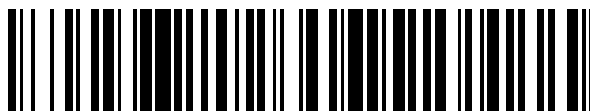


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 676 460**

51 Int. Cl.:

A01N 63/00 (2006.01)

A01N 63/02 (2006.01)

C12N 1/20 (2006.01)

C12R 1/465 (2006.01)

C05F 11/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.09.2014** **PCT/FR2014/052387**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.04.2015** **WO15044584**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.09.2014** **E 14790658 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.04.2018** **EP 3048890**

54 Título: **Bacteria aislada del género Streptomyces**

30 Prioridad:

24.09.2013 FR 1359186

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

19.07.2018

73 Titular/es:

**AGRONUTRITION (100.0%)
3 Avenue de L'Orchidée Parc Activestre
31390 Carbonne, FR**

72 Inventor/es:

**ERRAKHI, RAFIK;
ATTIA, FAOUZI y
CABANES, CÉDRIC**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 676 460 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

Bacteria aislada del género *Streptomyces***Descripción**

- 5 La invención se refiere a una nueva bacteria aislada del género *Streptomyces*, una composición que comprende al menos una tal bacteria y una composición acelular que se puede obtener mediante el cultivo de al menos una tal bacteria.
- 10 El desarrollo de cultivos vegetales agrícolas intensivos hoy en día se necesita para satisfacer las necesidades de alimentos en todo el mundo. Estos cultivos intensivos requieren el uso de agentes capaces de optimizar la nutrición de plantas de interés agrícola, para promover el crecimiento y reducir el crecimiento de plantas y/o agentes patógenos no deseados. En particular, el uso de agentes para optimizar la nutrición de las plantas, de agentes de protección de las plantas frente a organismos patógenos, en particular frente a bacterias fitopatógenas y/u hongos que pueden afectar al crecimiento óptimo de las plantas.
- 15 Los fertilizantes químicos que a menudo se presentan en forma sólida y son difícilmente solubles en el suelo, necesitan ser masivamente aplicados precisamente cuando se necesitan estos productos fertilizantes para el crecimiento óptimo de las plantas. El exceso de los productos fertilizantes sólidos proporcionados al suelo y no absorbidos por las plantas se mantiene temporalmente en el suelo y se disuelve gradualmente por el agua de lluvia o el agua de riego, causando la contaminación de las corrientes de agua y los mantos freáticos.
- 20 Actualmente se buscan soluciones para mejorar la eficiencia de la fertilización del suelo sin contaminar el medio ambiente, particularmente los mantos freáticos, al mismo tiempo que se favorece el crecimiento de las plantas.
- 25 Por lo tanto, la presente invención tiene como objetivo proporcionar una solución a este problema.
- Por otra parte, muchos agentes fitopatógenos son propensos a crecer en cultivos vegetales, y es por ello que se reducen los rendimientos y la calidad de la producción de cultivos. Entre estos agentes fitopatógenos, podemos encontrar muchas bacterias tales como, por ejemplo, *Streptomyces scabies* que puede causar daños a los cultivos de patatas. También hay muchos hongos fitopatógenos tales como, por ejemplo, *Fusarium culmorum*, *Botrytis cinerea* responsable en particular del moho gris o *Pythium ultimum* o también *Phaeomoniella chlamydospora*, *Phaeomoniella aleophilum*, *Eutypa lata* o *Fomitiporia mediterranea* que son responsables de patologías de la vid.
- 30 La invención también tiene como objetivo proporcionar una solución para la protección frente a plantas de ciertos organismos-bacterias y/u hongos que son fitopatógenos.
- 35 Para ello, la presente invención se refiere a una bacteria aislada de acuerdo con la reivindicación 1.
- La secuencia SEQ ID_NO1 se describe a continuación:

40 tagtggcgaa cgggtgagta acacgtgggc aatctgccct gcactctggg acaagccctg 60

gaaacgggggt ctaataccgg atatgacacg ctccgcgatg ggatgcgtgt ggaaagctcc 120

ggcgggtgcag gatgagcccg cggcctatca gcttgttggg ggggtgatgg cctaccaagg 180

cgacgacggg tagccggcct gagagggcga ccggccacac tgggactgag acacggccca 240

gactectacg ggaggcagca gtggggaata ttgcacaatg ggcgaaagcc tgatgcagcg 300

acgccgcgtg agggatgacg gccttcgggt tgtaaacctc tttagcagg gaagaagcga 360

gagtgcgggt acctgcagaa gaagcgccgg ctaactacgt gccagcagcc gcggtataac 420

gtagggcgca agcgttgtcc ggaattattg ggcgtaaaga gctcgtaggc ggcttgcgc 480

gtcggatgtg aaagcccggt gcttaacccc gggctcgcgt tcgatacggg caggctagag 540

ttcggtaggg gagatcgga ttctgtgtgt agcggtgaaa tgcgcagata tcaggaggaa 600

caccgggtggc gaaggcggat ctctgggccc atactgacgc tgaggagcga aagcgtgggg 660

agcgaacagg attagatacc ctggtagtcc acgccgtaaa cgttggaac taggtgtggg 720

cgacattcca cgtcgtccgc gccgcagcta acgcattaag tccccgcct ggggagtacg 780

```

gccgcaaggc taaaactcaa aggaattgac gggggggcccg cacaagcggc ggagcatgtg      840
gcttaattcg acgcaacgcg aagaacctta ccaaggcttg acatacaccg ggaaacctct      900
ggagacaggg gcccccttg tggctgggtg acagggtgtg catggcttgc cgtcagctcg      960
tgtctgaga tgttgggtta agtccccgca acgagcgcaa cccctgttct gtgttgccag      1020
catgccttgc gggggntgat ggggacttnc acaggagact gccgggggtca actcggagga      1080
aggtggggac gacgtcaagt catcatgccc cttatgtctt gggtgcaca cgtgctacaa      1140
tgcccggtac aatgagctgc gaagccgtga ggtggagcga atctcaaaaa gccggtctca      1200
gttcggattg gggctctgca ctcgacccca tgaagtcgga gtcgctagta atcgagatc      1260
agcattgctg cggtaatac gttcccgggc ctgtacaca ccgcccgtca cgtcacgaaa      1320
gtcggtaaca cctgaa                                     1336

```

En la secuencia SEQ ID_NO1 anterior, el símbolo “n” en las posiciones 1036 y 1049 de la secuencia SEQ ID_NO1 significa, de acuerdo con la IUPAC (“Unión Internacional de Química Pura y Aplicada”), uno cualquiera de los cuatro nucleótidos a, t, c o g. Por lo tanto, el nucleótido n en la posición 1036 se selecciona de entre el grupo que consiste en el nucleótido “a”, el nucleótido “t”, el nucleótido “g” y el nucleótido “c” y el nucleótido n en la posición 1049 se selecciona, independientemente del nucleótido en la posición 1036, del grupo que consiste en el nucleótido “a”, el nucleótido “t”, el nucleótido “g” y el nucleótido “c”.

Por consiguiente, la invención se refiere a una bacteria aislada que comprende la secuencia del ADN_r 16S identificada en la SEQ ID_NO1, seleccionándose dicha bacteria aislada del grupo que consiste en:

- La bacteria depositada y registrada en la CNCM con el N.º I-4467, y
- Los mutantes de dicha bacteria depositados y registrados en la CNCM con el N.º I-4467.

La bacteria de acuerdo con la invención es del género *Streptomyces*.

Una cepa de la bacteria en una primera variante de la invención ha sido depositada por el solicitante y se registró el 7 de abril de 2011, con el N.º I-4467 de la Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos (CNCM) del Instituto Pasteur (cuya dirección es 25, rue du Docteur Roux, 75724 París cedex 15) que tiene la condición de autoridad internacional de depósito en virtud del Tratado de Budapest. Por consiguiente, la bacteria de acuerdo con la invención se ha depositado y registrado en la CNCM con el N.º I-4467.

La bacteria de acuerdo con la primera variante de la invención es una bacteria aislada de cualquier entorno natural, es decir obtenida por aislamiento a partir del entorno original natural. Fue aislada de un entorno original natural en el que existía.

En una segunda variante, la invención se refiere a una bacteria mutante de la bacteria de acuerdo con la primera variante de la invención depositada en la CNCM con el N.º I-4467, es decir, obtenida por mutación de la bacteria de acuerdo con la primera variante de la invención. Una bacteria mutante de acuerdo con la invención también comprende una secuencia de ADN_r 16S que es homóloga con la secuencia SEQ ID_NO1.

Una bacteria mutante tal, se obtiene por tratamiento de una bacteria de acuerdo con la primera variante de la invención por cualquier método de mutagénesis, en particular seleccionado del grupo que consiste en los métodos de mutagénesis aleatoria y los métodos de mutagénesis dirigida.

La mutagénesis aleatoria se lleva a cabo mediante un tratamiento que comprende someter las bacterias, de acuerdo con la primera variante de la invención, al menos a un agente mutagénico seleccionado entre el grupo que consiste en mutágenos físicos, especialmente mediante la exposición de por ejemplo bacterias de acuerdo con la invención a una luz ultravioleta o una radiación ionizante, y agentes mutágenos químicos.

Una bacteria mutante presenta diferencias de la secuencia de ADN con respecto a la bacteria de acuerdo con la primera variante de la invención depositada en la CNCM con el N.º I-4467. Estas diferencias en las secuencias de ADN pueden afectar a las secuencias de ADN distintas de la secuencia de ADN_r 16S de las bacterias de acuerdo con la invención.

Ventajosamente y de acuerdo con la invención, la bacteria aislada presenta una secuencia de ADN que codifica la subunidad beta de la ARN polimerasa (polB) homóloga a la SEQ ID_NO4. Así, la bacteria aislada tiene la secuencia SEQ ID_NO4 como secuencia que codifica la subunidad beta de la ARN polimerasa (polB).

Ventajosamente y de acuerdo con la invención, la bacteria aislada presenta una secuencia de ADN que codifica la girasa (gyrB) homóloga a la SEQ ID_NO5. Así, la bacteria aislada tiene la secuencia SEQ ID_NO5 como secuencia que codifica la girasa (gyrB). Ventajosamente y de acuerdo con la invención, la bacteria aislada presenta una secuencia de ADN que codifica la recombinasa (RecA) homóloga a la SEQ ID_NO6. Así, la bacteria aislada tiene la secuencia SEQ ID_NO6 como una secuencia que codifica la recombinasa (RecA).

Ventajosamente y de acuerdo con la invención, la bacteria aislada presenta una secuencia de ADN que codifica la subunidad beta de la triptófano sintetasa (trpB) homóloga a la SEQ ID_NO7. Así, la bacteria aislada tiene la secuencia SEQ ID_NO7 como secuencia que codifica la triptófano sintetasa (trpB).

Ventajosamente y de acuerdo con la invención, la bacteria aislada presenta una secuencia de ADN que codifica la unidad beta de la ATP sintetasa (AtpB) homóloga a la SEQ ID_NO8. Así, la bacteria aislada tiene la secuencia SEQ ID_NO8 como secuencia que codifica la subunidad beta de la ATP sintetasa (AtpB).

Ventajosamente y de acuerdo con la invención, la bacteria aislada tiene al menos una de las secuencias SEQ ID_NO4, SEQ ID_NO5, SEQ ID_NO6, SEQ ID_NO7 y SEQ ID_NO8. Ventajosamente y de acuerdo con la invención, las bacterias aisladas presentan cada una las secuencias SEQ ID_NO4, SEQ ID_NO5, SEQ ID_NO6, SEQ ID_NO7 y SEQ ID_NO8.

Ventajosamente, una bacteria de acuerdo con la invención, es capaz de ralentizar el crecimiento de al menos un microorganismo, dicho microorganismo objetivo, seleccionado del grupo que consiste en *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium culmorum*, *Pythium ultimum*, *Phaeomoniella chlamydospora*, *Phaeomoniella aelophilum*, *Eutypa lata*, *Fomitiporia mediterranea* y *Botryosphaeria obtusa*.

Una bacteria de acuerdo con la invención se caracteriza por algunas o todas de las siguientes características:

- es no patógena (inocua) para los seres humanos;
- es una bacteria Gram-positiva;
- es una bacteria saprófita, es decir capaz de degradar la materia orgánica en el suelo.

La invención se extiende a cualquier bacteria producida mediante un proceso técnico a partir de una bacteria de acuerdo con la primera variante de la invención y que comprende una secuencia de ADN homólogo al 100 % con la secuencia SEQ ID_NO1. Por “proceso técnico”, nos referimos a cualquier proceso de cultivo bacteriano, de selección de bacterias, de aislamiento, de clonación y/o de modificación de material genético de las bacterias, especialmente por mutagénesis.

La invención también se extiende a una cepa bacteriana que comprende al menos una bacteria de acuerdo con la invención.

Una cepa bacteriana de acuerdo con la invención se caracteriza por algunas o todas de las siguientes características:

- presenta, cuando se cultiva en un medio ISP-2 o en un medio Bennett sólido por un micelio, micelio de sustrato, ramificado en desarrollo en el espesor del medio sólido de color que varía desde el amarillo-marrón a gris-marrón, dependiendo de la composición del medio sólido;
- presenta, cuando se cultiva en un medio ISP-2 o en un medio Bennett sólido, un micelio aéreo en desarrollo en la interfaz aire/sólido que es de color blanco;
- tiene una temperatura óptima de crecimiento que se encuentra entre 12 °C y 37 °C, preferiblemente entre 28 °C y 30 °C;
- tiene un pH óptimo de crecimiento entre 6 y 8;
- es capaz de utilizar D-glucosa, manitol, lactosa, sacarosa, maltosa y dextrina como fuente de carbono;
- no es capaz de utilizar preferentemente galactosa, inositol, sorbosa, fructosa, arabinosa, rafinosa, ramnosa o celulosa como única fuente de carbono;
- está adaptada para utilizar aminoácidos, sales de nitrato y sales de amonio como fuente de nitrógeno;
- es capaz de reducir el nitrato a nitrito, para degradar adenina, tween 20 y acetato de sodio;
- no es capaz de hidrolizar almidón y de utilizar sus productos de hidrólisis.

La invención también proporciona una composición que comprende al menos una bacteria de la invención. Por consiguiente, la invención proporciona una composición que comprende al menos una bacteria que comprende una secuencia de ADN homóloga al 100 % con la secuencia SEQ ID_NO1. Una composición de acuerdo con la invención puede comprender, o no, otras bacterias distintas a las bacterias de acuerdo con la invención. Una

composición de acuerdo con la invención comprende al menos una bacteria de la cepa depositada en la CNCM con el No. I-4467 y o al menos una bacteria mutante de la cepa depositada en la CNCM con el N.º I-4467 y que comprende una secuencia de ADN homóloga al 100 % con la secuencia SEQ ID_NO1.

La composición de acuerdo con la invención puede incluir las bacterias de acuerdo con la invención, dichas bacterias de acuerdo con la invención pueden ser bacterias vivas (es decir, capaces de crecer y multiplicarse en un medio nutriente adecuado) o bacterias muertas (es decir, bacterias inactivas y no pueden crecer ni multiplicarse). Se obtiene este tipo de bacterias muertas por cualquier tratamiento de inactivación de microorganismos conocido por los expertos en la técnica, en particular mediante un tratamiento térmico (por ejemplo, por calentamiento de células de acuerdo con la invención a una temperatura de 90 °C durante 15 minutos) de desnaturalización de proteína bacteriana de acuerdo con la invención.

Ventajosamente, la composición de acuerdo con la invención comprende un nucleótido que comprende la secuencia de ADN homóloga al 100 % con la secuencia SEQ ID_NO 1.

Ventajosamente, la composición de acuerdo con la invención puede incluir bacterias vivas y bacterias muertas.

Ventajosamente y de acuerdo con la invención, la composición comprende al menos un ambiente limpio para la conservación y el desarrollo de bacterias que contiene.

Una composición de la invención puede ser una composición líquida que comprende bacterias de acuerdo con la invención en un medio líquido. Ventajosamente, el medio líquido es un medio acuoso.

Una composición líquida de acuerdo con una primera variante de la invención se caracteriza por algunas o todas de las siguientes características:

- la composición líquida comprende bacterias en fase de crecimiento vegetativo, es decir, que tienen un metabolismo activo y/o se multiplican por división celular. Por lo tanto, comprende bacterias vivas en fase de crecimiento vegetativo o fase estacionaria;
- dicho medio líquido es un medio acuoso de cultivo, en particular seleccionado del grupo que consiste en medios completos y medios ricos que comprenden todos los elementos minerales y precursores orgánicos necesarios para el crecimiento de bacterias de acuerdo con la invención, en particular una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, una fuente de fósforo, vitaminas y oligoelementos;
- dicho medio líquido comprende D-glucosa, extracto de levadura, fosfato dibásico de potasio, sulfato de amonio, cloruro de potasio y glicerol.

Una composición líquida de acuerdo con una segunda variante de la invención, que se puede combinar con la variante anterior, se caracteriza por la totalidad o parte de las siguientes características:

- la composición líquida comprende bacterias de la invención en la forma de esporas. Se observa la formación de esporas cuando las bacterias de acuerdo con la invención, por ejemplo las bacterias de acuerdo con la primera variante de la invención depositadas en la CNCM con el N.º I-4467 o, en la segunda variante de la invención, mutantes de dicha bacteria depositados y registrados en la CNCM con el N.º I-4467, forman un micelio primario en el desarrollo de una interfaz aire/sólido e inician un crecimiento aéreo. Filamentos o 'hifas' aéreos no ramificados se desarrollan a partir del micelio primario y presentan en sus extremos estructuras compartimentadas precursoras de esporas. Por lo tanto, las bacterias vivas están formadas de esporas;
- dichas esporas comprenden una secuencia de ADN homóloga al 100 % con la secuencia SEQ ID_NO1;
- las esporas son lisas y encadenadas en espiral de tipo "S", las cadenas de esporas lisas tienen en promedio de 10 a 50 esporas;
- dicho medio líquido comprende D-glucosa, extracto de levadura, peptona, carbonato de calcio (CaCO₃) como inductor de estrés.

Se promueve la obtención de esporas de la bacteria de acuerdo con la invención, por ejemplo las bacterias de acuerdo con la primera variante de la invención depositadas en la CNCM con el N.º I-4467 o, en la segunda variante de la invención, mutantes de dicha bacteria depositados y registrados en la CNCM con el N.º I-4467, por cultivo de bacterias de acuerdo con la invención en un medio de cultivo capaz de generar un estrés bacteriano, incluyendo un medio de cultivo líquido limitado o deficiente de carbono y/o nitrógeno y/o fósforo y/o vitaminas y/u oligoelementos.

Ventajosamente, dichas esporas pueden ser colocadas en un medio nutriente y de rehidratación para formar una población de bacterias de acuerdo con la invención en la fase vegetativa.

Una composición líquida de acuerdo con la invención puede incluir bacterias en la fase vegetativa de la invención y las bacterias en forma de esporas de la invención. En cualquier caso, las células vegetativas y esporas de la invención tienen una secuencia de ADNr 16S homóloga al 100 % con la secuencia SEQ ID_NO1.

Una composición de acuerdo con la invención puede ser una composición en estado sólido que comprende al menos una bacteria de la invención.

5 En una primera variante, una composición sólida de acuerdo con la invención comprende al menos una bacteria de la invención y un medio sólido de cultivo; en particular, un medio sólido que comprende una proporción de agar-agar (E406).

10 En una segunda variante, una composición sólida de acuerdo con la invención comprende al menos una bacteria de la invención en un medio de conservación de bacterias a una temperatura por debajo de -20 °C, especialmente del orden de -80 °C o a una temperatura próxima a la temperatura del nitrógeno líquido. Por consiguiente, la invención se refiere a un medio de conservación, en particular un medio de conservación que contiene glicerol y/o polietilenglicol, que comprende al menos una bacteria de la invención.

15 La invención también proporciona una composición acelular que puede obtenerse mediante un procedimiento en el que:

- se coloca y se cultiva al menos una bacteria de la invención en un medio de cultivo capaz de permitir el crecimiento de dicha bacteria durante un periodo mayor de 24 horas y a una temperatura entre 12 °C y 37 °C, a continuación;
- 20 – se extraen las bacterias del medio de cultivo y se inactivan las bacterias con el fin de formar la composición acelular.

La invención también proporciona una composición acelular que comprende al menos un polinucleótido, dicho polinucleótido comprende una secuencia de ADN homóloga al 100 % con la secuencia SEQ ID_NO1.

25 Tal composición acelular es, en particular, un medio de cultivo que permite el crecimiento de bacterias de acuerdo con la invención y que está sustancialmente libre de dichas bacterias. Tal composición acelular puede o no presentar el ADN que comprende una secuencia homóloga al 100 % con la secuencia SEQ ID_NO 1.

30 Una composición acelular, de este tipo de acuerdo con la invención, obtenida después de 24 horas de cultivo de la cepa de acuerdo con la invención puede presentar en análisis por HPLC en columna de fase inversa una pluralidad de picos ($P_{24,i}$) que tienen tiempos de retención (t_i) indicados en la Tabla 1 a continuación.

Tabla 1

$P_{24,i}$	t_i (minuto)
$P_{24,1}$	3,30 - 3,60
$P_{24,2}$	3,90 - 4,0
$P_{24,3}$	5,90 - 6,38
$P_{24,4}$	10,1 - 10,20
$P_{24,5}$	13,5 - 13,9
$P_{24,6}$	21,4 - 21,7

35 Una composición acelular de este tipo de acuerdo con la invención obtenida después de 3 días (72 horas) de cultivo de la cepa de acuerdo con la invención puede presentar en el análisis por HPLC en la columna de fase inversa una pluralidad de picos ($P_{72,i}$) que tienen tiempos de retención (t_i) y áreas ($A_{72,i}$) expresadas en valores relativos en dichos picos ($P_{72,i}$) indicados en la Tabla 2 a continuación.

40

Tabla 2

$P_{72,i}$	t_i (minuto)	$A_{72,i}$ (%)
$P_{72,1}$	3,93	3,45
$P_{72,2}$	5,30	2,02
$P_{72,3}$	6,59	5,05
$P_{72,4}$	8,83	1,45
$P_{72,5}$	9,63	3,13
$P_{72,6}$	11,925	9,07
$P_{72,7}$	12,39	1,92
$P_{72,8}$	12,87	1,24
$P_{72,9}$	13,76	1,82
$P_{72,10}$	15,93	2,68
$P_{72,11}$	16,27	2,07
$P_{72,12}$	18,41	1,98
$P_{72,13}$	19,38	3,15
$P_{72,14}$	20,04	6,59

Se analizó por HPLC el extracto obtenido por extracción del medio de cultivo de la cepa de acuerdo con la invención con acetato de etilo, secado de la solución de acetato de etilo y la solubilización del extracto en metanol. La

cromatografía HPLC se lleva a cabo en una columna XBridge (Waters, Guyancourt, Francia) de dimensiones de 25 cm/4,6 mm/5 µm. La elución se lleva a cabo con un gradiente de acetonitrilo del 20 % al 95 % en agua con un caudal de 0,8 ml/min. La detección se lleva a cabo en la longitud de onda de 254 nm.

Ventajosamente y de acuerdo con la invención, la composición acelular se forma en un medio de cultivo bacteriano y muestra un cromatograma HPLC, llevado a cabo en una columna XBridge de dimensiones 25 cm/4,6 mm/5 µm con un gradiente de acetonitrilo del 20 % al 95 % en agua con un caudal de 0,8 ml/min, que comprende una primera señal principal a un tiempo de retención de 11,925 minutos y una segunda señal principal a un tiempo de retención de 20,04 min.

En las condiciones de extracción y de análisis mencionado anteriormente, ventajosamente y de acuerdo con la invención, la composición acelular obtenida después de 3 días (72 horas) de cultivo de la cepa de acuerdo con la invención muestra un cromatograma HPLC que comprende una primera señal (P_{72,6}) mayor a un tiempo de retención de 11,925 minutos y una segunda señal (P_{72,14}) mayor a un tiempo de retención de 20,04 min.

En las condiciones de análisis anteriormente mencionadas, ventajosamente y de acuerdo con la invención, la composición acelular obtenida después de 3 días (72 horas) de cultivo de la cepa de acuerdo con la invención tiene un cromatograma HPLC que comprende dichas señales las cuales son menores a tiempos de retención de 3,93 min, 5,30 min, 6,59 min, 8,83 min, 9,63 min, 12,39 min, 12,87 min, 13,76 min, 13,76 min, 15,93 min, 16,27 min, 18,41 min y 19,38 min.

La invención también proporciona una composición formada por un medio de cultivo bacteriano que tiene un cromatograma HPLC que comprende una primera señal principal a un tiempo de retención de 11,925 minutos y una segunda señal principal a un tiempo de retención de 20,04 min. Ventajosamente, el cromatograma HPLC comprende dichas señales las cuales son menores a tiempos de retención de 3,93 min, 5,30 min, 6,59 min, 8,83 min, 9,63 min, 12,39 min, 12,87 min, 13,76 min, 13,76 min, 15,93 min, 16,27 min, 18,41 min y 19,38 min.

Los inventores han demostrado que una composición acelular tal, que se obtiene poniendo en contacto al menos una bacteria de la invención, pero que puede estar al menos sustancialmente libre de bacterias de acuerdo con la invención y/o que puede o no estar libre de ADN que comprende la secuencia homóloga al 100 % con la secuencia SEQ ID_NO1, tiene un efecto estimulador de cultivo en crecimiento de las plantas tales como girasol, maíz, semilla de colza, el trigo y el tomate y también exhibe actividad antifúngica, especialmente frente a *Botrytis cinerea*, para las hojas de vid.

La invención se extiende también a una composición acelular capaz de ser obtenida por un procedimiento en el que se cultiva al menos una bacteria de la invención en un medio de cultivo capaz de permitir el crecimiento de dicha bacteria durante un periodo superior a 24 horas.

Ventajosamente y de acuerdo con la invención, se eliminan las bacterias del medio de cultivo para formar una composición acelular al menos sustancialmente libre de bacterias.

Ventajosamente y de acuerdo con la invención, se extrae el ADN que comprende la secuencia homóloga al 100 % con la secuencia SEQ ID_NO1 de la composición acelular, por ejemplo por tratamiento de la composición acelular por una nucleasa.

En otra alternativa, ventajosamente y de acuerdo con la invención, no se eliminan las bacterias del medio de cultivo.

En otra alternativa, ventajosamente y de acuerdo con la invención, no se elimina el ADN que comprende la secuencia homóloga al 100 % con la secuencia SEQ ID_NO1 de la composición acelular.

Ventajosamente, se siembran y se cultivan las bacterias de acuerdo con la invención en un medio de cultivo y durante un tiempo suficiente capaz de permitir su crecimiento, es decir, durante un periodo de entre 1 día y 10 días a una temperatura entre 12 °C y 37 °C, preferiblemente entre 28 °C y 30 °C, especialmente de alrededor de 30 °C, a continuación, se extraen las bacterias del medio de cultivo, por ejemplo por centrifugación del medio de cultivo, o se inactivan las bacterias con el fin de formar la composición acelular. Tal composición acelular es un medio de cultivo que no comprende más bacterias de acuerdo con la invención o que comprende bacterias muertas, que se ha obtenido poniendo en contacto y cultivando las bacterias de acuerdo con la invención en un medio de cultivo y condiciones adecuadas para el crecimiento de las bacterias. Una composición acelular de este tipo de acuerdo con la invención presenta propiedades, en particular propiedades antifúngicas, que son cercanas o equivalentes a las propiedades, especialmente las propiedades antifúngicas, de las bacterias de acuerdo con la invención.

La invención se refiere también a cualquier uso, especialmente en la agricultura, de una bacteria o una cepa bacteriana o una composición sólida o líquida de acuerdo con la invención.

La invención también se refiere al uso en la agricultura de una composición de tratamiento de plantas que comprende la secuencia de ADN homóloga al 100 % con la secuencia SEQ ID_NO1.

En particular, ventajosamente y de acuerdo con la invención se pone en contacto con una composición de tratamiento de plantas que comprende al menos un material biológico seleccionado del grupo que consiste en:

- una bacteria de acuerdo con la invención;
- una composición líquida de acuerdo con la invención;
- una composición sólida de acuerdo con la invención;
- una composición acelular de acuerdo con la invención.

La invención se refiere también a una bacteria, una cepa bacteriana, una composición bacteriana (líquida o sólida) y una composición acelular caracterizadas en combinación por la totalidad o parte de las características mencionadas anteriormente o a continuación.

Otros objetos, características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la lectura de la siguiente descripción detallada, en la cual se proporcionan ejemplos ilustrativos a modo de ejemplo con las figuras adjuntas, en las cuales:

- La Figura 1 es una reproducción de fotografías comparativas (1a y 1b) de hojas de vid que muestran el efecto protector/curativo frente a *Botrytis cinerae* tratadas con una composición de tratamiento de acuerdo con la invención.
- La Figura 2 es una reproducción de una fotografía de una placa de Petri que muestra la inhibición de las bacterias de acuerdo con la invención del crecimiento de *Phaeomonella chlamydospora*.
- La Figura 3 es una reproducción de una fotografía ilustrativa de la solubilización del fosfato de calcio por las bacterias de acuerdo con la invención.
- La Figura 4 es una reproducción de una fotografía ilustrativa de la estimulación del crecimiento de una planta de girasol por el tratamiento de semillas de girasol con una composición líquida de acuerdo con la invención.
- La Figura 5 es una reproducción de una fotografía ilustrativa de la estimulación del crecimiento de una planta de maíz mediante el tratamiento de semillas de maíz con una composición líquida de acuerdo con la invención.
- Las Figuras 6a y 6b son reproducciones de fotografías ilustrativas de la estimulación del crecimiento de las raíces de las plántulas de colza con una composición líquida que comprende bacterias de acuerdo con la invención.

La cepa bacteriana de la invención fue aislada de una muestra de la rizosfera y de las raíces profundas de una vid. Esta muestra de la rizosfera se recoge a una profundidad de entre 10 cm y 50 cm por debajo de la superficie del suelo y se elimina la parte superficial de la muestra, luego se coloca en una bolsa estéril cerrada herméticamente y se conserva a + 4 °C antes del aislamiento de cepas de *Streptomyces*.

La muestra recogida se suspende en agua destilada y estéril a razón de 4 g de muestra en 36 ml de agua bajo agitación magnética a una velocidad de 200 revoluciones por minuto durante 30 minutos. La suspensión obtenida se coloca entonces a una temperatura de 50 °C durante 10 min y después se diluye ($\times 10^7$) en agua destilada estéril. Se extienden 0,1 ml de esta dilución sobre una placa de Petri que contiene medio de cultivo de agar sólido SEA ("Agar de Extracto de Suelo") suplementado con ácido nalidíxico (10 mg/l) o novobiocina (25 mg/l) como un antibiótico y/o antifúngico con cicloheximida (40 mg/L). Las placas de Petri se colocan a continuación en las incubadoras a 30 °C durante 21 días.

Las cepas de actinomicetos se aíslan mediante siembra, se observan al microscopio óptico y se reconocen sus características morfológicas. Las cepas de actinomicetos así aisladas y puras se transfieren al medio Bennett para la clonación. Las colonias aisladas se mantienen a 4 °C durante dos meses, se recogen y se suspenden en glicerol estéril al 20 % y luego se colocan y se almacenan a -20 °C.

Secuenciación del ADNr 16S de las bacterias de acuerdo con la invención

Se analiza la secuencia del ADNr 16S de las bacterias por métodos conocidos para un experto en la técnica. Para ello, las bacterias se cultivaron de acuerdo con la invención en un medio líquido, después se extrae su ADN genómico y se amplifica selectivamente la secuencia de ADNr 16S por PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) usando:

- Un cebador universal "27F" de la secuencia SEQ ID_NO2 siguiente: "agagtttgat cctggctcag", y;
- Un cebador universal "1492r" de la secuencia SEQ ID_NO3 siguiente, "ggttacctg ttacgactt".

Para ello, las bacterias se cultivaron de acuerdo con la invención bajo agitación en 100 ml de medio líquido ISP-2 ("medio ISP 2, Proyecto Internacional de *Streptomyces* Agar de Extracto de Malta de Levadura") a 30 °C durante 5 días. Se separa el micelio y el medio de cultivo obtenido por centrifugación y el micelio se lava dos veces con agua bidestilada. Se realiza una lisis del micelio en 500 μ l de tampón de lisis (Tris-HCl 400 mM, EDTA 60 mM, NAC 150 mM, SDS 1 %, pH 8,0) durante 10 min a temperatura ambiente. A continuación, se añade al medio de lisis 150 μ l de una solución (pH 4,8) obtenida mediante la mezcla de 60 ml de acetato de potasio 5 M, 11,5 ml de ácido acético

glacial y 28,5 de agua destilada, y se agita enérgicamente. El medio de lisis obtenido se centrifuga a 10.000 g durante 1 min. Se recolecta el sobrenadante se somete a un paso más allá de la centrifugación a 10.000 g durante 1 min. Se recoge el sobrenadante y se asocia con un volumen igual de isopropanol. Después de agitar, se centrifuga a 10.000 g durante 2 min. El ADN precipitado se lava con 300 µl de alcohol etílico al 70 %, a continuación se centrifuga, se seca al aire y se disuelve en 50 µl de agua bidestilada estéril.

Se realiza la PCR con un kit (Invitrogen) y de acuerdo con un perfil térmico ("Techne Touch Gene PCR Thermal Cycler"):

- desnaturalización a 98 °C durante 3 min;
- adición de la "Taq polimerasa";
- 30 ciclos de amplificación que comprenden:
 - una fase de calentamiento a 94 °C durante 1 min, seguida de;
 - una fase de calentamiento a 52 °C durante 1 min, seguida de;
 - una fase de calentamiento a 72 °C durante 2 min, seguida de;
- etapa de extensión a 72 °C durante 10 minutos.

El producto PCR se analiza por electroforesis en gel y se visualiza usando bromuro de etidio y luz ultravioleta. La comparación de la secuencia SEQ ID_NO1 del ADNr 16S de las bacterias de acuerdo con la invención y las secuencias de referencia en las bases de datos genómicas utilizando el software "NCBI Blast" no reveló ninguna secuencia que presente más de 99 % de homología con la secuencia SEQ ID_NO1 en bases de datos genómicas.

EJEMPLO 1 - Producción de bacterias de acuerdo con la invención.

Se inocula un volumen de un inóculo de bacterias de acuerdo con la invención como las depositadas en la CNCM con el N.º I-4467 en veinte volúmenes de un medio rico. Un medio rico tal para la producción de biomasa incluye, por ejemplo, D-glucosa, extracto de levadura, fosfato dibásico de potasio (K_2HPO_4), sulfato de amonio ($(NH_4)_2SO_4$), cloruro de potasio (KCl) y glicerol con un pH de 7,2. Se mantiene el cultivo a una temperatura de 30 °C durante 5 días.

Como alternativa, es posible separar las bacterias de acuerdo con la invención y el medio de cultivo para formar una composición acelular de acuerdo con la invención, al menos sustancialmente libre de bacterias de acuerdo con la invención.

EJEMPLO 2 - Producción de esporas de acuerdo con la invención.

Se inocula un volumen de un inóculo de bacterias de la invención en veinte volúmenes de medio de esporulación. Por ejemplo, un medio de esporulación líquido se forma de D-glucosa, un extracto de levadura, peptona, carbonato de calcio ($CaCO_3$) y agua destilada con un pH de 7,2.

Se mantiene el cultivo a una temperatura de 30 °C durante 6 días. Se obtiene una composición de acuerdo con la invención que comprende esporas de acuerdo con la invención. A continuación, es posible separar las bacterias principalmente como esporas de acuerdo con la invención y el medio de cultivo por cualquier medio para la separación sólido/líquido, por ejemplo por centrifugación o por filtración.

EJEMPLO 3 - Protección frente a patógenos.

Una composición líquida que comprende bacterias de acuerdo con la invención tiene la capacidad inhibidora del crecimiento de ciertas bacterias, tales como, por ejemplo, *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis* y *Streptomyces scabies*.

La aplicación previa de las esporas de acuerdo con la invención sobre las hojas de vid permite inhibir la germinación de esporas del hongo *Botrytis cinerae* aplicada posteriormente en estas hojas de vid y su desarrollo. Esta aplicación también permite prevenir/eliminar las hojas de vid pretratadas al inicio de los síntomas (manchas marrones en las hojas y representados por un patrón gris (1) en la Figura 1b) debido a los hongos *Botrytis cinerae*. Una reproducción de fotografías de una hoja de vid pretratada (Figura 1a) y una hoja de vid no pre-tratada (Figura 1b) con una composición de esporas de la bacteria de acuerdo con la invención e infectadas con *Botrytis cinerae* se presenta en la Figura 1. La hoja de la Figura 1a no presenta los síntomas de la infección por *Botrytis cinerae* y por lo tanto está protegida frente a *Botrytis cinerae* por las esporas de la bacteria de acuerdo con la invención.

EJEMPLO 4 - Inhibición del crecimiento de un microorganismo objetivo.

Se determina y se cuantifica la actividad inhibidora del crecimiento de un microorganismo objetivo por el método de los cilindros (Bauer et al, 1996) en el que se siembran las bacterias de la cepa depositada en la CNCM en un medio

Bennett de agar sólido y se coloca el medio inoculado durante 5 días a 30 °C para formar una composición sólida de tratamiento. Se necesita una pieza cilíndrica, tal como una pieza cilíndrica de 6 mm de diámetro, de la composición sólida de tratamiento y se deposita esta pieza cilíndrica en la superficie de un medio de cultivo inoculado con un microorganismo objetivo, por ejemplo un microorganismo fitopatógeno objetivo. El medio de cultivo del organismo objetivo puede ser por ejemplo un medio PDA ("Agar de dextrosa de patata") para los hongos fitopatógenos o el medio Bennett para bacterias fitopatógenas. Se mantiene la pieza cilíndrica en la superficie del medio de cultivo inoculado con el microorganismo objetivo durante 4 horas a 4 °C para permitir la difusión de los compuestos del medio de cultivo de las bacterias de acuerdo con la invención en el medio inoculado con el microorganismo objetivo.

Se coloca el medio inoculado con el microorganismo objetivo durante 48 horas a 30 °C y luego se mide el diámetro de la zona de inhibición del crecimiento del microorganismo objetivo.

Las bacterias de acuerdo con la invención muestran actividad inhibidora del crecimiento de bacterias y/u hongos. El espectro de actividad de las bacterias de acuerdo con la invención frente al crecimiento de microorganismos se muestra en la Tabla 3 a continuación en la que el signo (-) indica que no hay actividad inhibitoria, el signo (+) corresponde a un diámetro de inhibición entre 10 mm y 15 mm, el símbolo (++) representa un diámetro de inhibición de entre 15 mm y 20 mm y el signo (+++) corresponde a un diámetro d inhibición mayor de 20 mm.

Tabla 3

Microorganismo objetivo	Actividad inhibitoria
<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>	+++
<i>Phaeomoniella aelophilum</i>	+++
<i>Fomitiporia mediterranea</i>	++
<i>Eutypa lata</i>	+++
<i>Botryosphaeria obtusa</i>	++
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	++
<i>Botrytis cinerea</i>	++
<i>Verticillium dahliae</i>	+++
<i>Fusarium culmorum</i>	+++
<i>Pythium ultimum</i>	++
<i>Micrococcus luteus</i>	+++
<i>Bacillus subtilis</i>	+++
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	-

En estas condiciones, el diámetro de la inhibición del crecimiento micelial de la cepa de *Botrytis cinerea* por la cepa de acuerdo con la invención es 28 mm, el diámetro de la inhibición del crecimiento micelial de la cepa *Fusarium culmorum* es de 30 mm y el diámetro de la inhibición del crecimiento de micelio de la cepa de *Pythium ultimum* es de 26 mm.

Las bacterias de acuerdo con la invención tienen ventajosamente capacidades inhibitorias del crecimiento de agentes fitopatógenos de la vid, tales como, *Phaeomoniella chlamydospora*, *Eutypa lata*, *Fomitiporia mediterranea* y *Botryosphaeria obtusa*.

Se visualiza en la inhibición de la Figura 2 a gran distancia del crecimiento del micelio 8 del hongo *Phaeomoniella chlamydospora* seleccionado como agente patógeno de la vid por las bacterias 2 de la cepa de acuerdo con la invención con relación a la inhibición del crecimiento del micelio 8 del agente patógeno por las cepas 3, 4 y 5 de una colección de cepas, distinta de la cepa de la invención. Se debe destacar que las cepas 7 y 8 no inhiben el crecimiento del micelio 8 del agente patógeno. Las bacterias de acuerdo con la invención pueden limitar el desarrollo de agentes fitopatógenos bacterianos o fúngicos.

EJEMPLO 5 - Fertilización

Las bacterias de acuerdo con la invención promueven la solubilización de elementos nutrientes sólidos, especialmente del fósforo, de un medio de cultivo. Los inventores han observado (Figura 3), en un medio de cultivo de agar sólido (9) opacado por un polvo de fosfato de calcio, la formación de un halo translúcido (10) que rodea las colonias (2) bacterias de acuerdo con la invención acreditando la solubilización del fosfato de calcio por bacterias. Las bacterias de acuerdo con la invención pueden aumentar la disolución, en la rizosfera de las plantas, de un producto fertilizante sólido no asimilable por dichas plantas y mejorar la nutrición de las plantas.

EJEMPLO 6 - Estimulación del crecimiento del girasol y del maíz.

Se prepara una composición líquida de acuerdo con la invención que comprende las células vegetativas y esporas de la bacteria de acuerdo la invención que se aplica por revestimiento de película sobre semillas de girasol y semillas de maíz. La composición líquida comprende entre 1 y 2 g de bacterias por litro de la composición, la masa de bacterias es la masa de bacterias húmedas. Se realiza en paralelo un sembrado de semillas y un cultivo de

plantas de girasol (Figura 4a) y de maíz (Figura 5c) como controles no tratados por una composición de acuerdo con la invención. Los inventores también han observado una estimulación del crecimiento inicial de las plantas de girasol (Figura 4b) y de las plantas de maíz (Figura 5d). Las bacterias de acuerdo con la invención tienen aplicación con las semillas que se utilizan para estimular el crecimiento de plantas, especialmente el crecimiento de las partes aéreas de las plantas, como el girasol y maíz.

EJEMPLO 7 - Estimulación del crecimiento de las raíces de las plántulas de colza.

Se prepara una composición líquida de acuerdo con la invención que comprende las células vegetativas y esporas de la bacteria de acuerdo con la invención mediante la suspensión en agua con un volumen de un precultivo de la cepa depositada en la CNCM en 60 volúmenes de agua. El pre-cultivo es un cultivo en fase de crecimiento estacionario y comprende del orden de 10 g (peso húmedo) de bacterias por litro de cultivo previo. La composición líquida se aplica de acuerdo con la invención sobre las semillas por mezcla y homogeneización de 16,4 g de semilla de colza y 490 µl de la composición líquida (es decir, del orden de 1 tonelada de semillas de colza en 30 litros de composición líquida) para formar un revestimiento de la composición líquida de acuerdo con la invención sobre las semillas de colza. La composición líquida comprende entre 1 y 2 g de bacterias por litro de la composición, en donde la masa de bacterias es la masa de bacterias húmedas. Se realiza la siembra de semillas de colza, revestidas con la composición de acuerdo con la invención en un medio de cultivo "Pikaw". Después de 8 días de crecimiento de las plántulas, se recogieron y se pesaron partes de la raíz de 12 plántulas obtenidas a partir de semillas tratadas con la composición de acuerdo con la invención. La masa de las partes de la raíz de las plántulas de colza obtenidas a partir de semillas tratadas con la composición de acuerdo con la invención es de 85 mg y es mayor que el peso (59 mg) de las porciones de raíz de 12 plántulas de colza obtenidas a partir de semillas tratadas con una composición libre de bacterias de acuerdo con la invención como control. Las reproducciones de fotografías de plántulas de colza tratadas y no tratadas se muestran en la Figura 6a y la Figura 6b, respectivamente, y muestran un aumento del crecimiento de las porciones de raíz 12 de plántulas de colza tratadas con la composición de acuerdo con la invención en comparación con las partes de la raíz de 11 de plántulas de colza tratadas con una composición libre de bacterias de acuerdo con la invención como control. La composición líquida comprende bacterias de acuerdo con la invención como las depositadas en la CNCM las cuales estimulan la germinación y crecimiento de las plántulas de colza.

LISTADO DE SECUENCIAS

SEQ ID_NO1

ES 2 676 460 T3

tagtggcgaa cgggtgagta acacgtgggc aatctgccct gcactctggg acaagccctg 60
 gaaacggggt ctaataccgg atatgacacg ctcccgcatg ggatgcgtgt ggaaagctcc 120
 ggcgggtgcag gatgagcccg cggcctatca gcttgttggg ggggtgatgg cctaccaagg 180
 cgacgacggg tagccggcct gagagggcga cgggccacac tgggactgag acacggccca 240
 gactcctacg ggaggcagca gtggggaata ttgcacaatg ggcgaaagcc tgatgcagcg 300
 acgccgcgtg agggatgacg gccttcgggt tgtaaacctc ttacagcagg gaagaagcga 360
 gagtgcaggt acctgcagaa gaagcggcgg ctaactacgt gccagcagcc gcggtataac 420
 gtggggcgca agcgttctcc ggaattattg ggcgtaaaga gctcgtaggc ggcttctcgc 480
 gtccgatgtg aaagcccggg gcttaacccc gggctcgtat tcgatacggg caggctagag 540
 ttccgtaggg gagatcgga ttccctgggt agcgggtgaa tgcgcagata tcaggaggaa 600
 caccggtggc gaaggcggat ctctgggccc atactgacgc tgaggagcga aagcgtgggg 660
 agcgaacagg attagatacc ctggtagtc acgccgtaaa cgttgggaac taggtgtggg 720
 cgacattcca cgtcgtccgc gccgcagcta acgcattaag ttccccgcct ggggagtagc 780
 gccgcaaggc taaaactcaa aggaattgac gggggggccc cacaagcggc ggagcatgtg 840
 gcttaattcg acgcaacgcg aagaacctta ccaagccttg acatacccc ggaaacctct 900
 ggagacaggg gcccccttg tggtcgggtg acagggtgtg catggcttgt cgtcagctcg 960
 tctcgtgaga tgttgggtta agtccccgca acgagcgcaa ccttgttct gtgttgcag 1020
 catgcccttc gggggntgat ggggacttnc acaggagact gccgggggtca actcggagga 1080
 aggtggggac gacgtcaagt catcatgccc ctatgtctt gggctgcaca cgtgctacaa 1140
 tggccggtac aatgagctgc gaagccgtga ggtggagcga atctcaaaaa gccggtctca 1200
 gtccggattg gggctgcaa ctgacccca tgaagtcgga gtcgctagta atcgagatc 1260
 agcattgctg cgggtgaatac gttcccgggc ctgtacaca ccgcccgta cgtcacgaaa 1320
 gtcggttaaca cctgaa 1336

SEQ ID_NO2
 agagttgat cctggctcag 20

SEQ ID_NO3
 ggttacctg ttacgactt 19

SEQ ID_NO4

ES 2 676 460 T3

ttggccgcct cgcgcaacgc ctgcactgcc aatacgaaca atggcgccag caccgccccg 60
 ctgcgcactc cctttcgaa gatcaggag cctctcagg ttccgaacct cctcgcgtg 120
 cagaccgaga gcttcgattg gctgctcggc aatgccgcct ggaaggctcg cgtcagggt 180
 gcgctggaca gcggtcagga cgtccccacc aagtcgggtc tggaagagat cttcgaggag 240
 atctccccga tcgaggactt ctccgggtcg atgtccctga ctttcctga tcaccgtttc 300
 gagccgccga agaactcgat cgacgagtgc aaggagcgtg acttcaccta cgccgtccg 360
 ctcttcgtca cggccgagtt caccaacaac gagaccggcg agatcaagtc ccagacggtc 420
 ttcatgggcg acttcccgt catgaccgac aagggcacct tctgcatcaa cggcaccgag 480
 cgtgtcgtcg tctcgcagct ggctcgtcg ccgggtgtct acttcgactc ctccatcgac 540
 aagacgtccg acaaggacat cttctcgtc aaggtcatcc cgtcccgggg tgcctggctg 600
 gagatggaga tcgacaagcg tgacatggtc ggtgtgcgta tcgaccgcaa gcgcaagcag 660
 tccgtcaccg ttctctgaa ggctctcggc tgacgaccg agcagatcct ggaggagttc 720
 ggcgagtacg agtcgatcg cgccaccctg gagaaggacc acaccaggg ccaggacgac 780
 gcgctgctcg acatctaccg caagctgcgt ccgggcgagc cccccacag ggaggcccg 840
 cagacgtcgc tcgagaacct ctacttcaac ccgaagcgt acgacctcgc gaaggctggc 900
 cgctacaagg tcaacaagaa gctgggttcg gccgtctcgc tggacgcggg cgtcctgacg 960
 gtcgaggacg tcatgcctc gatcaagtac ctggtgaagc tgcacgccgg tgagaccgag 1020
 accgtcgggg acaacggcca gtccgtggtc gtcgagaccg acgacatcga ccacttcggc 1080
 aaccgccgta tccgtaacct cggcgagctg atccagaacc aggtccgcac gggtctggcc 1140
 cgtatggagc gcgtcgtcgc tgagcgcag acgactcagg acgtcagggc gatcacgccg 1200
 cagacctga tcaacatccg gccggtcgtc gcctccatca aggagtctt cggcaccagc 1260
 cagctgtcgc agttcatgga ccagacgaac ccgtgtcgg gtctgacca caagcgcct 1320
 ctgaacgcgc tcggccccgg tggctctcc cgtgagcggg cgggcttcga ggtccgtgac 1380
 gtgcaccgt cgcactacgg ccgcatgtgc ccgatcgaga cggccgaagg cccgaacatc 1440
 ggtctgatcg gctcgtcgc ctctacggc cgggtcaacg cgttcggtt catcgagacc 1500
 ccgtaccgca aggtcgtcga cgggtcgtc accgacgacg tcgactacct gacggccgat 1560
 gaagaggacc gcttcgtcat cgcgcaggcc aacgccccgc tcgaggacga cctgcgttc 1620
 gccgagaacc gcgtcctggt ccgccgccgt ggccggcagg tcgactacat ccccggcgac 1680
 gacgtcgact acatggacgt ctaccgcgc cagatggtgt cggtcgcgac cgcgatgatc 1740

ES 2 676 460 T3

cccctcctcg agcacgacga cgccaaccgc ggcctcatgg gctcgaacat gatgcgccag 1800
 gccgtgccgc tgatcaaggc ggagtcctcg ctggtcggca ccggcatgga gtaccgctgt 1860
 gcggtcgacg ccggcgacgt catcaaggcc gagaaggacg gtgtcgtcca ggaggtctcc 1920
 gccgactacg tgacggtggc caacgacgac ggcaactaca ccacctaccg ggtggccaag 1980
 ttctcccgct ccaaccaggc cactccttc aaccagaagg tcgtcgtgga cgaggggtgcg 2040
 cgggtgatcg ccggccaggc gctggccgac ggcccgtcca ccgaggacgg cgagatggcg 2100
 ctgccaaga accctctggt gggttcctg ccgtgggagg gccacaacta cgaggacggc 2160
 atcatcctca gccagcgtct ggtgcaggac gacgtcctct cctcgatcca catcgaggag 2220
 cacgaggtcg atgcccgtga caccaagctc ggccccgagg agatcacccg ggacatcccc 2280
 aacgtctccg aggaggtcct cggcgacctc gacgagcgcg gcatcatccg gatcggtgcc 2340
 gaggtcgtcg ccggcgacat cctggtcggc aaggtcacc cgaaggcgga gaccgagctg 2400
 accccggagg agcggctgct gcgcgcgac ttcggtgaga agggccgtga ggtccgtgac 2460
 acctcgctga aggtgccgca cggtgagatc ggcaaggta tcggcgctcg cgtcttcgac 2520
 cgcaagagg gcgacgaact gccggcgggc gtgaaccagc tggtcgcgt ctacgtggcg 2580
 cagaagcgca agatcacga tggtgacaag ctgcggggc gtcacggcaa caaggcgctc 2640
 atctcaaga tctgcccgt cgaggacatg ccgttcctgg aggacggcac cccggtcgac 2700
 atcatcctca acccgtggg tgtccgtcc cgaatgaacc cgggacaggc cctggagatc 2760
 cactgggct ggctggcctc ccgcggctgg aaggtcagg gctccaggga ctggatgcag 2820
 cggctccagg ccatcggcgc cgacgaggtc gagcccgga ccaacgtcgc gaccccgctc 2880
 ttgacggcg cccgcgagga cgagatgcc ggtctcttc actcgacgat cccgaaccgc 2940
 gacggcgacc gcctggtcca gtcgtccggc aagggccggc tcttcgacgg ccgtccggc 3000
 gagccgttc cgagccgat ctcggtcggc tacatgtaca tctcaagct gcaccacctg 3060
 gtggacgaca agctgcacgc ccggtccacc ggtccglact cgatgatcac ccagcagccg 3120
 ctgggtgta aggtcagtt cgggtggccag cgttcggtg agatggagg gtgggcgctg 3180
 gaggttatg gcgcgcgta cgcctccag gagctgctga ccatcaagtc cgacgacgtg 3240
 accggccgcg tgaaggcta cgaggccatc gtcaaggcg agaacttcc cgagcccgcg 3300
 atccccgagt cctcaaggt gctcatcaag gagatgcagt ccctgtgcct caacgtggag 3360
 gtctgtcgt ccgacggcat gtccatcgag atgcgcgaca ccgacagga cgtcttcgc 3420
 gctcggagg agctcggat cgacctgtc cggcgcgagc cgagcagcgt cgaagaggtc 3480
 tga 3483

SEQ ID_NO5

ES 2 676 460 T3

gtgctgtgcc agaaagggcg ctctgtggcc gattccggca accccatcga aaacatcccg 60
 tccacgcccc acgacgagcg cctggctccg ccgtctacg acgccagtgc gattaccgtc 120
 ctggaagggc tggaggcggc ccgaagcga cccggtatgt acatcgggtc caccggtgag 180
 cgcggcctgc accatctcgt ccaagaggtc gtcgacaact ccgtcgacga ggccatggcc 240
 ggtcacgcgg acagcatcga ggtcacgac ctcgccgacg gcggcgctccg cgctgtggac 300
 aacggccgcg ggaatcccggt gggcatcgtc ccctcggagg ggaagccggc tgtggaggtc 360
 gtgctgaccg tctgcacgc gggcggcaag ttcggcggcg gcggctacgc cgctccggc 420
 ggtctgcacg gcgtcggcgt ctccgtcgtc aacgcctgt cctcgaaggt gtcggtcgag 480
 gtcaagacgg acggctaccg ctggaccag gactacaaga cgggagcgcc gaccgcgcc 540
 ctggcccgga acgaggccac ggaggagacc ggcaccacgg tcacctctg ggcggaccg 600
 gacgtcttcg agaccaccga gtactcctc gagacgttg cccggcgctt ccaggagatg 660
 gcgttctca acaagggcct gtcgatctc ctaaggacg agcgcgagge ccatgtggac 720
 gaggagggca agccgctctc cgtgaagtac cactacgagg gcggcatcgt cgacttcgtg 780
 acctacctca actcccgaa gggcgagctg gtccaccca cggtgatcgg gttcgaggcc 840
 gaggacaagg agcggatgct ctccctcgag atcgcgatgc agtggaaac ccagtacacc 900
 gagggtgtct acagcttcg gaacaccatc cacaccatg agggcggcac ccacgaggag 960
 ggcttccgcg ccgcgtgac gtacctgac aacaagtac gcgcgcgaca gaagctgctc 1020
 cgggagcgtg acgacaacct caccggtgag gacatccgag agggcctgac cgccatcatc 1080
 tcggtcaagc tgggcgagcc gcagtccgag ggccagacca agaccaagct gggcaacacg 1140
 gaggccaaga cttctgtcca gaagatcgtc aacgagcatc tcgccgactg gctggaccgt 1200
 aacctaatg aggcggcgga catcgtccg aaggggatcc aggcggcgac ggcccgggc 1260
 gcggcccgta aggcgcggga tctgaccgc cgtaaggggc tctggagac cgcgtcgtg 1320
 ccgggcaagc tgagcgactg ccagtcgaat gaccgctga agtgcgagat ctctatcgtc 1380
 gagggtgact ccgcggcgcg ctggccaag tccggcgta accgcagta tcaggcgatc 1440
 ctcccgatcc gcggcaagat cctcaacgtg gagaaggccc ggtcgacaa gatcctgcag 1500
 aacaacgagg tccaggcgt gatctccgc ttcggcaccg ggtgcacga ggacttcgac 1560
 atcgccaagc tccgtatca caagatcatt ctgatggcg acgccgatgt cgacggccag 1620
 cacatcaaca cctgtctgt gacctctc ttcgcttca tgcggcgct ggtcgaggcg 1680
 gggcatgtct tctctccc tccgcgctc tacaagatca agtggggcg ggacgacttc 1740
 gagtacgct actcggaccg ggagcgggac gcgtgatcc aggtcggcg tgaacaggcg 1800
 aagcgcatca gggacgact ggtccagcg tcaagggtc tggcgagat gaacgccgaa 1860
 gagctgcggg tcaccagat ggacccgac caccgcgtc tggccaggt caccctggac 1920
 gacgcggcg agggcgaca cctgttctg gtctgatgg gtgaggacgt cgaggcacgg 1980
 cgctcttca tccagcgaa cgccaaggat gtccgcttc tcgacatctg a 2031

ES 2 676 460 T3

SEQ ID_NO6

ggcgatcggc cgaacgagcc ggtcgaggtc atccccaccg ggtcgaccgc tctcgacgtc 60
gccctcggcg tcggcgggtct gccgcgcggc cgggtgggtcg aggtctacgg ccccgagtcc 120
tccggttaaga cgacctgac cctgcacgcg gtggccaatg cccagcgggc cggcgggcacc 180
gttgccttcg tggacgccga gcacgccctc gacctgact acgcgcagaa gctgggcgtg 240
gacaccgact cctgatacct gtcccagccg gacaacggcg agcaggcgct cgagatcgtg 300
gacatgctgg tccgtccgg cgcctcgac ctcatcgta tcatcctg cgcgcctg 360
gtgccgcgcg cggagatcga gggcgagatg ggcgactccc acgtcggcct ccaggccggg 420
ctgatgagcc aggcgtccg taagatcac agcgcgtca accagtcaa gaccaccgcg 480
atcttcata accagctccg cgagaagatc ggcgtgatgt tcggctcgc ggagaccacg 540
accggtggcc gggcgctgaa gttctacgcg tcggtgcga tcgacatccg ccgcatcgag 600
acctcaagg acggcaccga cgcggtcggc aaccgcacc gcgtcaaggt cgtcaagaac 660
aaggtcgcgc cgccttcaa gcaggccgag ttcgacatcc tctacggcca gggcatcagc 720
cgtgaggcg gttctgatcga catgggcgtc gagcacggct tcgtccgcaa gtccgggtgc 780
tggtaacct acgagggcga ccagctcggc cagggcaagg agaacgccc caacttcctg 840
aaggacaacc ccgatctcgc caatgagatc gagaagaaga tcaaggaaaa gctcggcatc 900
ggggtgaggc cccaggaccc ggcggccgcg gcaccacca cggacgcggc tggcgccgcg 960
ggcgtgaccg acgccgcacc ggccaaggcc 990

5

SEQ ID_NO7

gtgcccagcg ccgagggcta ttccggcgcc ttccggcgga agttcatccc cgaggcgtc 60
gtcgccggcg tcgacgaggt cgcggccgag tacgagaagg ccaagacgga cccgccttc 120
gcggccgagc tcgaggatct gctggtaac tacaccggcc ggcccagtgc gctgaccgag 180
gtcgggcggt tcgccgagca cgcggggggc gccgggtct tctcaagcg ggaggacctc 240
aaccacaccg gctcccaca gatcaacaat gtgctggggc aggcctgct caccaagcgc 300
atgggcaagt cccgggtcat cgcgagacc ggcggcggtc agcacggcgt ggccacggcc 360

10

15

20

25

ES 2 676 460 T3

accgcatgtg cgctgttcgg gctcgaatgc accatctaca tgggcgaggt cgacacccag 420
 cggcaggcgc tcaatgtggc ggggatgcgg atgctgggcg ccgaggtcat ctccgtgacc 480
 tccggcagcc gcacctgaa ggacgccatc aacgaggcgt tccgggactg ggtcgccaat 540
 gtggaccgca cccactacct ctteggtagc gtggccggcc cccacccctt cccggcgtg 600
 gtgcgcgact tccaccgggt gatcggcgtg gaggcgccgc ggcagatcct ggagcggacc 660
 gggcggcgtc cggacgcggg cgggcctgt gtggcgccgc gatccaacgc gatcgggctg 720
 ttccacgcct tctgccgga cgagagcgtg cgcctcgtc gcttcgagcc cggcggacac 780
 ggtgtggaga ccggggagca cgcggccacg ctgagccagg gcgagcccgg gatcctgcac 840
 ggctcccgtt cgttcgtgct ccaggacgag gacggccaga tcaccgagcc gtactcgatc 900
 tcggccggtc tcgactaccc cggcgtcggg ccggagcacg cgtatctgaa ggacatcggc 960
 cgtgccgagt accgggcggg caccgacgac gaggcgatgc gggcgctgcg gctgctctcg 1020
 gagaccgagg gcatcatccc ggcgatcgag agcggccacg cgctggcggg cggcctggac 1080
 ctggccgtg agctggggag cgacggcctg gtgctggta acctctccgg gcgcggcgac 1140
 aaggacatgg acacggcggc tcgtacttc gggctctacg accagcagag cgaccagga 1200
 gcgaagtga 1209

SEQ ID_NO8

gtggcctccg gccgcgtgc ggggtcatc gggccggtc tcgacgtgga gttcccgtc 60
 gacgcgatgc cggagatcta caacgcgtg caggtcagg tcggcagccc ctcccaggag 120
 ggggcgaaga agacctgac cctcgaggc gcccagcacc tcggcgaggg cctggtccgc 180
 gccatctcca tggagcccac cgacggcctg gtccgccagg ccgcggtgac cgacaccggc 240
 gacggcatca cgggtccggg cggcgatgc accaagggcc ggggtgtcaa caccctcggc 300
 aagatcctca acgagcccga ggccgagtc gaggtcaccg agcgtggtc catccaccgc 360
 aaggccccgg ccttcgacca gtcgagtc aagaccgaga tgttcgagac cggcctgaag 420
 gtcgtcgacc tgctgacccc gtacgtcaag ggcggcaaga tcggtctgtt cggcggcgcg 480
 ggcgtcggca agaccgtgct catccaggaa atgatcatgc gtgtggccaa gctgcacgag 540
 ggcgtttccg tgttcgccg gtgcggcgag cgcaccgtg agggcaacga cctgatcgag 600
 gagatggccg agtcggcgt gtcgccgag accgcgtgg tcttcggcca gatgatgag 660
 ccccgggga cccgtctgc cgtgccctg gccggtctga ccatggcgga gtacttcgc 720
 gatgtgcaga agcaggacgt gctgttctc atcgacaaca tcttcgctt caccagggc 780
 ggttcgagg tctcgacct gtcggccgg atgccctcg cgggtgggta ccagccgaac 840

5

10

15

ES 2 676 460 T3

```

ctggccgacg agatgggcat cctgcaggag cgcatacct cgacccgtgg tcaactgac 900
acctcgatgc aggcgatcta cgtccccgcg gacgacctga ccgacccggc cccggcgacc 960
accttcgcgc acctcgacgc gaccacgggtg ctctcccggc cgatctcgga gaagggcac 1020
taccggcgcg tggaccgct ggactcgacg tcccgatcc tggaccgcg ctacatctcg 1080
caggagcact acgactgcgc ctgcgcgtg aagtcgatcc tgcagaagta caaggacac 1140
caggacatca tcaacatctt gggcatcgac gagctcggcg aggaggacaa gctcacctc 1200
ttccgcgcc gccggatcga gcgttctctg tcgcagaaca cccacgcggc gaagcagtc 1260
accggcctcg acggatcgga tgtccgctg gacgagtcca tcgcccggt caacgcgatc 1320
gccgatgggtg agttcgacca ctccccgag caggcggtct tcatgtgcgg tggcctggac 1380
gacctcaagg ccaaggccaa ggagctgggc gtctctga 1419

```

LISTADO DE SECUENCIAS

```

5  <110> AGRONUTRICION
    <120> NUEVA CEPA DE STREPTOMYCES
    <150> FR1359186
10  <151> 24-09-2013
    <160> 8
    <170> BiSSAP 1.0
15  <210> 1
    <211> 1336
    <212> ADN
    <213> Streptomyces
20  <220>
    <221> fuente
    <222> 1..1336
    <223> /tipo_mol="ADN" /organismo="Streptomyces"
25  <400> 1

```

30

35

40

45

ES 2 676 460 T3

```

tagtggcgaa cgggtgagta acacgtgggc aatctgccct gcactctggg acaagccctg      60
gaaacgggggt ctaataaccgg atatgacacg ctcccgcatg ggatgcgtgt ggaaagctcc      120
ggcgggtgcag gatgagcccc cggcctatca gcttgttggt ggggtgatgg cctaccaagg      180
cgacgacggg tagccggcct gagagggcga ccggccacac tgggactgag acacggccca      240
gactcctacg ggaggcagca gtggggaata ttgcacaatg ggcgaaagcc tgatgcagcg      300
acgccgcgtg agggatgacg gccttcgggt tgtaaacctc ttccagcagg gaagaagcga      360
gagtgcagggt acctgcagaa gaagcgccgg ctaactacgt gccagcagcc gcggtaatac      420
gtagggcgca agcgttgtcc ggaattattg ggcgtaaaga gctcgtaggc ggcttgctgc      480
gtcgggatgtg aaagcccggg gcttaacccc gggctctgcat tcgatacggg caggctagag      540
ttcggtaggg gagatcggaa ttcttggtgt agcggtgaaa tgcgcagata tcaggaggaa      600
caccggtggc gaaggcggat ctctgggccg atactgacgc tgaggagcga aagcgtgggg      660
agcgaacagg attagatacc ctggtagtcc acgccgtaaa cgttgggaac taggtgtggg      720
cgacattcca cgtcgtccgc gccgcagcta acgcattaag ttccccgcct ggggagtacg      780
gccgcaaggc taaaactcaa aggaattgac gggggggccc cacaagcggc ggagcatgtg      840
gcttaattcg acgcaacgcg aagaacctta ccaaggcttg acataacccc ggaaacctct      900
ggagacaggg gcccccttg tggtcggtgt acagggtgtg catggcttgt cgtcagctcg      960
tgtcgtgaga tgttgggtta agtccccgca acgagcgcaa cccttgttct gtgttgccag     1020
catgcctttc gggggntgat ggggacttnc acaggagact gccggggtca actcggagga     1080
aggtggggac gacgtcaagt catcatgccc cttatgtctt gggctgcaca cgtgctacaa     1140
tggccggtac aatgagctgc gaagccgtga ggtggagcga atctcaaaaa gccggtctca     1200
gttcggattg gggctctgaa ctcgacccca tgaagtcgga gtcgctagta atcgcagatc     1260
agcattgctg cgtgaatac gttcccgggc cttgtacaca ccgcccgtca cgtcacgaaa     1320
gtcggtaaca cctgaa                                     1336

```

5 <210> 2
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Streptomyces

10 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..20
 <223> /tipo_mol="ADN" /organismo="Streptomyces"

15 <400> 2
 agagttgat cctggctcag 20

<210> 3
 <211> 19
 20 <212> ADN

```

<213> Streptomyces

<220>
<221> fuente
5 <222> 1..19
  <223> /tipo_mol="ADN" /nota="Cebador 1429r" /organismo="Streptomyces"

<400> 3
10  gggtaccttg ttacgactt      19

<210> 4
<211> 3483
<212> ADN
<213> Streptomyces
15

<220>
<221> fuente
<222> 1..3483
20 <223> /tipo_mol="ADN" /organismo="Streptomyces" /plásmido="rpoB"

<400> 4
  ttggccgcct cgcgcaacgc ctcgactgcc aatacgaaca atggcgccag caccgccccg      60
  ctgcgcatct cctttgcgaa gatcagggag cctctcgagg ttccgaacct cctcgcgctg      120
  cagaccgaga gcttcgattg gctgctcggc aatgccgcct ggaaggctcg cgtcgaggct      180
  gcgctggaca gcggtcagga cgtccccacc aagtccggtc tggaagagat cttcgaggag      240
  atctccccga tcgaggactt ctccgggtcg atgtccctga ctttccgtga tcaccgtttc      300

25

30

35

40

45

50

55

```

ES 2 676 460 T3

gagccgccga	agaactcgat	cgacgagtg	aaggagcgtg	acttcaccta	cgccgctccg	360
ctcttcgtca	cggccgagtt	caccaacaac	gagaccggcg	agatcaagtc	ccagacggtc	420
ttcatggg	acttcccgt	catgaccgac	aagggcacct	tctgcatcaa	cggcaccgag	480
cgtgtcgtcg	tctcgcagct	ggtccgctcg	ccgggtgtct	acttcgactc	ctccatcgac	540
aagacgtccg	acaaggacat	cttctccgtc	aaggtcatcc	cgtcccgggg	tgcttggtg	600
gagatggaga	tcgacaagcg	tgacatggtc	ggtgtgcgta	tcgaccgcaa	gcgcaagcag	660
tccgtcaccg	ttctcctgaa	ggctctcggc	tggacgaccg	agcagatcct	ggaggagttc	720
ggcgagtacg	agtcgatg	cgccaccctg	gagaaggacc	acaccaggg	ccaggacgac	780
gcgctgctcg	acatctaccg	caagctgcgt	ccgggcgagc	cccccacacg	ggaggccg	840
cagacgctgc	tcgagaacct	ctacttcaac	ccgaagcgt	acgacctcgc	gaaggtcggc	900
cgtacaagg	tcaacaagaa	gctgggttcg	gccgctccgc	tggacgcggg	cgtcctgacg	960
gtcgaggacg	tcatcgctc	gatcaagtac	ctggtgaagc	tgacgcggg	tgagaccgag	1020
accgtcgggg	acaacggcca	gtccgtggtc	gtcgagaccg	acgacatcga	ccacttcggc	1080
aaccgccgta	tccgtaacgt	cggcgagctg	atccagaacc	aggtccgcac	gggtctggcc	1140
cgtatggagc	gcgtcgtg	tgagcgc	acgactcagg	acgtcgaggc	gatcacgccg	1200
cagaccctga	tcaacatccg	gccggtcgtc	gcctccatca	aggagtctct	cggcaccagc	1260
cagctgtcgc	agttcatgga	ccagacgaac	ccgctgtcgg	gtctgacca	caagcgccgt	1320
ctgaacgcgc	tcggccccgg	tggtctctcc	cgtgagcggg	cgggcttcga	ggtccgtgac	1380
gtgcacccgt	cgactacgg	ccgcatgtgc	ccgatcgaga	cggccgaagg	cccgaacatc	1440
ggtctgatcg	gctcgtcgc	ctcgtacggc	cgggtcaacg	cgttcggttt	catcgagacc	1500
ccgtaccgca	aggtcgtcga	cgggtgtcgc	accgacgacg	tcgactacct	gacggccgat	1560
gaagaggacc	gcttcgtcat	cgcgaggcc	aacgccccgc	tcgcgacga	cctgcgcttc	1620
gccgagaacc	gcgtcctgg	ccgccgccgt	ggcggcgagg	tcgactacat	ccccggcgac	1680
gacgtcgact	acatggacgt	ctcaccgcgc	cagatggtgt	cggtcgcgac	cgcgatgatc	1740
cccttcctcg	agcacgacga	cgccaaccgc	gcgctcatgg	gctcgaacat	gatgcgccag	1800
gccgtgccgc	tgatcaaggc	ggagtccccg	ctggtcggca	ccggcatgga	gtaccgctgt	1860
gcggtcgacg	ccggcgacgt	catcaaggcc	gagaaggacg	gtgtcgtcca	ggaggtctcc	1920
gccgactacg	tgacggtggc	caacgacgac	ggcacctaca	ccacctaccg	ggtggccaag	1980
ttctcccgt	ccaaccaggg	cacctcttc	aaccagaagg	tcgtcgtgga	cgaggggtgcg	2040
cgggtgatcg	ccggccaggt	gctggccgac	ggccccgtcca	ccgaggacgg	cgagatggcg	2100
ctcggcaaga	acctcctgg	ggcggtcatg	ccgtgggagg	gccacaacta	cgaggacgcg	2160
atcatcctca	gccagcgtct	ggtgcaggac	gacgtcctct	cctcgatcca	catcgaggag	2220

cacgaggtcg atgcccgtag caccaagctc ggccccgagg agatcaccgc ggacatcccg 2280
aacgtctccg aggaggtcct cggcgacctc gacgagcgcg gcatcatccg gatcgggtgcc 2340
gaggtcgtcg ccggcgacat cctgggtcggc aaggtcaccc cgaaggcgga gaccgagctg 2400
accccgagg agcggctgct gcgcgcgata ttccggtgaga agggccgtga ggtccgtgac 2460
acctcgctga aggtgccgca cggtagagatc ggcaagggtca tcggcggtccg cgtcttcgac 2520
cgcaagagg gcgacgaact gccgcggggc gtgaaccagc tgggtccgcgt ctacgtggcg 2580
cagaagcgca agatcaccga tggtagacaag ctgcggggcc gtcacggcaa caaggcgctc 2640
atctccaaga tcctgccggt cgaggacatg ccgttcctgg aggacggcac ccggttcgac 2700
atcatcctca acccgctggg tgtcccgctc cgaatgaacc cgggacaggt cctggagatc 2760
cacctgggct ggctggcctc ccgcggctgg aaggtcgagg gctccgagga ctggatgcag 2820
cgggtccagg ccatcggcgc cgacgaggtc gagccccgca ccaacgtcgc gaccccggtc 2880
ttcgacggcg ccgcgagga cgagatcgcc ggtctcttcg actcgacgat ccgaaccgc 2940
gacggcgacc gcctgggtcca gtcgtccggc aaggccccgc tcttcgacgg ccgctccggc 3000
gagccgttcc cggagccgat ctccgtcggc tacatgtaca tcctcaagct gcaccacctg 3060
gtggacgaca agctgcacgc ccggtccacc ggtccgtact cgatgatcac ccagcagccg 3120
ctgggtggtg aggtcagtt cggtagccag cgcttcggtg agatggaggt gtgggcgctg 3180
gaggcttatg gcgcccgcta cgccctccag gagctgctga ccatcaagtc cgacgacgtg 3240
accggccgcg tgaagggtcta cgaggccatc gtcaaggcg agaacattcc cgagccccgc 3300
atccccgagt ctttcaaggt gtcatacaag gagatgcagt ccctgtgcct caacgtggag 3360
gtgctgtcgt ccgacggcat gtccatcgag atgcgcgaca ccgacgagga cgtcttcgcg 3420
gctgcggagg agctcggtat cgacctgtcc cggcgcgagc cgagcagcgt cgaagaggtc 3480
tga 3483

<210> 5

<211> 2031

5 <212> ADN

<213> Streptomyces

<220>

<221> fuente

10 <222> 1..2031

<223> /tipo_mol="ADN" /nota="gyr B" /organismo="Streptomyces"

<400> 5

gtgctgtgcc agaaagggcg cttcgtggcc gattccggca accccatcga aaacatcccg 60

15 tccacgcccc acgacgaggc cctgggtccg ccgtcgtacg acgccagtgc gattaccgtc 120

ES 2 676 460 T3

ctggaagggc	tggaggcggt	ccgcaagcga	cccggatatgt	acatcggttc	caccgggtgag	180
cgcggcctgc	accatctcgt	ccaagaggtc	gtcgacaact	ccgtcgacga	ggccatggcc	240
ggtcacgcgg	acagcatcga	ggtcacgata	ctcgccgacg	gcggcggtccg	cgctcgtggac	300
aacggcccg	ggatcccgg	gggcatcgtc	ccctcgagg	ggaagccggc	tgtggaggtc	360
gtgctgaccg	tgctgcacgc	gggcggaag	ttcgggcg	gcggctacgc	cgctctccggc	420
ggctctgcacg	gcgtcgcggt	ctccgtcgtc	aacgccctgt	cctcgaagg	gtcggtcgag	480
gtcaagacgg	acggctaccg	ctggacccag	gactacaaga	cgggagcgcc	gaccgcgccc	540
ctggcccga	acgaggccac	ggaggagacc	ggcaccacgg	tcaccttctg	ggcggacccg	600
gacgtcttcg	agaccaccga	gtactccttc	gagacgctgg	cccggcgctt	ccaggagatg	660
gcgttcctca	acaagggcct	gtcgatctcg	ctcaaggacg	agcgcgaggc	ccatgtggac	720
gaggagggca	agccgctctc	cgtgaagtac	cactacgagg	gcggcatcgt	cgacttcgtg	780
acctacctca	actcccga	gggcgagctg	gtccaccca	cggtgatcgg	gttcgaggcc	840
gaggacaagg	agcggatgct	ctccctcgag	atcgcgatgc	agtggaacac	ccagtacacc	900
gaggggtgtct	acagcttcgc	gaacaccatc	cacacccatg	agggcggcac	ccacgaggag	960
ggcttcgcg	ccgcgctgac	gtacctgata	aacaagtacg	cgcgcgacaa	gaagctgctc	1020
cgggagcggtg	acgacaacct	caccgggtgag	gacatccgcg	agggcctgac	cgccatcatc	1080
tcgggtcaagc	tgggcgagcc	gcagttcgag	ggccagacca	agaccaagct	gggcaacacg	1140
gaggccaaga	ccttcgtcca	gaagatcgtc	aacgagcatc	tcgccgactg	gctggaccgt	1200
aaccctaattg	agggcgcgga	catcgctccgc	aaggggatcc	agggcgcgac	ggcccgggtc	1260
gcggcccgtg	agggcgggga	tctgaccgcg	cgtaaggggc	tgctggagac	cgcgctcgctg	1320
ccgggcaagc	tgagcgactg	ccagtccaat	gaccgcgtcg	agtgcgagat	cttcatcgctc	1380
gaggggtgact	ccgcccggcg	ctcgcccaag	tccggccgtg	acccgcagta	tcaggcgatc	1440
ctcccgatcc	gcggcaagat	cctcaacgtg	gagaaggccc	gggtcgacaa	gatcctgcag	1500
aacaacgagg	tccaggcgct	gatctccgcc	ttcggcaccg	gggtgcacga	ggacttcgac	1560
atcgccaagc	tccgctatca	caagatcatt	ctgatggcgg	acgccgatgt	cgacggccag	1620
cacatcaaca	ccctgctgct	gaccttcttc	ttccgcttca	tgcgcccgct	ggtcgaggcg	1680
gggcatgtct	tcctctcccg	tccgcgcttc	tacaagatca	agtggggccg	ggacgacttc	1740
gagtacgcgt	actcggaccg	ggagcgggac	gcgctgatcc	aggtcgggcg	tgaacagggc	1800
aagcgcatca	gggacgactc	gggtccagcgc	ttcaagggtc	tgggcgagat	gaacgccgaa	1860
gagctgcggg	tcaccacgat	ggaccccgac	caccgcgtcc	tgggccaggt	caccctggac	1920
gacgcggcgc	aggccgacga	cctgtttctg	gtcctgatgg	gtgaggacgt	cgaggcacgg	1980
cgctcgttca	tccagcgcaa	cgccaaggat	gtccgcttcc	tcgacatctg	a	2031

<210> 6
 <211> 990
 <212> ADN
 <213> Streptomyces
 5
 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..990
 <223> /tipo_mol="ADN" /nota="Rec A" /organismo="Streptomyces"
 10
 <400> 6
 ggcgatcggc cgaacgagcc ggtcagagtc atccccaccg ggtcgaccgc tctcgacgtc 60
 gccctcggcg tcggcggctc gccgcgcggc cgggtggtcg aggtctacgg ccccgagtcc 120
 tccggttaaga cgaccctgac cctgcacgcg gtggccaatg cccagcgggc cggcggcacc 180
 gttgccttcg tggacgccga gcacgccctc gaccctgact acgcgcagaa gctgggcgtg 240
 gacaccgact ccctgatcct gtcccagccg gacaacggcg agcaggcgct cgagatcgtg 300
 gacatgctgg tccgctccgg cgcctcgcac ctcatcgtca tcgactccgt cgcgcacctg 360
 gtgccgcgcg cggagatcga gggcgagatg ggcgactccc acgtcggcct ccaggcccgg 420
 ctgatgagcc aggcgctccg taagatcacc agcgcgctca accagtccaa gaccaccgcg 480
 atcttcatca accagctccg cgagaagatc ggcgtgatgt tcggctcgcc ggagaccacg 540
 accggtggcc gggcgctgaa gttctacgcg tcggtgcgca tcgacatccg ccgcatcgag 600
 accctcaagg acggcaccga cgcggtcggc aaccgcaccc gcgtcaaggt cgtcaagaac 660
 aaggtcgcgc cgccttcaa gcaggccgag ttcgacatcc tctacggcca gggcatcagc 720
 cgtgagggcg gtctgatcga catgggcgtc gagcacggct tcgtccgcaa gtccggtgcc 780
 tggtagacct acgagggcga ccagctcggc cagggcaagg agaacgcccg caacttcctg 840
 aaggacaacc ccgatctcgc caatgagatc gagaagaaga tcaaggaaaa gctcggcatc 900
 ggggtgaggg cccaggaccc ggcggccgcg gcacccacca cggacgcggc tgggtgccgcg 960
 ggcgtgaccg acgccgcacc ggcgaaggcc 990
 15
 <210> 7
 <211> 1209
 <212> ADN
 <213> Streptomyces
 20
 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..1209
 <223> /tipo_mol="ADN" /note="TrpB" /organismo="Streptomyces"
 25
 <400> 7
 30

ES 2 676 460 T3

```

gtgcccagcg ccgaggggcta tttcggcgcc ttcggcggca agttcatccc cgagggcgctc      60
gtcgccgccg tcgacgaggt cgcggccgag tacgagaagg ccaagacgga ccccgcccttc      120
gcgcccgagc tcgaggatct gctggtcaac tacaccggcc ggcccagtgc gctgaccgag      180
gtgcgggcgg tgcggagca cgccgggggc gcccggtct tcctcaagcg ggaggacctc      240
aaccacaccg gctcccacaa gatcaacaat gtgctggggc aggccctgct caccaagcgc      300
atgggcaagt cccgggtcat cgccgagacc ggcgccggtc agcacggcgt ggccacggcc      360
accgcatgtg cgctgttcgg gctcgaatgc accatctaca tgggcgaggt cgacacccag      420
cggcagggcg tcaatgtggc gcggatgcgg atgctgggcg ccgaggtcat ctccgtgacc      480
tccggcagcc gcaccctgaa ggacgccatc aacgaggcgt tccgggactg ggtcgccaat      540
gtggaccgca cccactacct cttcggtacg gtggccggcc cccacccctt cccggcgctg      600
gtgcgcgact tccaccgggt gatcggcggt gaggcgcggc ggacagatcct ggagcggacc      660
gggcccgtgc cggacgcggt cgcggcctgt gtggcgggcg gatccaacgc gatcgggctg      720
ttccacgcct tcctgccgga cgagagcggt cgccctcgtc gcttcgagcc cgccggacac      780
ggtgtggaga ccggggagca cgcgccacg ctgagccagg gcgagcccgg gatcctgcac      840
ggctcccggc cgttcgtgct ccaggacgag gacggccaga tcaccgagcc gtactcgatc      900
tcggccggtc tcgactacct cggcgtcggg ccggagcacg cgtatctgaa ggacatcggc      960
cgtgccgagt accgggcggt caccgacgac gaggcgatgc gggcgctgcg gctgctctcg     1020
gagaccgagg gcatcatccc ggcgatcgag agcgccacg cgctggcggg cgccctggac     1080
ctcgcccggt agctggggag cgacggcctg gtgctggtca acctctccgg gcgcggcgac     1140
aaggacatgg acacggcggc tcggtacttc gggctctacg accagcagag cgaccagggg     1200
gcgaagtga                                     1209

```

<210> 8

<211> 1419

<212> ADN

<213> Streptomyces

<220>

<221> fuente

<222> 1..1419

<223> /tipo_mol="ADN" /nota="AtpD" /organismo="Streptomyces"

<400> 8

```

gtggcctccg gccgcgtcgc gggggtcatc ggcccggctg tcgacgtgga gttccccgtc      60
gacgcgatgc cggagatcta caacgcgctg caggctcagg tcgccgacct ctcccaggag      120
ggggcgaaaga agaccctgac cctcgaggtc gcccagcacc tcggcgaggg cctgggtccgc      180
gccatctcca tggagccac cgacggcctg gtccgccagg ccgcggtgac cgacaccggc      240

```

ES 2 676 460 T3

gacggcatca cggtgccggt cggcgatgtc accaagggcc ggggtgttcaa caccctcggc	300
aagatcctca acgagcccga ggccgagtcc gaggtcaccg agcgtctggc catccaccgc	360
aaggccccgg ccttcgacca gctcgagtcc aagaccgaga tgttcgagac cggcctgaag	420
gtcgtcgacc tgctgacccc gtacgtcaag ggcggcaaga tcggtctgtt cggcggcgcg	480
ggcgtcggca agaccgtgct catccaggaa atgatcatgc gtgtggccaa gctgcacgag	540
ggcgttttcg tgttcgccgg tgtcggcgag cgcaccctg agggcaacga cctgatcgag	600
gagatggccg agtcggcggt gctccgcgag accgcgtgg tcttcggcca gatggatgag	660
cccccgggca cccgtctgcg cgtcgccctg gccggtctga ccatggcgga gtacttccgc	720
gatgtgcaga agcaggacgt gctgttcttc atcgacaaca tcttcgcgtt caccagggcc	780
ggttccgagg tctcgaccct gctcggccgg atgccctccg cgggtgggcta ccagccgaac	840
ctggccgacg agatgggcat cctgcaggag cgcatcacct cgaccctgg tcactcgatc	900
acctcgatgc aggcgatcta cgtccccgcg gacgacctga ccgaccggc cccggcgacc	960
accttcgcg acctcgacgc gaccacggtg ctctcccggc cgatctcgga gaagggcatc	1020
taccggcgcg tggaccgct ggactcgacg tcccggatcc tggaccgcg ctacatctcg	1080
caggagcact acgactgcg ctcgcgcgtg aagtcgatcc tgcagaagta caaggacctc	1140
caggacatca tcaacatcct gggcatcgac gagctcggcg aggaggacaa gctcaccgtc	1200
ttccgcgccc gccggatcga gcgcttctg tcgcagaaca cccacgcggc gaagcagttc	1260
accggcctcg acggatcgga tgtgccgtg gacgagtcca tcgccgcgtt caacgcgatc	1320
gccgatggtg agttcgacca cttccccgag caggcgttct tcatgtgcgg tggcctggac	1380
gacctcaagg ccaaggccaa ggagctgggc gtctcctga	1419

Reivindicaciones

1. Bacteria aislada del género *Streptomyces* seleccionada del grupo que consiste en:

- la bacteria depositada y registrada en la CNCM con el N.º I-4467, y
- los mutantes de dicha bacteria depositados y registrados en la CNCM con el N.º I-4467 capaces de inhibir el crecimiento de al menos un microorganismo, denominado microorganismo objetivo, elegido del grupo compuesto por *Botrytis cinerae*, *Fusarium culmorum*, *Pythium ultimum*, *Phaeoemoniella chlamydospora*, *Phaeoemoniella aelophilum*, *Eutypa lata*, *Fomitiporia mediterranea* y *Botryosphaeria obtusa*, obteniéndose los mutantes de dicha bacteria depositada por mutagénesis de dicha bacteria depositada.

comprendiendo la bacteria depositada y los mutantes de dicha bacteria depositada una secuencia de ADN, denominada ADN 16Sr, que codifica el ARN ribosómico 16S de dicha bacteria, siendo dicha secuencia de ADN idéntica a la secuencia SEQ ID_NO1.

2. Bacteria de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizada por que** tiene una secuencia de ADN que codifica la subunidad beta de la ARN polimerasa (polB) homóloga a la SEQ ID_NO4.

3. Bacteria de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 o 2, **caracterizada por que** tiene una secuencia de ADN que codifica la girasa (gyrB) homóloga a la SEQ ID_NO5.

4. Bacteria de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizada por que** tiene una secuencia de ADN que codifica la recombinasa (RecA) homóloga a la SEQ ID_NO6.

5. Bacteria de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizada por que** tiene una secuencia de ADN que codifica la subunidad beta de la triptófano sintetasa homóloga (trpB) a la SEQ ID_NO7.

6. Bacteria de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizada por que** tiene una secuencia de ADN que codifica la subunidad beta de la ATP sintetasa (AtpB) homóloga a la SEQ ID_NO8.

7. Composición que comprende al menos una bacteria de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 6.

8. Composición de acuerdo con la reivindicación 7, **caracterizada por que** se trata de una composición líquida que comprende bacterias de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 6 en un medio líquido.

9. Composición de acuerdo con una de las reivindicaciones 7 u 8, **caracterizada por que** comprende bacterias en fase de crecimiento vegetativo.

10. Composición de acuerdo con una de las reivindicaciones 7 a 9, caracterizada por que comprende las bacterias en forma de esporas.

11. Composición de acuerdo con la reivindicación 7, caracterizada por que se encuentra en estado sólido.

12. Composición acelular que se puede obtener por un procedimiento en el que:

- se siembra y se cultiva al menos una bacteria de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 8 en un medio de cultivo capaz de permitir el crecimiento de dicha bacteria durante un periodo mayor de 24 horas y a una temperatura entre 12 °C y 37 °C, y a continuación;
- se extraen las bacterias del medio de cultivo o se inactivan las bacterias con el fin de formar la composición acelular;

caracterizada por que:

- comprende al menos un polinucleótido, comprendiendo dicho polinucleótido una secuencia de ADN idéntica a la secuencia SEQ ID_NO1;
- presenta un efecto estimulante del crecimiento de las plantas en cultivos como el girasol, el maíz, la colza, el trigo y el tomate y una actividad antifúngica en las hojas de la vid.

13. Composición de acuerdo con la reivindicación 12 formada por un medio de cultivo bacteriano, **caracterizada por que** presenta un cromatograma HPLC, realizado en una columna XBridge de dimensiones 25 cm/4,6 mm/5 µm con un gradiente de acetonitrilo del 20 % al 95 % en agua con un caudal de 0,8 ml/min, que comprende una primera señal principal a un tiempo de retención de 11,925 minutos y una segunda señal principal a un tiempo de retención de 20,04 min.

Fig 1a

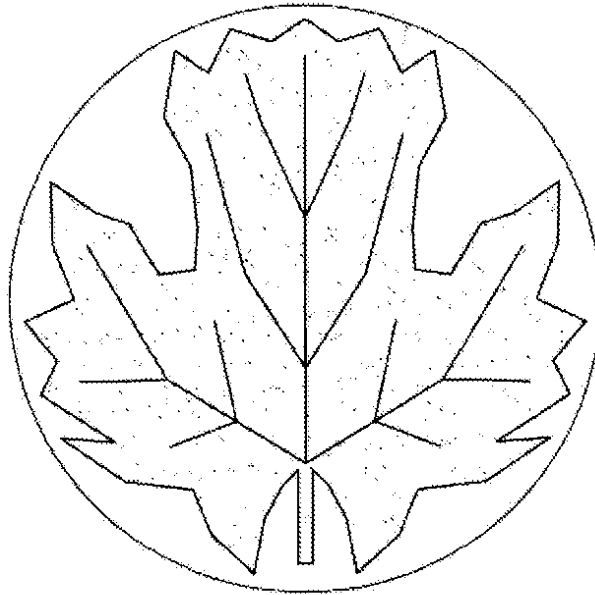


Fig 1b

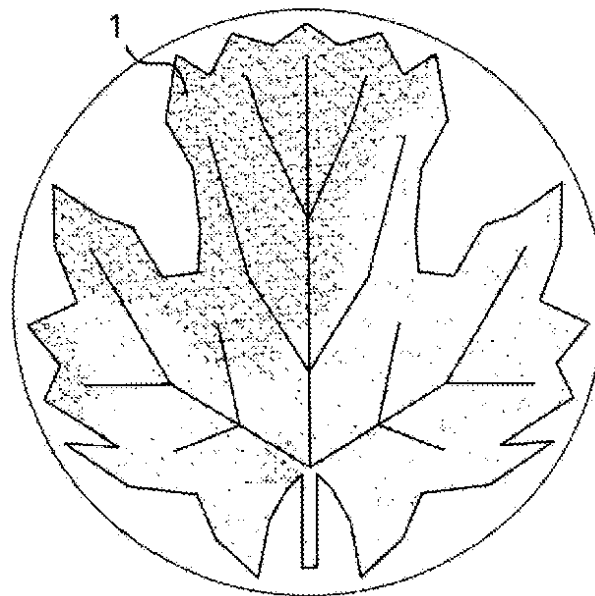


Fig 2

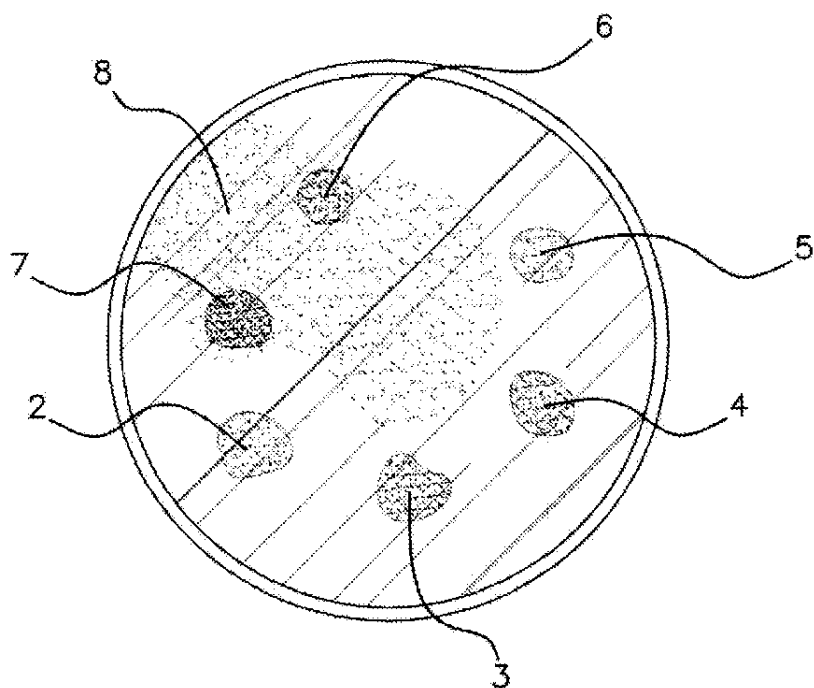


Fig 3

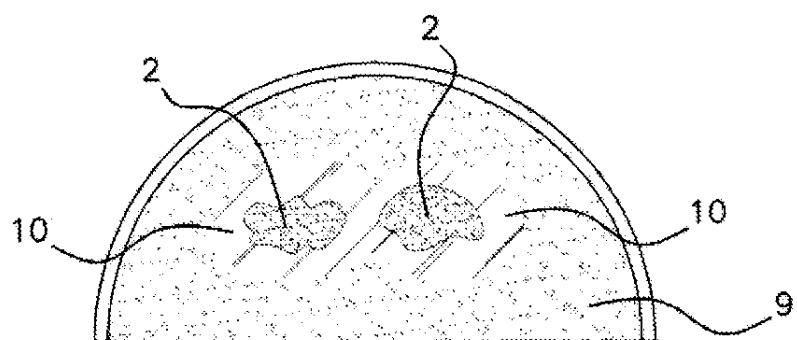


Fig 4

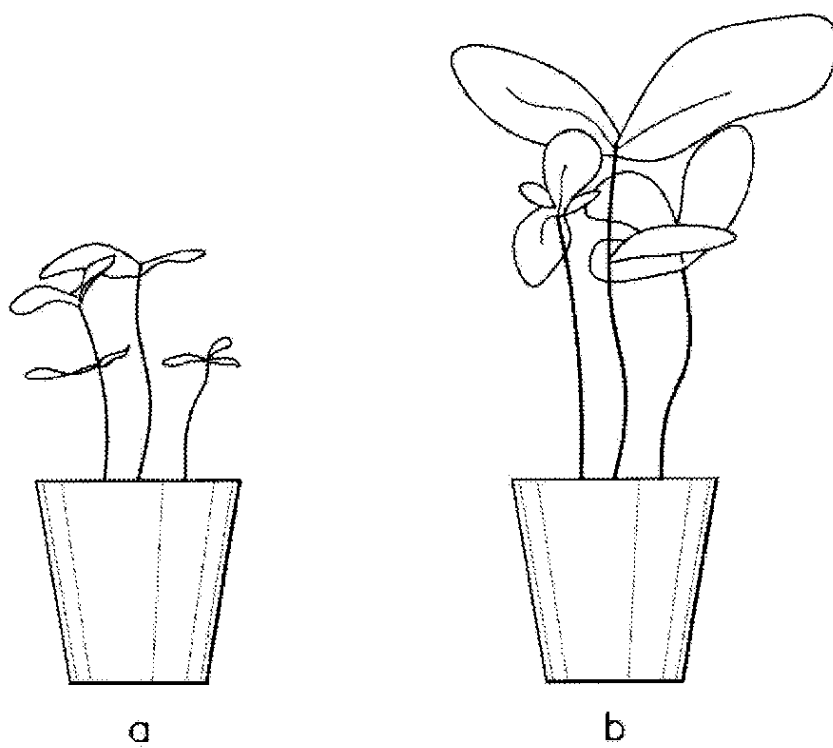


Fig 5

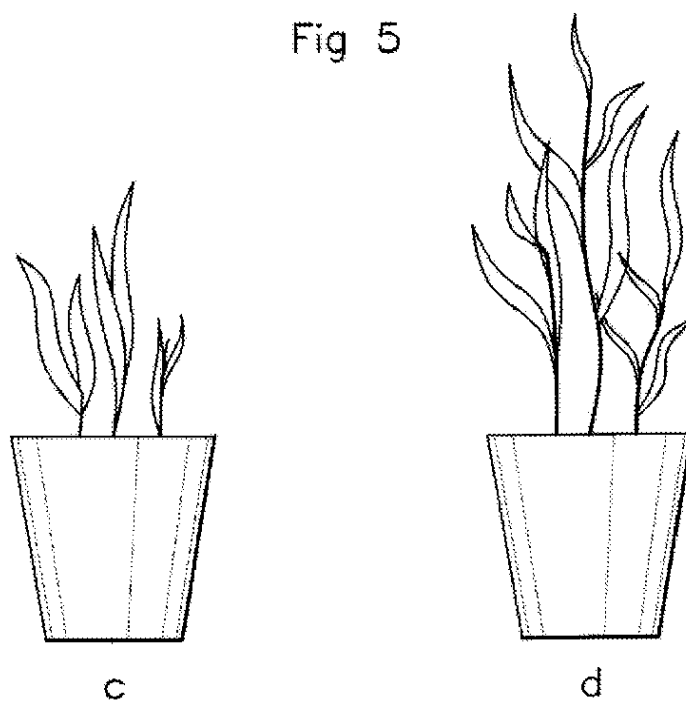


Fig 6a

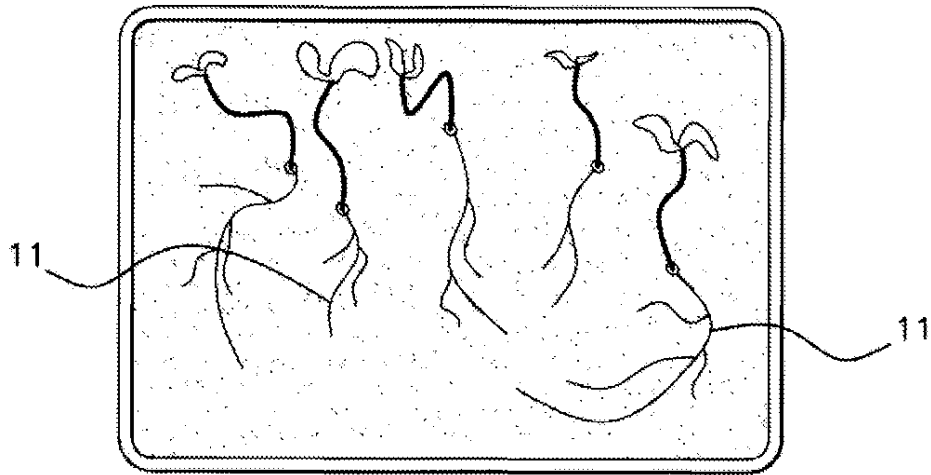


Fig 6b

