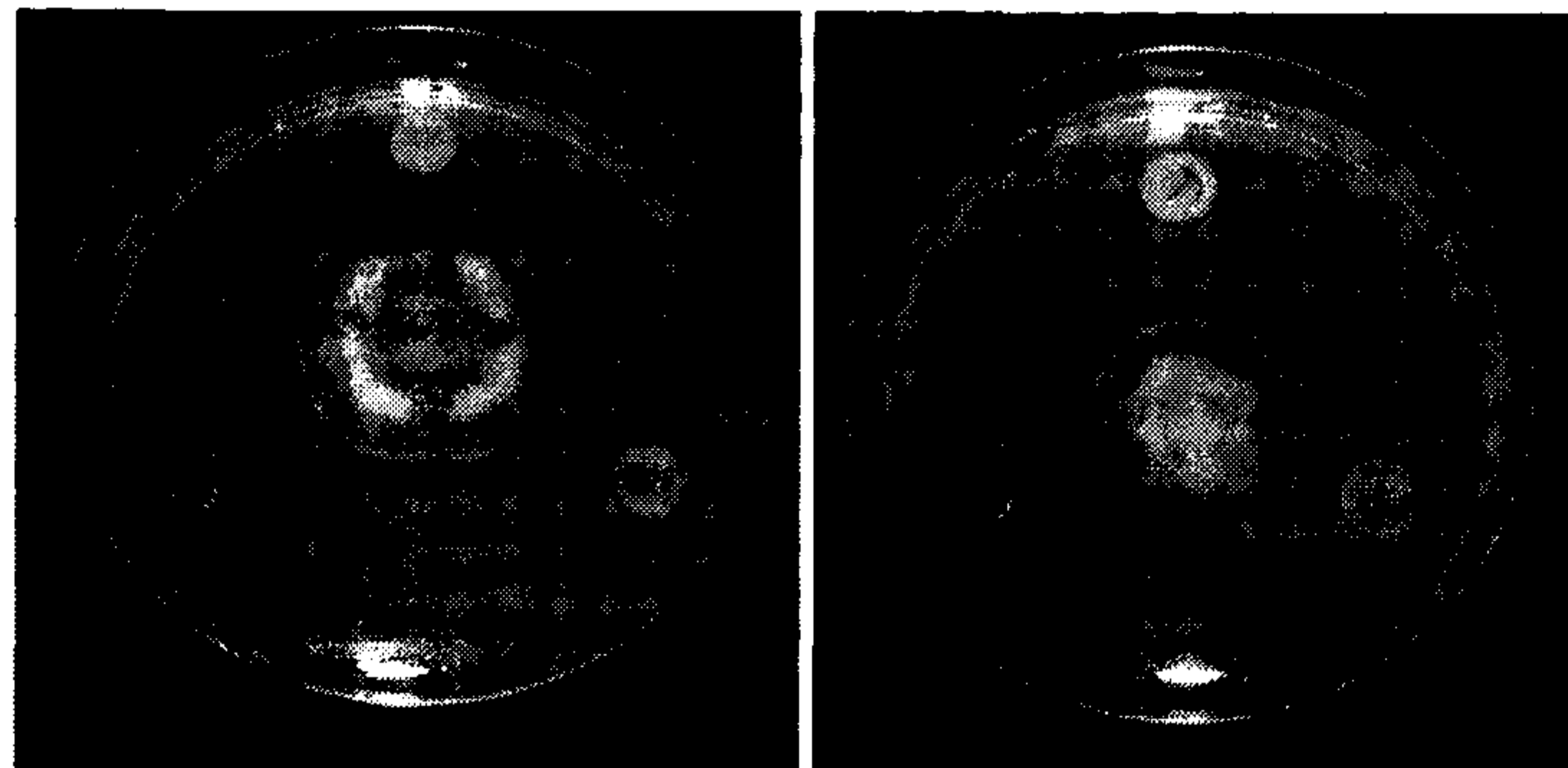


FIGURA 2



CONTROL

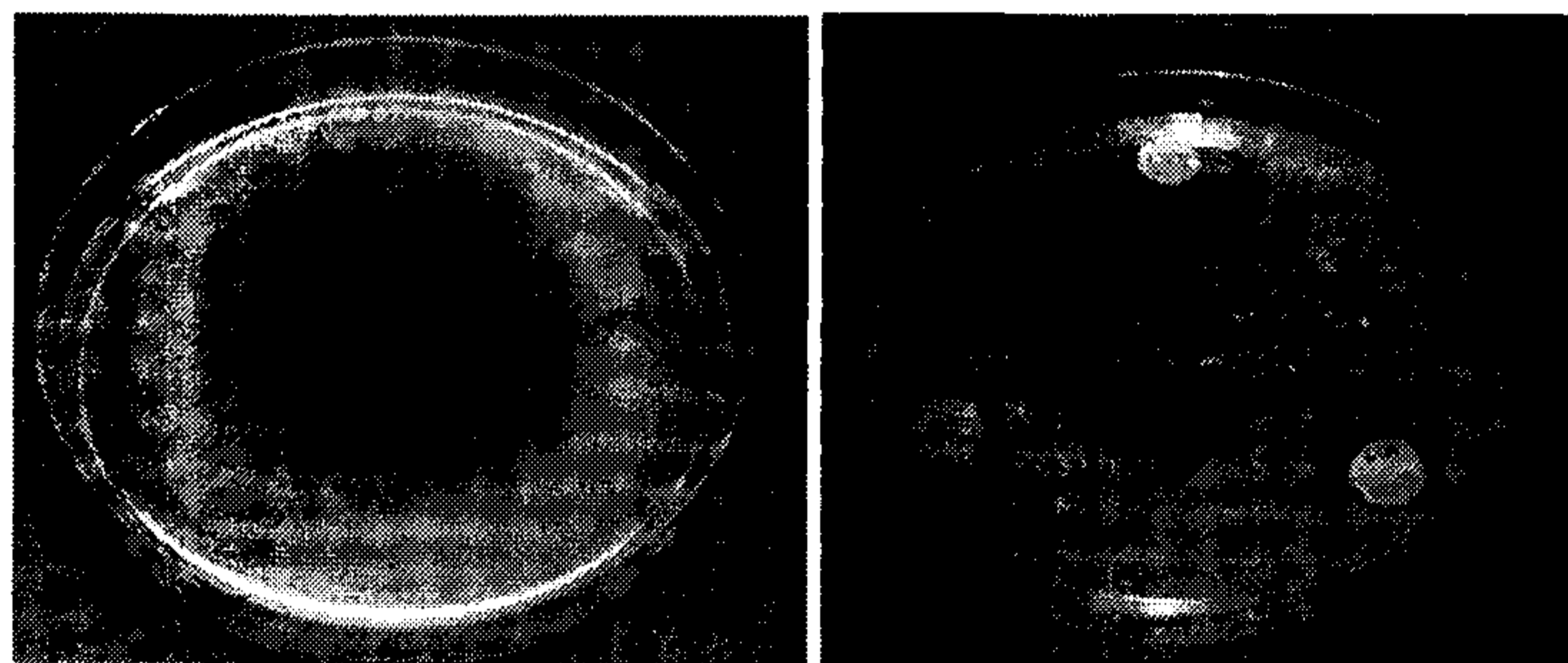
0d



3d

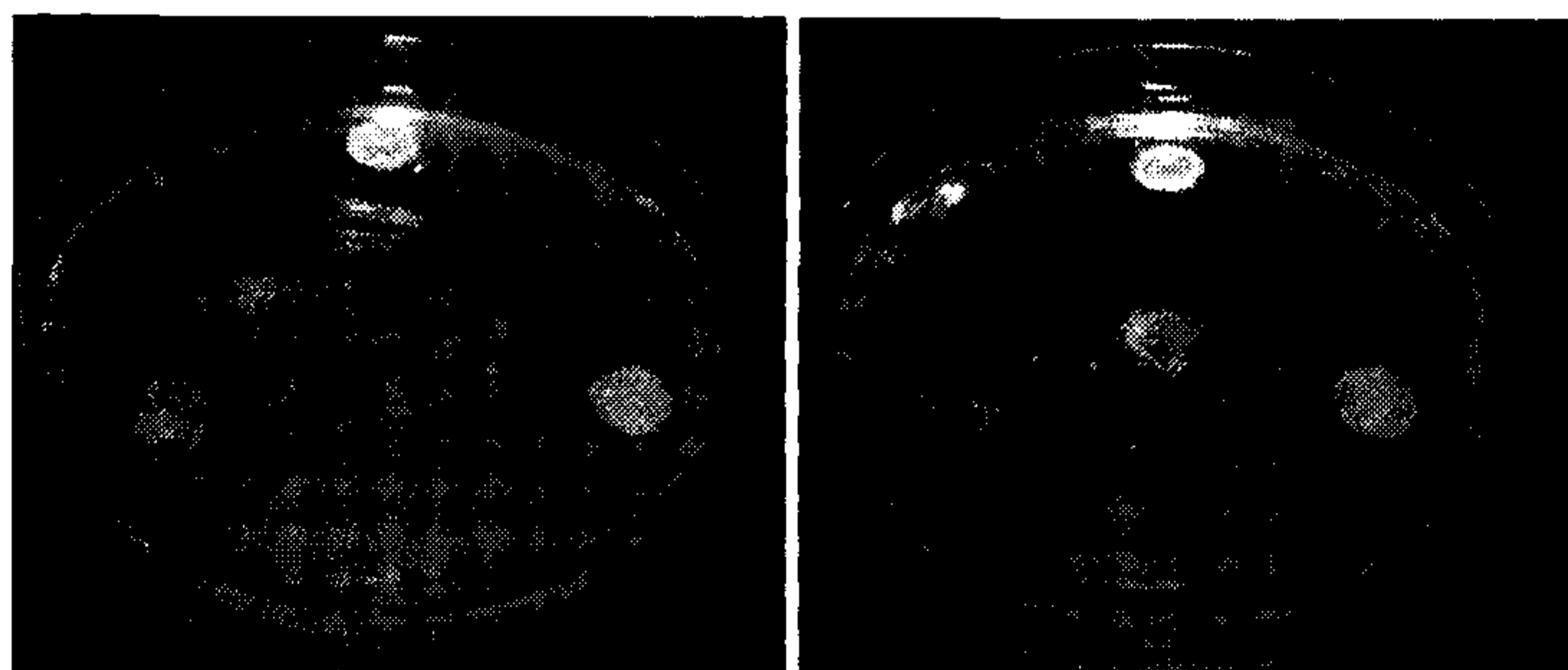
5d

FIGURA 3



CONTROL

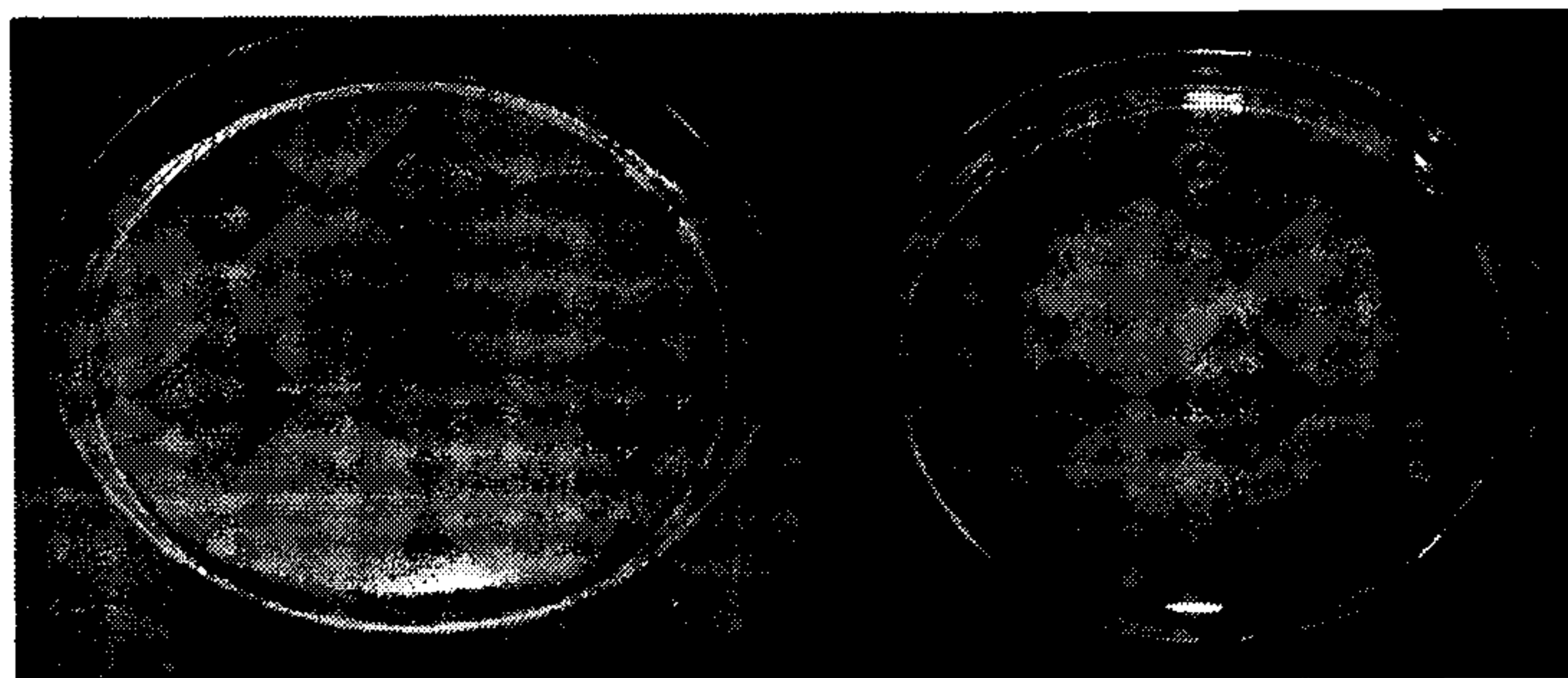
0d



3d

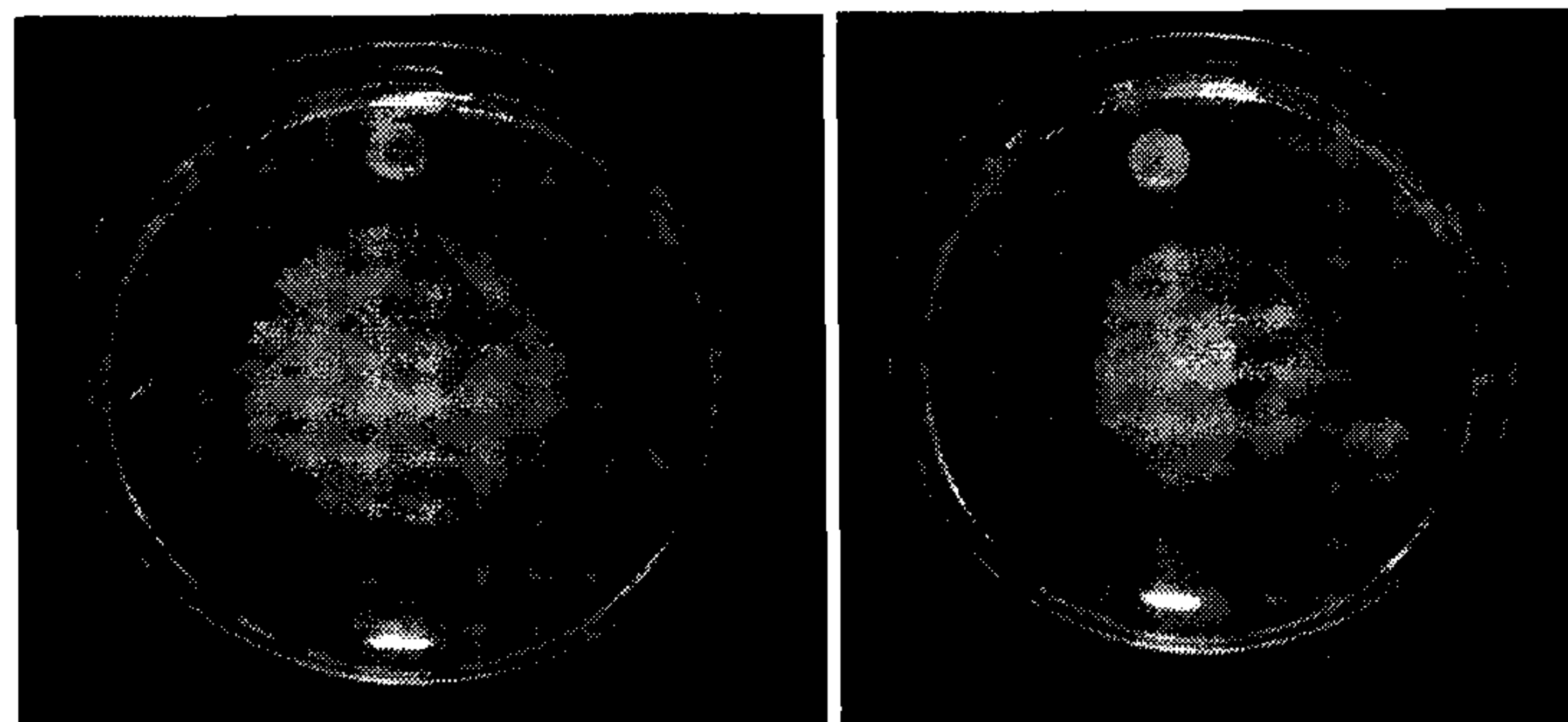
5d

FIGURA 4



CONTROL

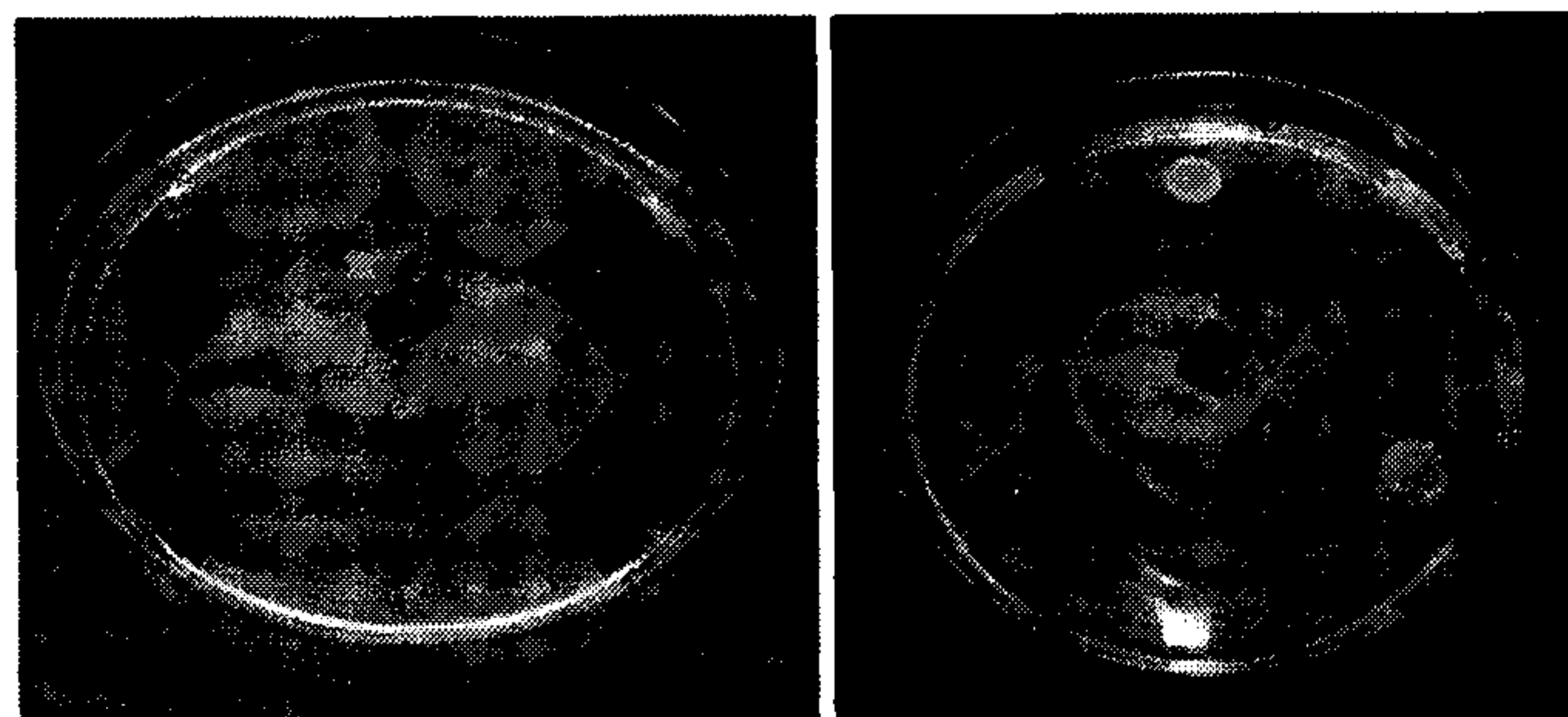
0d



3d

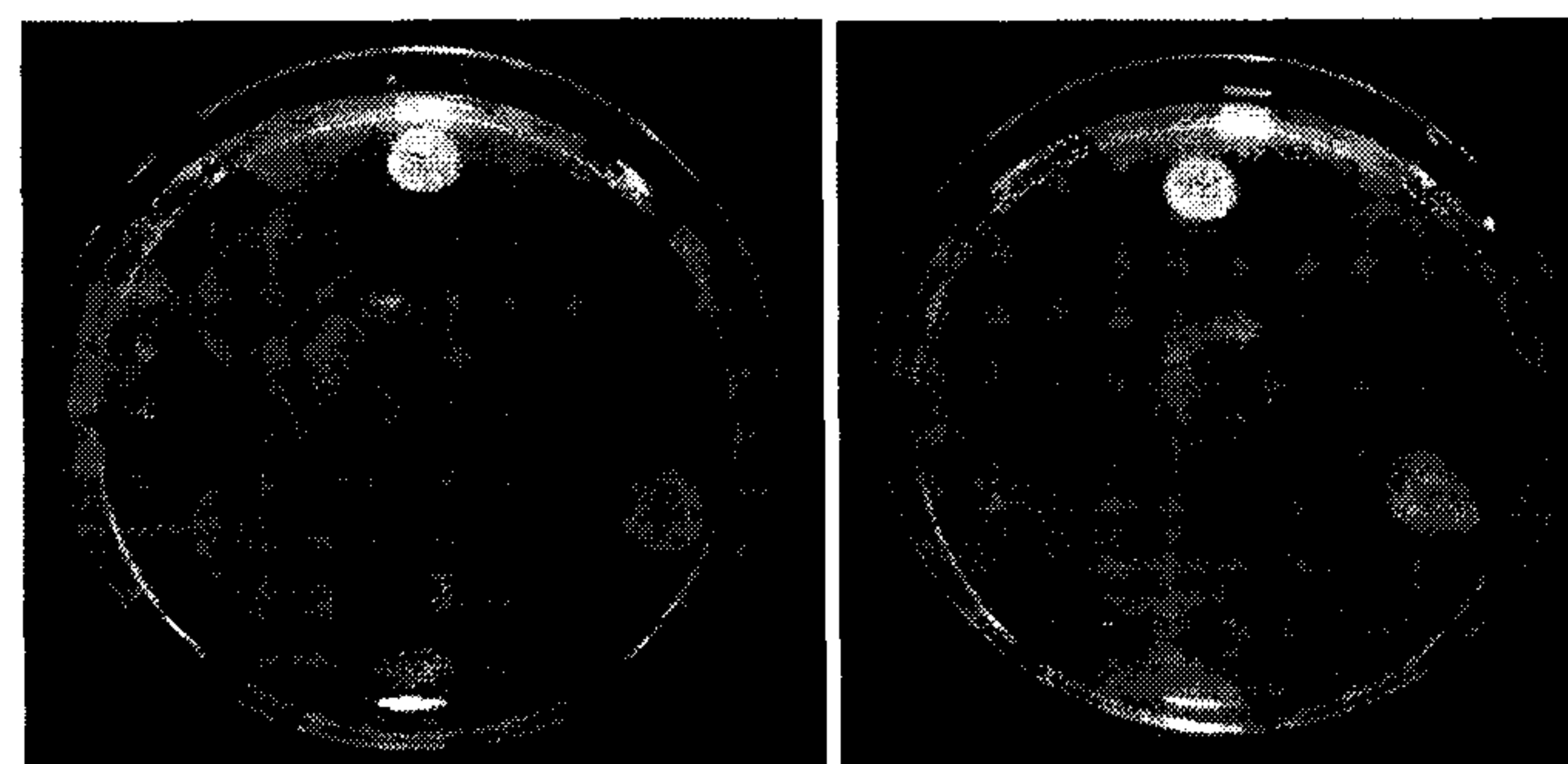
5d

FIGURA 5



CONTROL

0d



3d

5d

FIGURA 6





FIGURA 7

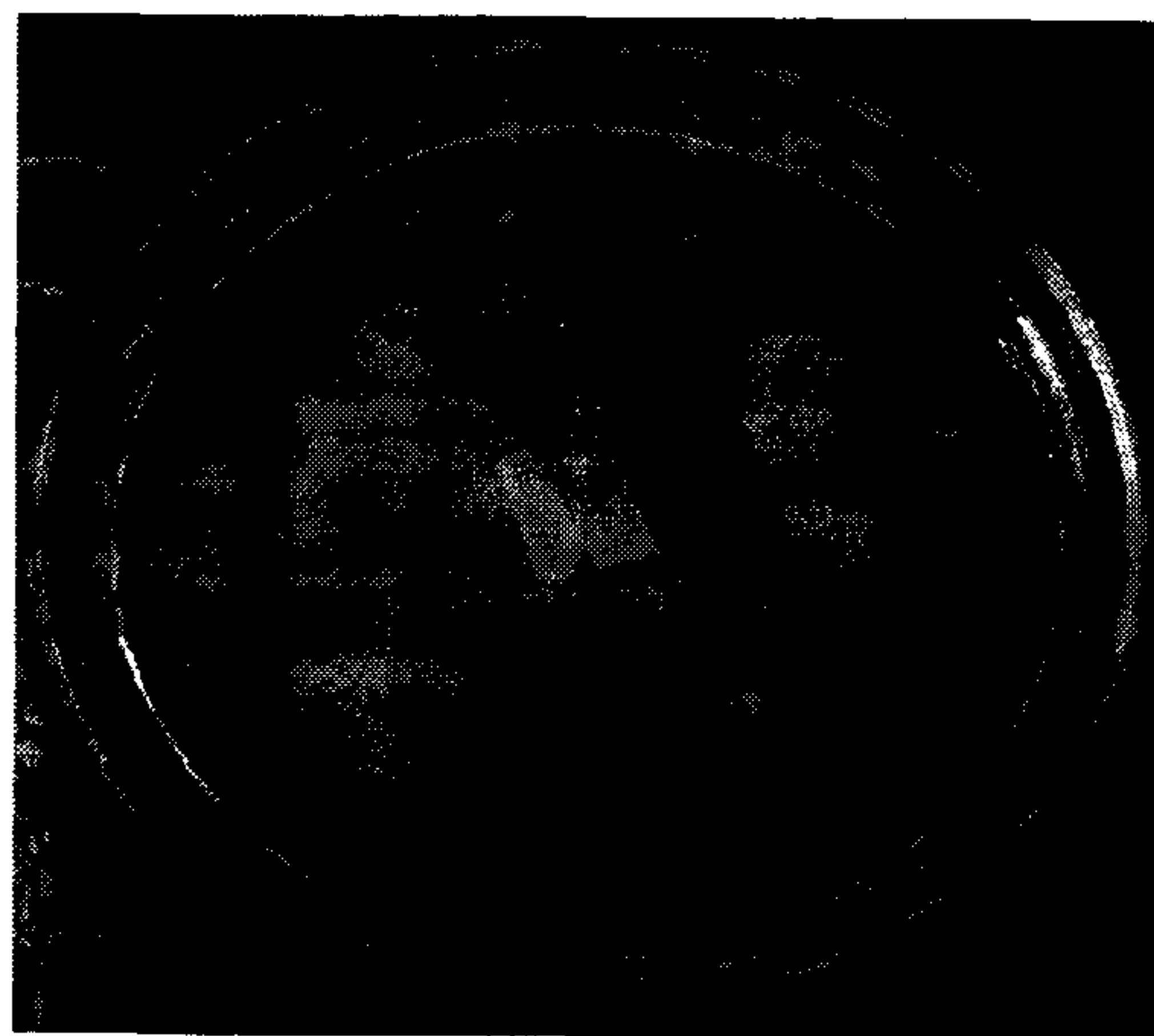
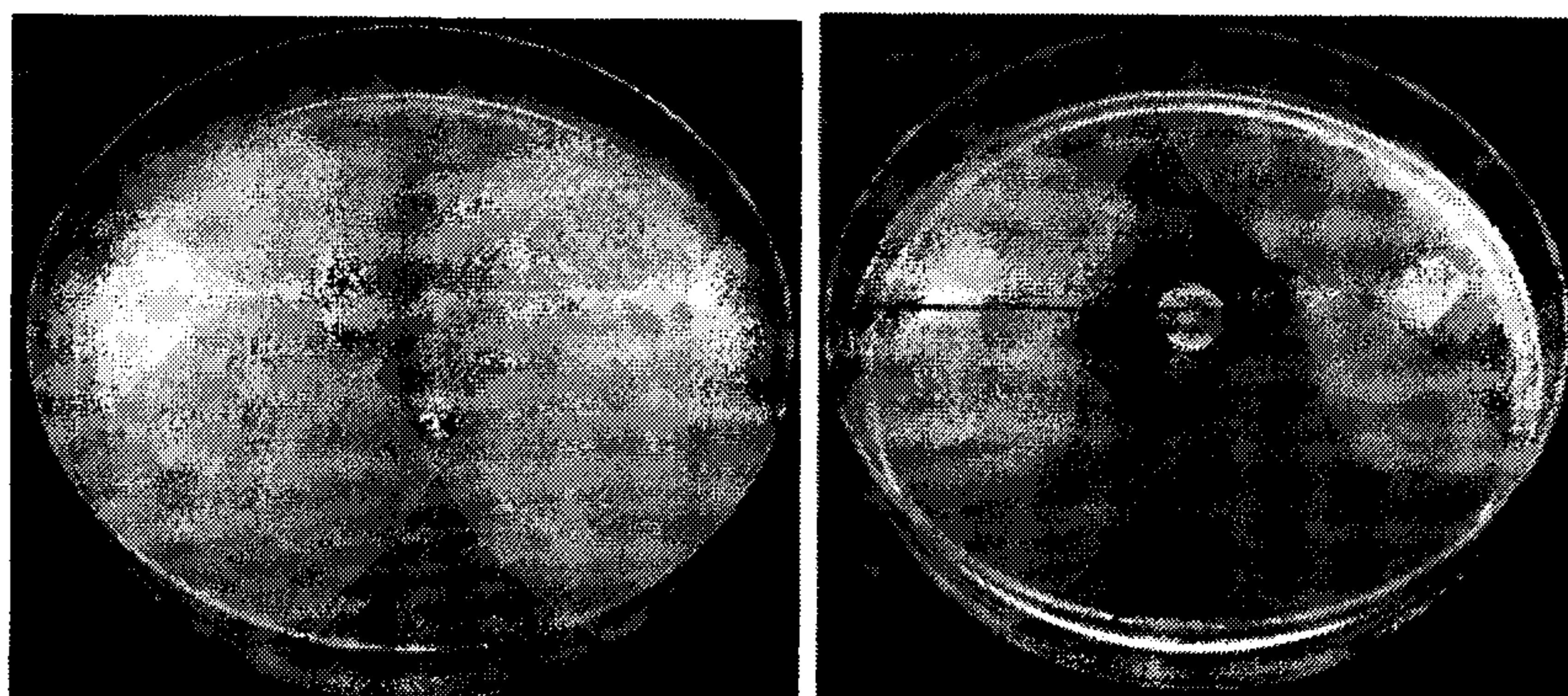


FIGURA 8



CONTROL

FIGURA 9

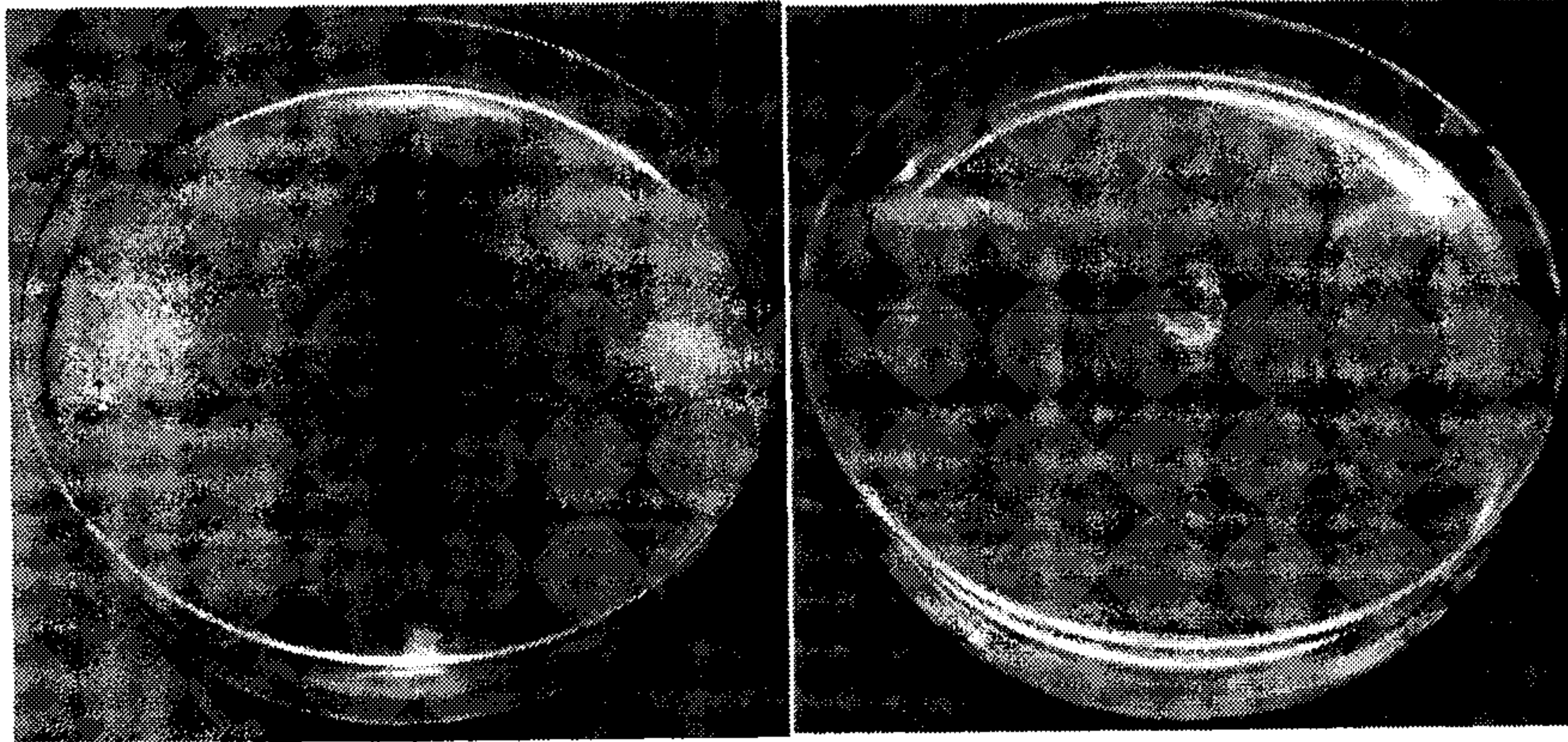


FIGURA 10