

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 678 018**

51 Int. Cl.:

**C12R 1/465** (2006.01)

**A01N 63/00** (2006.01)

**A01N 63/02** (2006.01)

**C05F 11/08** (2006.01)

**C12N 1/20** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.09.2014 PCT/FR2014/052388**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.04.2015 WO15044585**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.09.2014 E 14790659 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.04.2018 EP 3049540**

54 Título: **Usos agrícolas de una nueva bacteria del género Streptomyces**

30 Prioridad:

**24.09.2013 FR 1359181**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**08.08.2018**

73 Titular/es:

**AGRONUTRITION (33.3%)  
3 Avenue de L'Orchidée Parc Activestre  
31390 Carbonne, FR;  
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE (C.N.R.S.) (33.3%) y  
UNIVERSITÉ PAUL SABATIER TOULOUSE III  
(33.3%)**

72 Inventor/es:

**ERRAKHI, RAFIK;  
ATTIA, FAOUZI;  
CABANES, CÉDRIC;  
DUMAS, BERNARD y  
VERGNES, SOPHIE**

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO BLANCO, María Alicia**

ES 2 678 018 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).

**Usos agrícolas de una nueva bacteria del género *Streptomyces***

**Descripción**

5 **[0001]** La invención se refiere en general a los usos agrícolas de una nueva bacteria del género *Streptomyces*. La invención se refiere particularmente a un método de tratamiento de plantas, una composición de tratamiento de plantas y usos de dicha composición de tratamiento para el tratamiento de plantas.

10 **[0002]** El desarrollo de cultivos vegetales agrícolas intensivos es necesario ahora para satisfacer las necesidades de alimentos en todo el mundo. Con este fin, tales cultivos vegetales agrícolas intensivos requieren el uso de agentes para optimizar el crecimiento de las plantas de interés y para minimizar el crecimiento de plantas y/o patógenos indeseables. En particular, se sabe que los agentes mejoran la nutrición de las plantas y los agentes de protección de las plantas frente a los organismos patógenos, especialmente frente a las bacterias y/o hongos fitopatógenos que son susceptibles de afectar el crecimiento óptimo de las plantas.

15 **[0003]** Los productos de fertilización del suelo también son conocidos. En general, estos son fertilizantes de la industria química, que se encuentran en una forma sólida y poco soluble en el suelo y, por lo tanto, deben ser suministrados masivamente en el momento preciso en que se necesitan estos fertilizantes para el crecimiento óptimo de las plantas. El exceso de estos productos de fertilizantes sólidos traídos al suelo y no eliminados por las plantas permanece momentáneamente en el suelo y gradualmente se disuelve con agua de lluvia o agua de riego antes de llegar al agua subterránea y contaminarlos.

20 **[0004]** Por lo tanto, se buscan soluciones para mejorar la fertilización de los suelos sin contaminar el medio ambiente y, en particular, las capas freáticas, mientras que se promueve la nutrición y el crecimiento de las plantas.

25 **[0005]** La invención, por lo tanto, pretende proporcionar una solución a este problema.

30 **[0006]** Además, es probable que se desarrollen muchos agentes fitopatógenos en los cultivos vegetales y a su costa, reduciendo el rendimiento de producción y la calidad de la producción de cultivos.

**[0007]** La invención también tiene como objetivo proporcionar una solución para la protección de vegetales con respecto a ciertos organismos fitopatógenos -bacterias y/o champiñones-.

35 **[0008]** Para hacer esto, la invención se refiere a un método para tratar un material vegetal, de acuerdo con la reivindicación 1.

**[0009]** La secuencia SEQ ID\_NO1 se describe a continuación:

40	tagtggcgaa cgggtgagta acacgtgggc aatetgccct gcaactctggg acaagccctg	60
	gaaacgggggt ctaataccgg atatgacacg ctcccgcattg ggatgcgtgt ggaaagctcc	120
45	ggcgggtgcag gatgagcccg cgccctatca gcttgttggg ggggtgatgg cctaccaagg	180
	cgacgacggg tagccggcct gagagggcga cggccacac tgggactgag acacggccca	240
50	gactcctacg ggaggcagca gtggggaata ttgcacaatg ggcgaaagcc tgatgcagcg	300
	acgccgcgtg agggatgacg gccttcgggt tglaaacctc ttccagcagg gaagaagcga	360
55	gagtgacggt acctgcagaa gaagcggcgg ctaactacgt gccagcagcc gcggaatac	420
	gtagggcgca agcgttctcc ggaattattg ggcgtaaaga gctcgtaggc ggcttctcgc	480
60	gtcggatgtg aaageccggg gcttaacccc gggctctcat tcgatacggg caggctagag	540

60

65

	tteggtaggg gagatcggaa ttctggtgt agcgggtaaa tgcgcagata tcaggaggaa	600
5	caccggtggc gaagggcggat ctctgggccc atactgacgc tgaggagcga aagcgtgggg	660
	agcgaacagg attagatacc ctggtagtcc acgccgtaaa cgttgggaac taggtgtggg	720
	cgacattcca cgtcgtccgc gccgcagcta acgcattaag ttccccgcct ggggagtacg	780
10	gccgcaaggc taaaactcaa aggaattgac ggggggcccc cacaagcggc ggagcatgtg	840
	gcttaattcg acgcaacgcg aagaacctta ccaaggcttg acatacacc ggaaacctct	900
15	ggagacaggg gcccccttg tggtcggtgt acagggtgtg catggcttgt cgtcagctcg	960
	tgtcgtgaga tgttgggta agtccccgca acgagcgcaa ccttgttct gtgtgccag	1020
20	catgccttcc gggggntgat ggggacttnc acaggagact gccgggggtca actcggagga	1080
	aggtggggac gacgtcaagt catcatgccc cttatgtctt gggctgcaca cgtgctacaa	1140
	tggccggtag aatgagctgc gaagccgtga ggtggagcga atctcaaaaa gccggctca	1200
25	gttcggattg gggctcgtca ctcgaccca tgaagtcgga gtcgctagta atcgcagatc	1260
	agcattgctg cgggtaatac gtccccgggc ctgtacaca ccgcccgtca cgtaacgaaa	1320
30	gtcggtaaca cctgaa	1336.

35 **[0010]** En la SEQ ID\_NO1 anteriormente, el símbolo "n" en posiciones 1036 y 1049 de la SEQ ID\_NO1 significa, según IUPAC (*"International Union of Pure and Applied Chemistry"*), cualquiera de los cuatro nucleótidos a, t, c o g. Por lo tanto, el nucleótido n en la posición 1036 se selecciona del 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 elige independientemente del nucleótido en la posición 1036, en el grupo que consiste en el nucleótido "a", el nucleótido "t", el nucleótido "g" y el nucleótido "c".

40 **[0011]** La invención por lo tanto se refiere a un método de tratamiento de un material vegetal, en el que se aplica la composición de tratamiento a al menos una porción de dicho material de planta o en un sustrato de cultivo de dicho material de planta.

45 **[0012]** Los inventores han observado que, de una manera completamente sorprendente e impredecible, una composición de tratamiento de la invención tiene capacidad inhibidora del crecimiento de ciertas bacterias, tales como, por ejemplo, *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis* y de ciertas bacterias o hongos fitopatógenos tales como *Streptomyces scabies*, *Botrytis cinerae*, *Fusarium culmorum*, *Pythium ultimum*, *Phaeoconiella chlamydospora*, *Phaeomon lella*, *Phaeomon aelophilum*, *Eutypa lata*, *Fomitiporia mediterranea* y *Botryosphaeria obtusa*.

50 **[0013]** Una cepa de bacterias que tienen una secuencia homóloga de ADN a 100% con la SEQ ID\_NO1 fue presentada por el solicitante y registrado el 7 de abril de 2011 bajo el número I-4467 con la Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos (CNCM) del Instituto Pasteur (cuya dirección es 25, rue du Docteur Roux, 75724 Paris cedex 15) con el estatuto de autoridad internacional de depósito según el Tratado de Budapest.

55 **[0014]** En un método de tratamiento descrito en el presente documento, las bacterias se utilizan que son del género *Streptomyces* y que tienen una secuencia de ADN homóloga al 100% con la SEQ ID\_NO1.

60 **[0015]** Ventajosamente y según la invención, la bacteria aislada presenta una secuencia de ADN que codifica para la subunidad beta de la ARN polimerasa (POLB) homóloga a la SEQ ID\_NO8. La bacteria aislada tiene así la secuencia SEQ ID\_NO8 como una secuencia codificante para la subunidad beta de la ARN polimerasa (polB).

65 **[0016]** Ventajosamente y según la invención, la bacteria aislada presenta una secuencia de ADN que codifica la girasa (gyrB) homóloga a la SEQ ID\_NO9. La bacteria aislada tiene así la secuencia SEQ ID\_NO9 como secuencia de codificación para girasa (gyrB).

**[0017]** Ventajosamente y según la invención, la bacteria aislada presenta una secuencia de ADN que codifica para

la recombinasa homóloga (RecA) a la SEQ ID\_NO10. Por lo tanto, la bacteria aislada tiene la secuencia SEQ ID\_NO10 como una secuencia codificante para la recombinasa (RecA).

5 **[0018]** Ventajosamente y según la invención, la bacteria aislada presenta una secuencia de ADN que codifica la unidad beta de sintasa triptófana (trpB) homóloga con SEQ ID\_NO11. La bacteria aislada tiene así la secuencia SEQ ID\_NO11 como secuencia codificante para la sintasa triptófana (trpB).

10 **[0019]** Ventajosamente y según la invención, la bacteria aislada presenta una secuencia de ADN que codifica para la unidad beta de la sintasa ATP (ATPB) homóloga a la SEQ ID\_NO12. La bacteria aislada tiene así la secuencia SEQ ID\_NO12 como una secuencia codificante para la subunidad beta de la sintasa ATP (AtpB).

15 **[0020]** Ventajosamente y según 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, la bacteria aislada tiene cada una de las secuencias SEQ ID\_NO4, SEQ ID\_NO5, SEQ ID\_NO6, SEQ ID\_NO7 y SEQ ID\_NO8.

20 **[0021]** Ventajosamente y según la invención, la composición de tratamiento comprende bacterias seleccionadas del grupo que consiste de bacterias de acuerdo con la cepa depositada y registrada el 7 de abril de 2011 bajo el número I-4467 con la Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos (CNCM) del Instituto Pasteur y bacterias mutantes de esta cepa depositada obtenida por mutagénesis dirigida al sitio y que comprende una porción de secuencia homóloga al 100% con la secuencia SEQ ID\_NO1.

25 **[0022]** En una primera variante de un método de acuerdo con la invención, se utilizan bacterias coliformes en la cepa depositada y registrada el 7 de abril de 2011 bajo el número I-4467 con la Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos (CNCM) del Instituto Pasteur, de tales bacterias que se ajustan a la cepa depositada que comprende una porción de la secuencia de ADN que tiene 100% de homología con la secuencia SEQ ID\_NO1.

30 **[0023]** La cepa depositada en la CNCM con la forma nº I-4467 cuando se crece en el medio ISP-2 o en medio sólido Bennett, racimos o "colonias" bacterianas presenta:

- micelio, un denominado micelio de sustrato ramificado que crece en el espesor del medio sólido y varía en color de amarillo pardo a gris-marrón dependiendo de la composición del medio sólido;
- un micelio aéreo que se desarrolla en la interfaz aire/sólido que es de color blanco.

35 **[0024]** La cepa depositada en la CNCM es una cepa de bacterias aisladas de cualquier entorno natural. En particular, la cepa depositada en la CNCM se aisló de un entorno natural de origen en el que ya existía.

40 **[0025]** Las bacterias de la cepa depositada en la CNCM se caracterizan por la totalidad o parte de las características siguientes:

- no son patógenas (inocuas) para los humanos;
- son bacterias Gram-positivas;
- son bacterias saprófitas, es decir, capaces de degradar la materia orgánica del suelo;
- 45 - tienen una temperatura óptima de crecimiento que está entre 12°C y 37°C, preferentemente entre 28°C y 30°C;
- tienen un pH de crecimiento óptimo de entre 6 y 8;
- pueden usar D-glucosa, manitol, lactosa, sacarosa, maltosa y dextrina como fuente de carbono;
- no son adecuadas para el uso preferencial de galactosa, inositol, sorbosa, fructosa, arabinosa, rafinosa, ramnosa de celulosa como una única fuente de carbono;
- 50 - pueden usar aminoácidos, sales de nitrato y sales de amonio como fuente de nitrógeno;
- son capaces de reducir nitratos a nitritos, degradando adenina, tweed 20 y acetato de sodio;
- no pueden hidrolizar el almidón y usar estos productos de hidrólisis.

55 **[0026]** En una segunda variante de un método de acuerdo con la invención, las bacterias mutantes de las bacterias de cepa depositada en la CNCM, es decir obtenidas por mutación de las bacterias de la cepa depositada en la CNCM, comprendiendo tales bacterias mutantes una secuencia de ADN de homología al 100% con la secuencia SEQ ID\_NO1.

60 **[0027]** Se obtiene tales bacterias mutantes por tratamiento de bacterias de la cepa depositada en la CNCM por cualquier método de mutagénesis, en particular seleccionada del grupo que consiste de los métodos de mutagénesis aleatoria y los métodos de mutagénesis dirigida.

65 **[0028]** Se realiza un tratamiento de mutagénesis al azar que comprende someter bacterias coliformes a la cepa depositada en la CNCM a al menos un agente mutagénico seleccionado entre el grupo que consiste en agentes mutágenos físicos -especialmente mediante la exposición de bacterias coliformes en la cepa depositada en la CNCM a radiación de luz ultravioleta o radiación ionizante y mutágenos químicos.

**[0029]** Bacterias mutantes muestran diferencias en la secuencia de ADN en relación con las bacterias de la cepa depositada en la CNCM. Estas diferencias en la secuencia de ADN afectan a secuencias de ADN distintas de la secuencia de ADN<sub>r</sub> 16S de la bacteria de la invención.

5 **[0030]** De acuerdo con las variantes ventajosas primera o segunda de un método según la invención, se pone en contacto la composición de tratamiento que comprende bacterias que tienen una secuencia de ADN homóloga al 100% con la SEQ ID\_NO1 (es decir, bacterias de acuerdo con la tensión depositada en la CNCM y/o las bacterias mutantes de esta cepa depositada) con al menos una parte de dicho material vegetal.

10 **[0031]** De acuerdo con las variantes primera o segunda de un método según la invención, las bacterias de la composición de tratamiento pueden ser bacterias en fase de crecimiento vegetativo. El término "bacterias en la fase de crecimiento vegetativo", bacterias que tienen un metabolismo activo y/o se multiplican por división celular. Por lo tanto, es una bacteria viva en fase de crecimiento vegetativo o fase estacionaria. La composición de tratamiento se forma luego de bacterias y un medio de cultivo. El medio de cultivo es preferiblemente un medio de cultivo acuoso.  
15 Ventajosamente, el medio de cultivo acuoso es un medio de cultivo seleccionado del grupo que consiste en medios ricos que comprenden todos los elementos minerales y precursores orgánicos necesarios para el crecimiento de las bacterias de acuerdo con la invención, en particular una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, una fuente de fósforo, vitaminas y oligoelementos.

20 **[0032]** Ventajosamente, el medio de cultivo acuoso puede comprender D-glucosa, extracto de levadura, fosfato dibásico de potasio, sulfato de amonio, cloruro de potasio y glicerol.

**[0033]** De acuerdo con las variantes primera o segunda de un método de acuerdo con la invención, la composición de tratamiento de las bacterias puede también estar en forma de esporas que tienen la secuencia de ADN homóloga al 100% con la secuencia SEQ ID\_NO1. La formación de esporas se observa cuando las bacterias en la fase de crecimiento vegetativo forman un micelio primario que se desarrolla en una interfaz aire/sólido e inicia un crecimiento aéreo. Los filamentos aéreos no ramificados o "hifas" se desarrollan a partir del micelio primario y tienen estructuras compartimentales de esporas precursoras en sus extremos. Pueden ser esporas de bacterias que se ajusten a la cepa depositada y registrada el 7 de abril de 2011 bajo el número I-4467 con la Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos (CNCM) del Instituto Pasteur o bacterias mutantes de esta cepa depositada y que comprende una secuencia de ADN que tiene la secuencia SEQ ID\_NO1. Por lo tanto, es una bacteria viva en forma de esporas.

**[0034]** Las esporas de bacterias de la cepa depositada en la CNCM son esporas lisas y encadenadas en tipo de desplazamiento "S", cadenas de esporas lisas que tienen en promedio de 10 a 50 esporas.

**[0035]** Se promueve la producción de esporas de la bacteria de la invención por el cultivo de bacterias de acuerdo con la invención en un medio de cultivo capaz de generar un estrés bacteriano, incluyendo cultivo líquido limitado o medio deficiente de carbono y/o nitrógeno y/o fósforo y/o vitaminas y/o oligoelementos.

40 **[0036]** Ventajosamente, tales esporas pueden ser colocadas en un medio rico y la rehidratación para formar una población de bacterias de acuerdo con la invención en la fase vegetativa.

**[0037]** Ventajosamente, no se aplica a la materia vegetal una composición de tratamiento que comprende bacterias en fase y/o bacterias como esporas vegetativas. En cualquier caso, las formas vegetativas y esporas de las bacterias tienen una secuencia de ADN<sub>r</sub> 16S homóloga a 100% con la secuencia SEQ ID\_NO1.

**[0038]** El medio de cultivo acuoso puede ser un medio de cultivo acuoso sólido o un medio de cultivo acuoso líquido.

50 **[0039]** En una primera realización de esta primera variante de un método según la invención, la composición de tratamiento que comprende bacterias (cepa depositada y/o bacterias mutantes de la cepa depositada) teniendo la secuencia de ADN<sub>r</sub> 16S de acuerdo con la SEQ ID\_NO 1, es una composición de tratamiento líquido. Ventajosamente, la composición de tratamiento líquido es una composición acuosa de tratamiento líquido. La composición de tratamiento líquida acuosa puede por lo tanto formarse a partir de una carga bacteriana que comprende bacterias que tienen la secuencia de ADN<sub>r</sub> 16S de acuerdo con la SEQ ID\_NO: 1 en un medio líquido acuoso.  
55

**[0040]** En esta primera forma de realización, preferentemente, se aplica a al menos una porción de dicho material de planta la composición de tratamiento líquida que comprende bacterias de la cepa depositada en la CNCM y/o bacterias mutantes en un medio de cultivo líquido.  
60

**[0041]** En una segunda realización de esta primera variante de un método de acuerdo con la invención, la composición de tratamiento que comprende las bacterias que tienen la secuencia SEQ ID\_NO1 es una composición de procesamiento sólido.  
65

**[0042]** En esta segunda realización, preferiblemente, se aplica a al menos una porción de dicho material vegetal una

composición de procesamiento sólido que comprende bacterias de la cepa depositada en la CNCM y/o bacterias mutantes y un medio de cultivo sólido. En esta segunda realización, el medio de cultivo sólido puede comprender una proporción de agar-agar (E406).

5 **[0043]** En una tercera variante de un método de acuerdo con la invención se aplica una composición de procesamiento que comprende al menos un polinucleótido que tiene al menos una porción de la secuencia de ADN homólogo a la SEQ ID\_NO1.

10 **[0044]** Ventajosamente, en esta tercera variante de un método de acuerdo con la invención, la composición de tratamiento puede comprender un polinucleótido y/o bacterias seleccionadas del grupo que consiste de bacterias coliformes a la cepa depositada y registrada el 7 Abril de 2011 bajo el número I-4467 de la Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos (CNCM) del Instituto Pasteur y/o bacterias mutantes de esta cepa depositada.

15 **[0045]** Ventajosamente, en esta tercera variante de un método de acuerdo con la invención, la composición de tratamiento puede ser una composición libre de células que está sustancialmente libre de bacterias que tienen la secuencia SEQ ID\_NO1. En esta tercera variante de un método de acuerdo con la invención, al menos una parte de dicho material vegetal se pone en contacto con la composición acelular liberada de bacterias que tienen la secuencia SEQ ID\_NO1.

20 **[0046]** Ventajosamente y según la invención, dicha composición libre de células es en particular un medio de cultivo en el que se han desarrollado las bacterias que comprenden la secuencia SEQ ID\_NO1 y que está sustancialmente libre de dichas bacterias.

25 **[0047]** La invención también proporciona una composición de tratamiento formada de un medio de cultivo de bacterias que tiene un cromatograma de HPLC que comprende una primera señal mayor ( $P_{72,6}$ ) a un tiempo de retención de 11.925 min y una segunda señal principal ( $P_{72,14}$ ) en un tiempo de retención de 20,04 min.

30 **[0048]** Tal composición de tratamiento formada de un medio de cultivo bacteriano de acuerdo con la invención tiene un efecto estimulador del crecimiento de plantas en cultivo, tales como girasol, maíz, semilla de colza, el trigo y el tomate y también presenta una actividad antifúngica, particularmente con respecto a *Botrytis cinerea*, en las hojas de la vid.

35 **[0049]** Tal composición de tratamiento puede ser un medio de cultivo en el que las bacterias crecieron comprenden la secuencia SEQ ID\_NO1 y que está sustancialmente libre o no de dichas bacterias.

**[0050]** Una composición libre de células de acuerdo con la invención obtenida después de 24 horas de cultivo de la cepa de acuerdo con la invención puede tener el análisis por HPLC en columna de fase inversa de una pluralidad de picos ( $P_{24,i}$ ) que tienen tiempos de retención ( $t_i$ ) enumerados en la Tabla 1 a continuación.

40 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 a 21,7

50 **[0051]** Una composición libre de células de este tipo según la invención obtenida después de 3 días (72 horas) de cultivo de la cepa de acuerdo con la invención puede tener el análisis por HPLC en columna de fase inversa de una pluralidad de picos ( $P_{72,i}$ ) que tiene tiempos de retención ( $t_i$ ) y áreas ( $A_{72,i}$ ) expresadas en valores relativos bajo dichos picos ( $P_{72,i}$ ) enumerados en la Tabla 2 a continuación.

60

65

Tabla 2

P <sub>72,i</sub>	t <sub>i</sub> (minuto)	A <sub>72,i</sub> (%)
P <sub>72,1</sub>	3,93	3,45
P <sub>72,2</sub>	5,30	2,02
P <sub>72,3</sub>	6,59	5,05
P <sub>72,4</sub>	8,83	1,45
P <sub>72,5</sub>	9,63	3,13
P <sub>72,6</sub>	11,925	9,07
P <sub>72,7</sub>	12,39	1,92
P <sub>72,8</sub>	12,87	1,24
P <sub>72,9</sub>	13,76	1,82
P <sub>72,10</sub>	15,93	2,68
P <sub>72,11</sub>	16,27	2,07
P <sub>72,12</sub>	18,41	1,98
P <sub>72,13</sub>	19,38	3,15
P <sub>72,14</sub>	20,04	6,59

**[0052]** El análisis de HPLC del extracto obtenido por extracción del medio de cultivo de la cepa según la invención por acetato de etilo, secado de la solución de acetato de etilo y solubilización del extracto en metanol. La cromatografía HPLC se realiza en una columna Xbridge (Waters, Guyancourt, Francia) de dimensiones de 25 cm/4,6 mm/5µm. La elución se lleva a cabo mediante un gradiente de acetonitrilo de 20% a 95% en agua con un caudal de 0,8 mL/min. La detección se lleva a cabo a la longitud de onda de 254 nm.

**[0053]** En las condiciones de extracción y el análisis mencionado anteriormente, ventajosamente y según la invención, la composición de tratamiento es una composición libre de células sustancialmente libre de bacterias que tienen la secuencia SEQ ID\_NO1 y formada a partir de un medio de cultivo en el que se desarrollan bacterias que tienen dicha secuencia SEQ ID\_NO1 desarrollada y que está sustancialmente libre de dichas bacterias y que tiene un cromatograma de HPLC que comprende una primera señal principal (P<sub>72,6</sub>) en un tiempo de retención de 11,925 min y una segunda señal principal (P<sub>72,14</sub>) en un tiempo de retención de 20,04 min.

**[0054]** En las condiciones de ensayo anteriormente mencionadas, ventajosamente y según la invención, la composición libre de células obtenida después de 3 días (72 horas) de cultivo de la cepa de acuerdo con la invención tiene una traza de HPLC que comprende señales, dichas señales menores en 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.

**[0055]** Tal composición libre de células se puede obtener mediante un proceso en el que:

- se cultiva al menos una bacteria de la cepa depositada en la CNCM y que tiene la secuencia de ADN SEQ ID\_NO1 en el medio de cultivo capaz de permitir el crecimiento de dichas bacterias durante un período superior a 24 horas, entonces;
- las bacterias se eliminan del medio de cultivo para formar la composición acelular al menos sustancialmente libre de dichas bacterias.

**[0056]** Ventajosamente, se siembran y se cultivan las bacterias en el medio de cultivo y durante un tiempo suficiente capaz de permitir su crecimiento, es decir, durante un período de entre un mínimo del orden de 24 horas y 10 días, a una temperatura entre 12°C y 37°C, preferiblemente entre 28°C y 30°C, en particular del orden de 30°C, y luego las bacterias se extraen del medio de cultivo por ejemplo, mediante centrifugación del medio de cultivo o las bacterias se inactivan para formar la composición acelular. Dicha composición acelular es, por lo tanto, un medio de cultivo que ya no comprende bacterias o que comprende bacterias muertas, que se ha obtenido poniendo en contacto y cultivando bacterias en un medio de cultivo y en condiciones adaptadas al crecimiento de dichas bacterias. .

**[0057]** Es posible inactivar las bacterias por cualquier técnica conocida, en particular por la lisis de las bacterias mediante tratamiento enzimático o tratamiento mecanoquímico.

**[0058]** Ventajosamente y según la invención, la composición de tratamiento se aplica a la(s) parte(s) del material de la planta, comprendiendo dicha composición de tratamiento además al menos un excipiente aceptable (fito-aceptable) para dicho material vegetal.

**[0059]** Ventajosamente y según la invención se elige material de planta del grupo que consiste de la totalidad o parte de una planta en cultivo, una fruta o verdura después de la cosecha, semilla, especialmente granos, bulbos, garras, rizomas o tubérculos de plantas. En particular, la composición de tratamiento se aplica a al menos una parte aérea de la planta, por ejemplo en el follaje o en las semillas.

5 **[0060]** Ventajosamente y según la invención, se elige la planta cultivada en el grupo formado por árboles - especialmente olivos, albaricoqueros, cerezos, membrillos, almendros, higueras, avellanos, nogales, melocotoneros, perales, manzanos, ciruelos, vid y cítricos, árboles y arbustos ornamentales, plantas vegetales, incluyendo espárragos, berenjenas, acelgas, remolachas vegetales, zanahorias, apio, achicoria, achicoria, crucíferas o  
10 brassicáceas (por ejemplo, coles), pepinos, pepinillos, calabacín, chalotes, cebollas, habas, frijoles de primavera, frijoles de invierno, fresas, frambuesas, frijoles, lechuga, achicoria, achicoria, lúpulo, lentejas, alfalfa, lechuga de cordero, maíz, melones, nabos, puerros, guisantes, pimientos, patatas, arroz, nabos, soja, tabaco, tomates, girasoles, cereales, incluido el trigo, la colza, el lino, la linaza, el lino, cebada, sorgo, diversos cultivos florales, especialmente crisantemos, hortensias, claveles, rosas, tulipanes y plantas aromáticas, especialmente perejil, ajo, cebollín.

**[0061]** Ventajosamente y según la invención, el material vegetal se selecciona del grupo que consiste de semillas de plantas, las partes aéreas de las plantas y las raíces de las plantas.

15 **[0062]** Ventajosamente, la aplicación de la composición de tratamiento para plantar semillas para activar la germinación.

**[0063]** Ventajosamente, la composición de tratamiento se aplica a las partes aéreas de las plantas a un tratamiento fitosanitario de plantas o para el tratamiento de la estimulación de las defensas naturales de plantas o para un  
20 tratamiento para estimular el crecimiento de las plantas.

**[0064]** La invención por lo tanto se refiere a un método de tratamiento de un material vegetal, que comprende aplicar sobre al menos una porción de dicho material de la planta una composición de tratamiento que comprende al menos un material biológico seleccionado del grupo que consiste en:

- al menos una bacteria que comprende una secuencia de ADN homóloga al 100% con SEQ ID\_NO1;
- una composición líquida que comprende una secuencia de ADN homóloga al 100% con la SEQ ID\_NO1;
- una composición sólida que comprende una secuencia de ADN homóloga al 100% con SEQ ID\_NO1;
- una composición acelular que comprende una secuencia de ADN homóloga al 100% con la SEQ ID\_NO1.

30 Nutrición

**[0065]** Ventajosamente y según la invención, se utiliza una composición de tratamiento que comprende un nutriente sólido en estado dividido. Por lo tanto, se aplica la composición de tratamiento que comprende además al menos un nutriente sólido en estado dividido en la totalidad o parte de la planta en cultivo. La composición de tratamiento que comprende al menos un nutriente en estado sólido y al menos un agente biológico que comprende una secuencia de ADN homóloga a más de 99% -borna excluida- con SEQ ID\_NO1. En particular, ventajosamente y de acuerdo con la invención, dicha composición de tratamiento se aplica al sustrato, en particular en el suelo del cultivo de plantas. Sin embargo, también es posible aplicar la composición de tratamiento a las partes aéreas de la planta. Los inventores han observado que una composición de tratamiento que comprende bacterias que comprende una secuencia de ADN homóloga a más de 99% -o excluida- con SEQ ID\_NO1 -en particular, bacterias de la cepa depositada en la CNCM- permite mejorar la solubilización de nutrientes sólidos, especialmente el fósforo, de un sustrato de cultivo vegetal, promoviendo así la nutrición y la fertilización de las plantas.

45 Estimulación del crecimiento de la planta

**[0066]** Ventajosamente y según la invención, dicha composición se aplica al tratamiento de dicho material vegetal para promover el crecimiento de este último.

50 **[0067]** En particular, ventajosamente y según la invención, se aplica la composición de tratamiento a las semillas, a fin de permitir la germinación de semillas. Los inventores han observado que la aplicación de una composición de tratamiento según la invención que comprende bacterias en estado vegetativo y/o en forma de esporas de semillas, en particular en semillas de girasol o de maíz, permite acelerar la germinación de las semillas y el crecimiento de las plantas de girasol y maíz.

55 Inhibición de fitopatógenos

**[0068]** Ventajosamente y según la invención, dicha composición se aplica al tratamiento de dicho material vegetal para inhibir el crecimiento de al menos un microorganismo objetivo. La composición de tratamiento se aplica a dicho material vegetal para inhibir el crecimiento de microorganismos diana seleccionados del grupo que consiste en microorganismos fitopatógenos (bacterias u hongos). En particular, ventajosamente y de acuerdo con la invención, dicha composición de tratamiento se aplica a al menos una parte del follaje de la planta. Es posible que la composición de tratamiento sea una composición de tratamiento curativo o una composición de tratamiento profiláctico (o preventivo) de dicho material vegetal. Por lo tanto, la composición de tratamiento se aplica antes del inicio de la enfermedad o después del inicio de la enfermedad.

Estimulación de las defensas naturales de las plantas

5 **[0069]** Ventajosamente y según la invención, dicha composición se aplica al tratamiento de dicho material vegetal para estimular las defensas naturales de dicho material vegetal.

10 **[0070]** Los inventores han observado de modo impredecible e inesperado que una composición de tratamiento según la intervención permite estimular los mecanismos de autodefensa de los vegetales -en particular activar el flujo de iones y/o la expresión del gen PR-1 ("Proteína relacionada con patogénesis de tipo 1")- responsable de la síntesis de compuestos de defensa en la planta.

15 **[0071]** La invención se extiende a una composición de tratamiento de un material vegetal que comprende al menos un agente biológico seleccionado del grupo que consiste en:

- bacterias que comprenden una secuencia de ADN, dicho ADN, 16S, que codifica la ARN ribosómica 16S de dicha bacteria a 100% homóloga a la SEQ ID\_NO1,
- medios de cultivo en los que han estado creciendo las bacterias incluyendo la secuencia de 16S rADN 100% homóloga a la SEQ ID\_NO1 y que están sustancialmente libres de dichas bacterias, medios de cultivo que comprenden polinucleótidos que tienen una secuencia homóloga de ADN homóloga a 100% con la SEQ ID\_NO1, y en donde las bacterias se seleccionan del grupo que consiste de bacterias coliformes a la cepa depositada y registrada el 7 de abril de 2011 bajo el número I-4467 con la Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos (CNCM) del Instituto Pasteur, y bacterias mutantes de esta cepa depositada.

20 **[0072]** La invención se extiende a una tal composición para el tratamiento de un material vegetal.

25 **[0073]** Los inventores han observado que una composición de dicho tratamiento de acuerdo con la invención:

- es capaz de ralentizar el crecimiento de ciertas bacterias como *Micrococcus luteus* y *Bacillus subtilis*;
- es capaz de ralentizar el crecimiento de ciertos microorganismos fitopatógenos diana tales como *Botrytis cinerea*, *Streptomyces scabies*, *Botrytis cinerae*, *Fusarium culmorum*, *Pythium ultimum*, *Phaeoemoniella chlamydospora*, *Phaeoemoniella aelophilum*, *Eutypa lata*, *Fomitiporia mediterranea* y *Botryosphaeri obtusa*, y;
- tiene un efecto estimulante sobre el crecimiento de las plantas en el cultivo, como el girasol y el maíz, y;
- es capaz de estimular las defensas naturales de las plantas en el cultivo.

30 **[0074]** En particular, los inventores han descubierto que una composición de tratamiento de la invención tiene una actividad estimulante de las defensas naturales de las plantas, es decir, son capaces de activar la expresión en plantas de genes de defensa, por ejemplo, PR-1- con respecto a organismos patógenos de plantas.

35 **[0075]** Ventajosamente y según la invención, la composición de tratamiento es líquida. En particular, la composición de tratamiento es líquida a temperatura ambiente.

40 **[0076]** Ventajosamente y según la invención, la composición de tratamiento es sólida. En particular, la composición de tratamiento es sólida a temperatura ambiente.

45 **[0077]** Ventajosamente y según la invención, la composición de tratamiento comprende al menos un excipiente aceptable (fito-aceptable) para permitir su aplicación a un material vegetal que va a tratarse.

50 **[0078]** La invención se refiere también a cualquier uso en la agricultura de una composición de tratamiento según la invención, es decir una composición de tratamiento que comprende al menos un agente biológico seleccionado del grupo que consiste en:

- bacterias que comprenden una secuencia de ADN, dicho ADN, 16S, que codifica las ARN ribosómicas 16S de dicha bacteria a 100% homóloga a la SEQ ID\_NO1,
- polinucleótidos que tienen una secuencia de ADN homóloga al 100% con la SEQ ID\_NO1,

55 y en el que las bacterias se seleccionan del grupo que consiste de bacterias coliformes a la cepa depositada y registrada el 7 de abril de 2011 bajo el número I-4467 con la Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos (CNCM) del Instituto Pasteur, y bacterias mutantes de esta cepa depositada.

60 **[0079]** En particular, la invención se refiere a cualquier uso en la agricultura de una composición de tratamiento de acuerdo con la invención que comprende al menos una bacteria de la cepa depositada en la CNCM y que tiene la secuencia de ADN SEQ ID\_NO1.

65 **[0080]** Más particularmente, la invención se refiere al uso de dicha composición para el tratamiento de:

- estimular el crecimiento de las plantas, o para;

- estimular la germinación de las semillas, o para;
- un tratamiento de fertilización de plantas, o para;
- terapia antimicrobiana, que incluye terapia antimicótica o antibacteriana y/o antiviral de plantas, o para;
- estimular las defensas naturales de las plantas.

5 [0081] La invención también se refiere a un método para el tratamiento de un material vegetal, una composición de tratamiento de un material vegetal y el uso de tales composiciones de tratamiento en agricultura caracterizadas en combinación por la totalidad o parte de características mencionadas arriba o abajo.

10 [0082] Otros objetos, características y ventajas de la invención aparecerán al leer la siguiente descripción, ejemplos ilustrativos dados únicamente de forma no limitativa y las figuras adjuntas en las que:

- 15 - 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* de un tratamiento con una composición de tratamiento según la invención;
- la figura 2 es una reproducción de una fotografía que muestra la inhibición del crecimiento de un hongo patógeno por la bacteria de acuerdo con la invención;
- la figura 3 es una reproducción de una fotografía ilustrativa de la solubilización de fosfato de calcio por bacterias según la invención;
- 20 - la figura 4 es una reproducción de una fotografía ilustrativa de la estimulación del crecimiento de una planta de girasol por tratamiento de semillas de girasol con una composición líquida según la invención;
- la figura 5 es una reproducción de una fotografía ilustrativa de la estimulación del crecimiento de una planta de maíz por tratamiento de semillas de maíz con una composición líquida de acuerdo con la invención;
- 25 - las figuras 6a y 6b son reproducciones de fotografías ilustrativas de la estimulación del crecimiento de la raíz de plántulas de colza con una composición líquida que comprende bacterias según la invención;
- la figura 7 es una fotografía de un gel de electroforesis que muestra la estimulación de la expresión de la proteína PR-1 de defensa natural de plantas con una composición según la invención;
- la figura 8 es una representación gráfica del efecto de una composición según la invención sobre la estimulación del flujo de calcio y;
- 30 - la figura 9 es una representación gráfica del efecto de una composición de acuerdo con la invención sobre la expresión del gen PR-1 de una planta.

35 [0083] La cepa de *Streptomyces* depositada en la CNCM con el nº I-4467 se aisló de una muestra de la rizosfera y raíces profundas de una vid. Esta muestra de la rizosfera tomada a una profundidad de entre 10 cm y 50 cm por debajo de la superficie del suelo mediante la eliminación de la parte de superficie de la muestra se colocó en una bolsa estéril sellada y se almacenó a + 4°C antes del aislamiento de cepas de *Streptomyces*.

40 [0084] La muestra recogida se suspende en agua destilada estéril a una velocidad 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 minutos. La suspensión luego se diluye en agua destilada estéril hasta un factor de dilución de  $10^{-7}$ . 0,1 mL de esta dilución se extendió en un plato petri estéril que comprende un medio de cultivo agar sólido SEA ("extracto de suelo agar") complementario con ácido nalidixico (10 mg/L) o novobiocina (25 mg/L) como antibióticos y/o cicloheximida (40 mg/l) como antimicótico. Las placas de petri se colocan luego a la temperatura de 30°C en una incubadora durante 21 días.

45 [0085] Se aíslan las bacterias de actinomicetos por chapado, observación por microscopía de luz y reconocimiento visual de sus características morfológicas. Las bacterias actinomicetos así aisladas y purificadas se transfieren al medio Bennett para clonación. Las colonias aisladas se mantienen a 4°C durante dos meses, se retiran y se suspenden en un 20% de glicerol estéril y se colocan y almacenan a -20°C.

50 [0086] Para analizar la secuencia de ADN<sub>r</sub> 16S de bacteria a ser identificada, se cultivan dichas bacterias en medio líquido seguido de la extracción y, en particular, su ADN genómica se amplifica por PCR ("*Polymerase Chain Reaction*")- selectivamente la secuencia de ADN<sub>r</sub> 16S mediante PCR usando:

55 - un cebador universal "27f" de la secuencia SEQ ID\_NO2 siguiente:

"agagtttgat cctggctcag", y;

60 - un cebador universal "1492r" de la secuencia SEQ ID\_NO3 siguiente:

"ggttaccttg ttacgactt". A continuación se realiza una secuenciación de ADN<sub>r</sub> 16S por cualquier método conocido por un experto y se compara la secuencia de ADN<sub>r</sub> 16S obtenida con la secuencia SEQ ID\_NO1.

65 [0087] Para hacer esto, las bacterias se cultivan para identificar agitación en 100 mL del medio ISP-2 líquido ("medio ISP 2, International *Streptomyces* Project Yeast Malt Extract Agar") a 30°C durante 5 días. El micelio obtenido y el medio de cultivo se separan por centrifugación y el micelio se lava dos veces con agua bidestilada. La lisis del

micelio se lleva a cabo en 500 µL de tampón de lisis (Tris-HCl 400 mM, EDTA 60 mM, NaCl 150 mM, 1% SDS, pH 8,0) durante 10 min a temperatura ambiente. El medio de lisis a continuación, se añade 150 µL 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 vigorosamente. El medio de lisis obtenido se centrifuga a 10.000 g durante 1 minuto. El sobrenadante se recoge y se somete a una nueva etapa de centrifugación a 10.000 g durante 1 minuto. El sobrenadante se recoge y se le agrega un volumen igual de isopropanol. Después de agitarse, se centrifugó a 10.000 g durante 2 min. El ADN precipitado se lava con 300 µL de etanol al 70%, se centrifugó y después se secó al aire y se disolvió en 50 µL de agua bidestilada estéril.

**[0088]** Se lleva a cabo PCR con un (Invitrogen) necesario y de acuerdo con un perfil térmico ("Techne Touch Gene PCR Thermal Cycler"):

- desnaturalización a 98°C durante 3 min;
- adición de "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, seguido de;
- paso de extensión a 72°C durante 10 min.

**[0089]** El producto de PCR se analiza y se detecta por electroforesis en gel y se visualizó usando bromuro de etidio bajo luz ultravioleta. A continuación, se compara la secuencia de ADN<sub>r</sub> 16S de bacterias a identificarse con secuencia SEQ ID\_NO1.

**[0090]** En una primera realización de una primera variante de un método de procesamiento de un material de planta de acuerdo con la invención, la preparación de una composición de tratamiento que comprende al menos una forma vegetativa bacteria y que tiene una secuencia de ADN homóloga a más del 99% -borna excluida- con la SEQ ID\_NO1 mediante la siembra de un medio de cultivo, por ejemplo, un medio de cultivo líquido o un medio de cultivo sólido con la cepa de bacterias de inóculo depositado en la CNCM I-4467 o al menos uno de sus mutantes que tiene la secuencia de ADN SEQ ID\_NO1. El medio de cultivo puede ser un medio completo (o empírico), es decir, un medio rico indefinido que comprende todos los elementos necesarios para el crecimiento de las bacterias de la cepa depositada en la CNCM. Un volumen de un inóculo de la bacteria depositada en la CNCM se siembra en veinte volúmenes de medio completo. El cultivo se mantiene a una temperatura de 30°C con agitación durante 5 días.

**[0091]** Tal medio completo para la producción de una composición de tratamiento que comprende las bacterias en forma vegetativa incluye, por ejemplo, D-glucosa, un extracto de levadura, fosfato de potasio dibásico (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) de sulfato de amonio ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), cloruro de potasio (KCl) y glicerol a pH 7,2.

**[0092]** En una segunda realización de una primera variante de un método de procesamiento de un material de planta de acuerdo con la invención, la preparación de una composición de tratamiento que comprende al menos una bacteria en forma de esporas y que tiene una secuencia de ADN homóloga al 100% con la SEQ ID NO1 por inoculación de un medio de esporulación con un inóculo de la bacteria depositada en el CNCM bajo el n° I-4467 o uno de sus mutantes. El medio de esporulación puede ser, por ejemplo, un medio que comprende D-glucosa, extracto de levadura, peptona, carbonato de calcio (CaCO<sub>3</sub>) y agua destilada a pH 7,2. El cultivo se mantiene a una temperatura de 30°C durante 6 días.

**[0093]** En una segunda variante de un método de procesamiento de material vegetal de acuerdo con la invención, una composición libre de células se prepara por centrifugación de un medio de cultivo de acuerdo con la primera forma de realización o de un medio de esporulación de acuerdo con la segunda realización en donde las bacterias y/o esporas se eliminan sustancialmente.

#### EJEMPLO 1- Fertilización

**[0094]** Las bacterias de acuerdo con la invención ajustadas a la cepa depositada en la CNCM promueven la solubilización de nutrientes sólidos -especialmente fósforo- de un medio de cultivo. Los inventores han observado (figura 3), en un medio de cultivo de agar sólido 9 opacificado por un polvo de fosfato de calcio, la formación de un halo translúcido 10 que rodea las colonias 2 de bacterias según la invención poniendo de manifiesto la solubilización de fosfato de calcio por bacterias. Las bacterias de acuerdo con la invención permiten aumentar la disolución -en la rizosfera de plantas- de un producto fertilizante sólido asimilado por dicha planta y mejorar la nutrición de las plantas.

#### EJEMPLO 2- Estimulación del crecimiento de girasol y maíz.

**[0095]** 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 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 composición, siendo la masa de bacterias la masa de bacterias húmedas. La siembra de semillas y un cultivo de plántulas de girasol (Figura 4a) y maíz (Figura 5c) se llevan a cabo en paralelo como controles no tratados mediante una composición de acuerdo con la invención. Los inventores también han observado la estimulación del crecimiento inicial de plantas de girasol (Figura 4b) y plantas de maíz (Figura 5d). Las bacterias de acuerdo con la invención en aplicación sobre las semillas permiten estimular el crecimiento de las plantas, en particular el crecimiento de partes aéreas de plantas tales como el girasol y el maíz.

EJEMPLO 3 - Protección de hojas de vid frente a *Botrytis cinerae*

**[0096]** La aplicación sobre hojas de vid de esporas de la cepa según la invención depositada en la CNCM permite impedir/eliminar de las hojas de vid pretratadas de la aparición de los síntomas (manchas marrones en las hojas y representadas por patrón gris 1 en la figura 1b) debido al hongo *Botrytis cinerae*. La reproducción de una fotografía de hojas de vid pretratadas (Fig 1a) o no (Fig. 1b) con una composición de esporas de la bacteria de acuerdo con la invención e infectada con *Botrytis cinerae* se presenta en la figura 1. Tal aplicación permite inhibir la germinación de las esporas del hongo *Botrytis cinerae* aplicado posteriormente sobre estas hojas de vid y su desarrollo.

EJEMPLO 4 Inhibición del crecimiento de un microorganismo diana

**[0097]** Se determina y cuantifica la actividad inhibidora del crecimiento de un microorganismo diana por el método de los cilindros (Bauer et al, 1996) en donde las bacterias sin semillas de la cepa depositada en la CNCM en un medio del agar sólido de Bennett y este medio sembrado se colocan durante 5 días a 30°C para formar una composición de tratamiento sólida. Se necesita un fragmento cilíndrico, por ejemplo, una pieza cilíndrica de 6 mm de diámetro, de la composición de procesamiento sólido y se deposita este fragmento cilíndrico en la superficie de un medio de cultivo inoculado con un microorganismo diana, tal como un micro-organismo diana fitopatógeno. El medio de cultivo de micro-organismo diana puede ser por ejemplo un medio PDA ("*Potato Dextrose Agar*") para los hongos patógenos de las plantas o el medio ambiente Bennett para bacterias patógenas de las plantas. Se mantiene el fragmento cilíndrico en la superficie del medio de cultivo sembrado con el microorganismo diana durante 4 horas a 4°C para permitir la difusión de los compuestos del medio de cultivo de las bacterias según la invención en el medio sembrado con el microorganismo objetivo.

**[0098]** Se coloca el medio sembrado con el microorganismo diana durante 48 horas a 30°C. Se mide el diámetro de la zona de inhibición del crecimiento del microorganismo diana.

**[0099]** La composición de procesamiento sólida de la invención tiene una actividad inhibidora del crecimiento de bacterias y/o hongos fitopatógenos. El espectro de actividad de la composición de tratamiento sólida frente al crecimiento de microorganismos se presenta en la Tabla 3 a continuación en donde el signo (-) corresponde a la ausencia de actividad inhibidora, el signo (+) corresponde a un diámetro de inhibición de entre 10 mm y 15 mm, el signo (++) corresponde a un diámetro de inhibición de entre 15 mm y 20 mm y el signo (+++) corresponde a un diámetro de inhibición mayor a 20 mm.

Tabla 3

Microorganismo diana	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>	-

**[0100]** En estas condiciones, el diámetro de inhibición del crecimiento micelial de la cepa *Botrytis cinerea* por la cepa según la invención es de 28 mm, el diámetro de inhibición del crecimiento del micelio de la cepa de *Fusarium culmorum* es de 30 mm y el diámetro de inhibición del crecimiento del micelio de la cepa *Pythium ultimum* es de 26 mm. Las bacterias de acuerdo con la invención tienen ventajosamente capacidades inhibidoras del crecimiento de agentes fitopatógenos de vid, por ejemplo, *Phaeomoniella chlamydospora*, *Phaeomoniella aelophilum*, *Eutypa lata*, *Fomitiporia mediterranea* y *Botryosphaeria obtusa*.

**[0101]** La composición de procesamiento sólida que comprende bacterias de la cepa depositada en la CNCM posible para limitar el desarrollo de agentes fitopatógenos bacterianos o fúngicos.

5 **[0102]** Se visualiza en la Figura 2 la inhibición a gran distancia del crecimiento del micelio 8 del hongo *Phaeoconiella chlamydospora* seleccionado como agente patógeno de la madera de la vid por bacterias 2 de la cepa depositada de acuerdo con la invención en la CNCM en comparación con la inhibición del crecimiento del micelio del hongo 8 *Phaeoconiella chlamydospora* por cepas 3, 4 y 5 de recogida por separado de la cepa según la invención. Debe observarse que las cepas 7 y 8 de recolección no inhiben el crecimiento del micelio 8 del patógeno. Las bacterias de acuerdo con la invención permiten limitar el desarrollo de agentes fitopatógenos bacterianos o fúngicos.

EJEMPLO 5 - Estimulación de las defensas naturales (SDN) de *Arabidopsis thaliana*.

15 **[0103]** Se cultivan bacterias del género *Streptomyces* de la cepa depositada en la CNCM con el nº I-4467 en un medio de cultivo líquido deficiente adaptado para estimular la producción de esporas y durante un tiempo suficiente para permitir el crecimiento de dicha cepa. Se obtiene un precultivo de crecimiento de fase estacionaria que comprende entre 1 y 2 g de bacterias por litro de precultivo, siendo la masa de bacterias la masa de la bacteria húmeda. Luego se forma una composición de tratamiento de acuerdo con la invención diluyendo un volumen del precultivo en 100 volúmenes de agua. Se pone en contacto las raíces de las plantas de semillero de *Arabidopsis thaliana* con la composición de tratamiento que comprende la bacteria de acuerdo con la invención, luego dichas plántulas se siembran en medio de cultivo Gamborg B5 agar previamente sembrado con una suspensión de esporas de *Botrytis cinerae* como un agente fitopatógeno (a una concentración de 10<sup>5</sup> unidades formadoras de colonias ('unidad formadora de colonias, ufc'). El medio de cultivo sembrado se coloca en una cámara a 25°C.

25 **[0104]** Después de una semana, encontramos que el tratamiento preventivo de acuerdo con la invención de las plantas de semillero de *Arabidopsis thaliana* por la composición de tratamiento que comprende la bacteria según la invención hace que sea posible evitar el efecto de *Botrytis cinerae* al prevenir la germinación (efecto sistémico) y estimular las defensas naturales de las plántulas de *Arabidopsis thaliana* frente a *Botrytis cinerae*. Como control, se cultivan plántulas de *Arabidopsis thaliana* no tratadas con la composición de tratamiento según la invención en un medio nutriente de cultivo Gamborg B5 agar previamente sembrado con una suspensión de esporas de *Botrytis cinerae*.

35 **[0105]** En la medición de la expresión de genes de defensas de plántulas de *Arabidopsis thaliana* por RT-PCR y en particular la expresión del gen PR-1 ("proteína relacionada con la patogénesis de tipo 1") responsable de la síntesis de compuestos antifúngicos en plantas. Se analiza la activación de los genes de las plántulas de *Arabidopsis thaliana* después de 10 días de cultivo de plántulas de *Arabidopsis thaliana*. Para hacer esto, el extracto de ARN mensajero (ARNm) de las plántulas (control y el tratamiento preventivo de acuerdo con la invención), convierte el ARNm en ADNc (ADN complementario) utilizando el kit "SuperScript™ II RNase H Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, EE.UU.) y un oligo cebador (dT)22.

**[0106]** Se amplifica la PR-1 de ADNc específico mediante PCR usando los siguientes cebadores específicos:

- "PR-1 f" de la secuencia SEQ ID\_NO4 siguiente:

45 5'-CTGGCTATTCTCGATTTTTAATCG-3', y;

- "PR-1 r" de la secuencia SEQ ID\_NO5 siguiente:

50 5'-TCCTGCATATGATGCTCCTTATTG-3'.

**[0107]** Se amplifica aún más, como control de la expresión, las ADNc específicas del gen EF-1αA4 (Liboz et al, (1990), Plant Mol. Biol., 14, 107-110. *the four members of the gene family encoding the Arabidopsis thaliana translation elongation factor EF-1( are actively transcribed)* por PCR usando los siguientes cebadores específicos:

55 - "EF-LF" de la secuencia SEQ ID\_NO6 siguiente:

5'-ATGCCCCAGGACATCGTGATTTC-3', y;

- "EF-lr" de la secuencia SEQ ID\_NO7 siguiente:

60 5'-TTGGCGGCACCCTTAGCTGGATCA-3'.

**[0108]** Los productos de PCR se analizaron por electroforesis en gel y se visualizaron bajo luz ultravioleta en presencia de bromuro de etidio. Los resultados se dan en la figura 7. Hay una estimulación de la expresión de PR-1 de genes en plántulas de *Arabidopsis thaliana* tratados con la composición de tratamiento (A2) en comparación con las plantas de semillero de control de *Arabidopsis thaliana* sin tratar (A1) por la composición de tratamiento en la que

la expresión de PR-1 es indetectable.

**[0109]** Se observa una estimulación de la expresión (B) del gen PAL 1 en plántulas de *Arabidopsis thaliana* tratadas con la composición de tratamiento (B4) en comparación con las plantas de semillero de *Arabidopsis thaliana* sin tratar (B3) por la composición de tratamiento, y se sabe que dicho gen PAL 1 constituye un marcador molecular y un control positivo de la estimulación de las defensas naturales de las plantas.

**[0110]** Se observa para el gen EF1 $\alpha$ 4 (control negativo para la normalización del nivel de expresión de genes), una expresión sustancialmente sin cambios en las plantas de semillero de *Arabidopsis thaliana* (C5) no tratadas con la bacteria del género *Streptomyces* y en plantas de semillero de *Arabidopsis thaliana* (C6) procesadas por la bacteria del género *Streptomyces*.

**[0111]** El tratamiento de las plantas de semillero de *Arabidopsis thaliana* por la bacteria del género *Streptomyces* conduce a la activación del gen PR-1, la producción de antibióticos de plantas, para la producción de fito-alexines y compuestos para mejorar las paredes de células de plantas.

EJEMPLO 6 - Estimulación de las defensas naturales (SDN) de *Arabidopsis thaliana* - estimulación del flujo de calcio

**[0112]** Se mide por luminiscencia el flujo de calcio inducido por el tratamiento de plantas de semillero de *Arabidopsis thaliana* con una composición de tratamiento obtenida por dilución en un factor 10x o 100x en un factor de precultivo descrito en el Ejemplo 5. Los resultados se muestran en la figura 8. 20 minutos después del tratamiento con la composición de tratamiento diluida 100x (B), se observa un aumento del flujo de calcio en un factor de 2,7 en comparación con un tratamiento con agua (A).

**[0113]** También se observa 20 minutos después del tratamiento con la composición de tratamiento (D) diluida 10x, un aumento de flujo de calcio en un factor de 11,6 en comparación con un tratamiento de agua (A) y por un factor de 2,3 en comparación con un tratamiento con un control positivo (C) de inducción de las defensas naturales de las plantas y que comprende un extracto parietal del oomiceto patógeno *Phytophthora parasitica*.

**[0114]** Las composiciones de tratamiento diluidas 10x o 100x de acuerdo con la invención activan las primeras etapas de las defensas naturales de las plantas.

EJEMPLO 7 Expresión de PR-1 a las 48 horas después del tratamiento con una composición de tratamiento según la invención

**[0115]** La fluorimetría se analiza 48 horas después del tratamiento con una composición de tratamiento diluida 100x como se describe en el Ejemplo 5, el nivel de expresión del modelo de gen PR-1 de *Arabidopsis thaliana* transgénico. Los resultados se dan en la figura 9. Un aumento en el nivel de expresión del gen PR1 (expresado en unidades de fluorescencia por mg de proteína) de la planta tratada con la composición de tratamiento de acuerdo con la invención y diluida 100 veces (C) en un factor de 16 en relación con el nivel de expresión del gen PR 1 de la planta tratada con agua (A) y en un factor de 4,4 en relación con el nivel de expresión del gen PR 1 de la planta tratada por un control positivo (B) de inducción de las defensas naturales de las plantas y de la inducción de las defensas naturales de las plantas y que comprende un extracto parietal del oomiceto patógeno *Phytophthora parasitica*.

EJEMPLO 8 - Protección de plántulas de *Arabidopsis thaliana* con respecto a *Colletotrichum higginsianum*

**[0116]** Mediante la luminiscencia se evalúa la protección proporcionada por la composición libre de células de acuerdo con la invención con respecto a una infección con *Colletotrichum higginsianum* en plántulas de *Arabidopsis thaliana*. Se prepara una composición libre de células de acuerdo con la invención mediante dilución con un factor 10x de un precultivo de bacterias de acuerdo con la invención y que comprende 1 mg de biomasa por mL de precultivo. Se lleva a cabo un tratamiento de termización (15' a 90°C) de la composición acelular de acuerdo con la invención. La aplicación de esta composición libre de células durante 48 horas en la planta de semillero tratada térmicamente de *Arabidopsis thaliana* de edad de 3 semanas y las plantas fueron inoculadas con *Colletotrichum higginsianum*. Se observa protección contra *Colletotrichum higginsianum* que se mejora (1600 rfu) en comparación con un control negativo (2000 rfu). La protección conferida por la composición térmicamente acelular es sustancialmente equivalente a la protección conferida por la composición acelular no térmica.

**[0117]** Se entiende que la invención puede ser objeto de muchas realizaciones alternativas y aplicaciones.

LISTA DE SECUENCIAS

**[0118]**

SEQ ID\_NO1

ES 2 678 018 T3

tagtggcgaa cgggtgagta acacgtgggc aatctgccct gcactctggg acaagccctg 60  
 5 gaaacgggggt ctaataccgg atatgacacg ctcccgcatt ggatgcgtgt ggaaagctcc 120  
 ggcggtgcag gatgagcccc cggcctatca gcttgttggg ggggtgatgg cctaccaagg 180  
 10 cgacgacggg tagccggcct gagaggggga cgggccacac tgggactgag acacggccca 240  
 gactcctacg ggaggcagca gtgggggaata ttgcacaatg ggcgaaagcc tgatgcagcg 300  
 acgccgcgtg agggatgacg gccttcgggt tgtaaacctc ttccagcagg gaagaagcga 360  
 15 gagtgcaggt acctgcagaa gaagcggcgg ctaactacgt gccagcagcc gcggtataac 420  
 gtagggcgca agcgttctcc ggaattattg ggcgtaaaga gctcgtaggc ggcttctcgc 480  
 20 gtcggatgtg aaagccccgg gcttaacccc gggctctgat tegatacggg caggctagag 540  
 ttccgtaggg gagatcggaa ttcttggtgt agcggtgaaa tgcgcagata tcaggaggaa 600  
 caccggtggc gaagggcggat ctctgggccc atactgacgc tgaggagcga aagcgtgggg 660  
 25 agcgaacagg attagatacc ctgtagtcc acgccgtaaa cgttgggaac taggtgtggg 720  
 cgacattcca cgtcgtccgc gccgcageta acgcattaag ttccccctt ggggagtagc 780  
 30 gccgcaagge taaaactcaa aggaattgac ggggggcccc cacaagcggc ggagcattgt 840  
 gcttaattcg acgcaacgcg aagaacctta ccaagcctt acatacacc ggaaacctct 900  
 ggagacaggg gcccccttg ttgtcgggtt acaggtggtg catggcttct cgtcagctcg 960  
 35 tctcgtgaga tgttgggta agtccccgca acgagcggaa ccttcttct gtgttgcag 1020  
 catgccttcc gggggntgat ggggacttnc acaggagact gccggggtca actcggagga 1080  
 40 aggtggggac gacgtcaagt catcatgecc cttatgtctt gggetgcaca cgtctctaaa 1140  
 tggccggtag aatgagctgc gaagccgtga ggtggagcga atctcaaaaa gccggtctca 1200  
 gttcggattg gggctctgca ctcgaccca tgaagtcgga gtcgctagta atcgcagatc 1260  
 45 agcattgctg cgggtgaatac gtccccggc cttgtacaca ccgcccgta cgtcacgaaa 1320  
 gtcggttaaca cctgaa 1336

50 SEQ ID\_NO2  
 agagttgat cctggctcag 20

55 SEQ ID\_NO3  
 ggttaccttg ttaccgactt 19

SEQ ID\_NO4  
 ctggctattc tcgatttta atcg 24

60 SEQ ID\_NO5  
 tctgcatat gatgctcctt attg 24

SEQ ID\_NO6  
 atgccccagg acatcgtgat ttca 24

65 SEQ ID\_NO7

ES 2 678 018 T3

ttggcggcac ccttagctgg atca 24

SEQ ID\_NO8

5 ttggccgcct cgcgcaacgc ctgactgcc aatacgaaca atggcgccag caccgccccg 60  
ctgcgcatct cctttgcgaa gatcagggag cctctcgagg ttccgaacct cctcgcgctg 120  
10 cagaccgaga gcttcgattg gctgctcggc aatgccgcct ggaaggctcg cgtcgaggct 180  
gcgctggaca gcggtcagga cgtccccacc aagtccggtc tggaaagat cttegaggag 240  
15 atctccccga tegaggactt ctccgggtcg atgtccctga ctttccgtga tcaccgtttc 300  
gagccgccga agaactcgat cgacgagtgc aaggagcgtg acttcaccta cgccgctccg 360  
ctcttcgtea cggccgagtt caccaacaac gagaccggcg agatcaagtc ccagacggtc 420  
20 ttcatgggcg acttcccgt catgaccgac aagggcacct tctgcatcaa cggcaccgag 480  
cgtgtcgtcg tctcgcagct ggtccgctcg ccgggtgtct acttcgactc ctccatcgac 540  
25 aagacgtccg acaaggacat cttctccgtc aaggatcc cgtcccgggg tcctggctg 600  
gagatggaga tcgacaagcg tgacatggtc ggtgtgcgta tcgaccgcaa gcgcaagcag 660  
30 tccgtaccg ttctctgaa ggctctcggc tggacgaccg agcagatcct ggaggagttc 720  
ggcgagtacg agtcgatgcg cgccaccctg gagaaggacc acaccaggg ccaggacgac 780  
gcgctgctcg acatctaccg caagctgcgt ccgggcgagc cccccacag ggaggccgcg 840  
35 cagacgtgc tcgagaacct ctactcaac ccgaagcgt acgacctcgc gaaggtcggc 900  
cgctacaagg tcaacaagaa gctgggttcg gccgctccgc tggacgcggg cgtctgacg 960  
40  
45  
50  
55  
60  
65

ES 2 678 018 T3

5 gtcgaggacg tcategctc gatcaagtac ctggtgaagc tgcacgccgg tgagaccgag 1020  
 accgtcgggg acaacggcca gtccgtggtc gtcgagaccg acgacatcga ccactteggc 1080  
 aaccgccgta tccgtaacgt cggcgagctg atccagaacc aggtccgcac gggctctggc 1140  
 10 cgtatggagc ggcctgtgcg tgagcgcacg acgactcagg acgtcgaggc gatcacgccg 1200  
 cagaccctga tcaacatccg gccggctgic gcctccatca aggagttctt cggcaccagc 1260  
 cagctgtcgc agttcatgga ccagacgaac ccgctgtcgg gtctgacca caagcgcctt 1320  
 15 ctgaacgcgc tcggccccgg tggctctcc cgtgagcggg cgggcttcca ggtccgtgac 1380  
 gtgcaccctg cgcactacgg ccgcatgtgc ccgactgaga cgcgccgaagg cccgaacatc 1440  
 ggtctgatcg gctcgcctgc ctctacggc cgggtcaac cgttcggttt catcgagacc 1500  
 20 ccgtaccgca aggtcgtcga cggctgtcgc accgacgacg tegactacct gacggccgat 1560  
 gaagaggacc gctcgtcat cgcgcaggcc aacgccccgc tcgcccacga cctgcgcttc 1620  
 gccgagaacc ggtcctgggt ccgccgccgt ggcggcgagg tegactacat ccccggcgac 1680  
 25 gacgtcgact acatggacgt ctaccgcgc cagatgggtg cggctgcgac cgggatgac 1740  
 cccttctcg agcacgacga cccaaccgc gcgctcatgg gctcgaacat gatcgccag 1800  
 gccgtgccgc tgatcaaggc ggagtcccc ctggteggca ccggcatgga gtaccgctgt 1860  
 30 gccgtcgacg ccggcgacgt catcaaggcc gagaaggacg gtctcgtcca ggaggtctcc 1920  
 gccgactacg tgacggtggc caacgacgac ggcacctaca ccacctaccg ggtggccaag 1980  
 35 ttctcccgt ccaaccaggg cacctccttc aaccagaagg tcgtcgtgga cgagggtgcg 2040  
 cgggtgatcg ccggccaggt gctggccgac ggccttcca ccgaggacgg cgagatggcg 2100  
 ctccgcaaga acctctgggt ggcgttcatg ccgtgggagg gccacaacta cgaggacgcg 2160  
 40 atcactctca gccagcgtct ggtcaggac gacgtctct cctcgatcca catcgaggag 2220  
 cacgaggctc atgccccgta caccaagctc ggccccgagg agatcacccg ggacatcccg 2280  
 45 aacgtctccg aggaggtcct cgcggacctc gacgagcgcg gcatcatccg gatcgggtcc 2340  
 gaggtcgtcg ccggcgacat cctggtcggc aaggtcacce cgaagggcga gaccgagctg 2400  
 accccggagg agcggctgct gcgcgcgac ttcggtgaga aggccctga ggtccgtgac 2460  
 50 acctcgtga aggtccgca cggtagate ggcaaggta tcggcgtccg cgtcttcgac 2520  
 cgcgaagagg gccacgaact gcccccggc gtgaaccagc tggctccgt ctactggcg 2580  
 cagaagcgca agatcaccca tggtagaag ctgcccgcc gtcacggcaa caagggcgtc 2640  
 55 atctcaaga tctgccggt cgaggacatg ccgttctgg aggacggcac cccggtcgac 2700  
 atcactctca acccgctggg tgtcccgtcc cgaatgaacc cgggacaggt cctggagatc 2760  
 60 cacctgggct ggctggctc ccggcgctg aaggtcagg gctccgagga ctggatcgac 2820

65

ES 2 678 018 T3

5 cggtccagg ccacggcgc cgacgaggtc gageccggca ccaacgtgc gacccggtc 2880  
 ttcgacggcg cccgcgagga cgagatgcc ggtctctcg actcgacgat cccgaaccgc 2940  
 gacggcgacc gcctggtcca gtcgtccggc aaggccggc tctcgacgg ccgctccggc 3000  
 10 gagccgttc cggagccgat ctgggtcggc tacatgtaca tctcaagct gcaccacgtg 3060  
 gtggacgaca agctgcacgc ccggtccacc ggtccgtact cgatgatcac ccagcagccg 3120  
 ctgggtgta agctcagtt cgggtggccag cgcttcgggt agatggaggt gtgggcgctg 3180  
 15 gaggcttatg gcgcccgta cggcctccag gagctgctga ccatcaagtc cgacgacgtg 3240  
 accggcccg tgaaggtcta cgaggccatc gtaagggcg agaacattcc cgagcccggc 3300  
 20 atccccgagt ccttcaaggt gctcatcaag gagatgcagt cctgtgcct caacgtggag 3360  
 gtgtgtctg ccgacggcat gtccatcgag atcgcgaca ccgacgagga cgtctccgc 3420  
 gctcggagg agctcggat cgacctgtcc cggcgcgagc cgagcagcgt cgaagaggtc 3480  
 25 tga 3483

SEQ ID\_NO9

30  
 35 gtgtgtgcc agaaagggcg ctctgtggcc gattccggca accccatcga aaacatccc 60  
 tccacgccc acgacgaggc cctggctccg ccgtcgtacg acgccagtgc gattaccgtc 120  
 ctggaagggc tggaggcggc ccgcaagcga cccggtatgt acatcggttc caccggtgag 180  
 40 cgcggcctgc accatctcgt ccaagaggtc gtcgacaact ccgtcgacga ggccatggcc 240  
 ggtcacgcgg acagcatcga ggtcacgac ctccggcagc gcggcgtccg cgtcgtggac 300  
 aacggcccg ggatccccgt gggcatcgtc cctcggagg ggaagccggc tgtggaggtc 360  
 45 gtgtgaccg tctcgcacgc gggcggcaag ttcggcggcg gcggctacgc cgtctccggc 420  
 ggtctgcacg gcgtcggcgt ctccgtcgtc aacgccctgt cctcgaaggt gtcggtcgag 480  
 50 gtaagacgg acggctaccg ctggaccag gactacaaga cgggagcgc gaccgcgcc 540  
 ctggcccga acgaggccac ggaggagacc ggcaccacgg tcacctctg ggcggaccg 600  
 gacgtctcg agaccaccga gtactcctc gagacgtcg cccggcgtt ccaggagatg 660  
 55 gcgttctca acaagggcct gtcgatctc ctaaggacg agcgcgaggc ccatgtggac 720  
 gaggagggca agccgtctc cgtgaagtac cactacgagg gcggcatcgt cgacttcgtg 780  
 acctacctca actcccgca gggcgagctg gtccaccca cggatgacgg gttcgaggcc 840  
 60 gaggacaagg agcggatgct ctccctcgag atcgcgatgc agtggaacac ccagtacacc 900  
 gagggtgtct acagctcgc gaacaccatc cacaccatg agggcggcac ccacgaggag 960  
 65 ggcttccgc ccgcgtgac gtacctgatc aacaagtac cgcgcgaca gaagctgctc 1020

ES 2 678 018 T3

cgggagcgtg acgacaacct caccggtgag gacatccgcg agggcctgac cgccatc 1080  
 5 tcggtcaagc tgggcgagcc gcagttcgag ggccagacca agaccaagct gggcaacacg 1140  
 gaggccaaga ccttcgtcca gaagatcgtc aacgagcadc tgcgcgactg gctggaccgt 1200  
 aaccctaagc aggcggcgga catcgtccgc aaggggatcc aggcggcgac ggcccgggtc 1260  
 10 gcggcccgta aggcggcgga tctgaccgcg cgttaaggggc tgcggagac cgcgtcgtg 1320  
 ccgggcaagc tgagcgactg ccagtccaat gaccgctcga agtgcgagat cttcatcgtc 1380  
 gagggtgact ccgcccggcg ctcggccaag tccggccgta acccgagta tcaggcgatc 1440  
 15 ctcccgatcc gcggcaagat cctcaacgtg gagaaggccc gggtcgacaa gatcctgcag 1500  
 aacaacgagg tccagcgct gatctccgc ttcggcaccg gggtgcacga ggacttcgac 1560  
 atgccaagc tccgctatca caagatcatt ctgatggcgg acgcccgatgt cgacggccag 1620  
 20 cacataaaca cctcgtcgt gacctcctc tccgcttca tgcgcccgt ggtcggggc 1680  
 gggcatgct tctctcccg tccgcccgc tacaagatca agtggggccg ggacgactc 1740  
 gagtacgct actcggaccg ggagcgggac gcgctgatcc aggtcggccg tgaacagggc 1800  
 25 aagcgatca gggacgact ggtccagcgc ttcaagggtc tgggcgagat gaacggcga 1860  
 gagctcgggg tcaccacgat ggaccccgac caccgctcc tgggcccaggf caccctggac 1920  
 30 gagcggggc aggcggacga cctgtctcg gtcctgatgg gtgaggacgt cgaggcacgg 1980  
 cgctcgttca tccagcgca cccaaggat gtccgcttc tcgacatctg a 2031

SEQ ID\_NO10

35 ggcgatcggc cgaacgagcc ggtcggagtc atccccaccg ggtcgaccgc tctcgacgtc 60  
 gccctcggcg tcggcggctt gccgcgcgcg cgggtggtcg aggtctacgg ccccagatcc 120  
 40 tccggtaaga cgacctgac cctgcacgcg gtggccaatg cccagcgggc cggcggcacc 180  
 gttcccttcg tggacgcccga gcacgcctc gacctgact acgcccagaa gctgggctg 240  
 45 gacaccgact cctgatcct gtcccagccg gacaacggcg agcaggcgt cgagatcgtg 300  
 gacatcctgg tccctccg cgcccctgac ctcactcga tcgactccgt cggcccctg 360  
 gtcccgcgcg cggagatcga gggcgagatg ggcgactccc acgtcggcct ccaggcccgg 420  
 50 ctgatgagcc aggcgctccg taagatcacc agcgcgctca accagtcaa gaccaccgcg 480  
 atcttcatca accagctccg cgagaagatc ggcgtgatgt tcggctcgc ggagaccacg 540  
 accggtggcc gggcgtgaa gttctacgcg tcggtgcgca tcgacatccg ccgcatcgag 600  
 55 acccicaagg acggcaccga cgcggtcggc aaccgcacc gcglcaaggt cglcaagaac 660  
 aaggctcgcg cggccttcaa gcaggccgag ttcgacatcc tctacggcca gggcatcagc 720  
 60 cgtgaggcgc gctgatcga catggcgtc gacacggct tctccgcaa gtccggtgcc 780  
 tggfacacct acgaggcga ccagctcggc cagggcaagg agaacgccc caactcctg 840  
 aaggacaacc ccgatctcgc caatgagatc gagaagaaga tcaaggaaaa gctcggcatc 900  
 65 ggggtgaggc cccaggacc ggcggcgcg gcaccacca cggacgcggc tgggtcccgcg 960  
 ggcgtgaccg acggcgacc ggcaaggcc 990



5 gtggcctccg gccgcgtcgc gggggtcadc gggccggtcg tegacgtgga gttccccgtc 60  
 gacgcgatgc cggagatcta caacgcgctg caggtcgagg tcgccgacct ctcccaggag 120  
 10 ggggcgaaga agaccctgac cctcgaggtc gcccagcacc tcggcgaggg cctggtccgc 180  
 gccatctcca tggagcccac cgacggcctg gtccgccagg ccgcggtgac cgacaccggc 240  
 gacggcatca cggtgccggt cggcgatgac accaagggcc ggggtgtcaa caccctcggc 300  
 15 aagatctca acgagcccga ggccgagtc gaggtcaccg agcgtggtc catccaccgc 360  
 aaggccccgg ccttcgacca gctcgagtcc aagaccgaga ttttcgagac cggcctgaag 420  
 20 gtcgtcgacc tgctgacccc gtacgtcaag ggcggcaaga tcggtctgtt cggcggcgcg 480  
 ggcgtcggca agaccgtgct catccaggaa atgatcatgc gtgtggccaa gctgcaccag 540  
 ggcgtttccg ttttcgcccg tctcggcgag cgcaccctg agggcaacga cctgatcgag 600  
 25 gagatggccg agtccggcgt gctcccgcag accgcgtgg tcttcggcca gatggatgag 660  
 cccccggca cccgtctgag cgtcggcctg gccggtctga ccatggcgga gtacttccgc 720  
 30 gatgtgcaga agcaggacgt gctgttttc atcgacaaca ttttcgctt caccagccc 780  
 ggttccgagg tctcgacct gctcggccgg atgccctccg cggtgggcta ccagcccgaac 840  
 35 ctggccgacg agatgggcat cctgcaggag cgcacacct cgaccctgg tcaactcgatc 900  
 acctcgatgc aggcgatcta cgtccccgcg gacgacctga ccgaccggc cccggcgacc 960  
 40 accttcgagc acctcgacgc gaccacggtg ctctcccggc cgatctcgga gaagggcate 1020  
 taccggcggg tggaccgct ggactcgacg tcccggatcc tggaccgcg ctacatctcg 1080  
 caggagcact acgactgcgc ctgcgcgtg aagtcgatcc tgcagaagta caaggacctc 1140  
 45 caggacatca tcaacatctt gggcatcgac gagctcggcg aggaggaaa gctcaccgtc 1200  
 ttccgcgccc gccggatcga gcgcttctg tcgcagaaca cccacgcggc gaagcagttc 1260  
 50 accggcctcg accgatcggg tgtcccgtg gacgagtcca tcggcgcgtt caacgcgatc 1320  
 gccgatggtg agttcgacca ctccccgag caggcgttct tcatgtcgg tggcctggac 1380  
 gacctcaagg ccaaggccaa ggagctgggc gtctctga 1419

LISTADO DE SECUENCIAS

[0119]

- 60 <110> AGRONUTRICIÓN CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE LA UNIVERSIDAD PAUL  
 SABATIER TOULOUSE III
- <120> USOS DE UNA NUEVA CEPA DE *STREPTOMYCES*
- 65 <150> FR1359181  
 <151> 2013-09-24

ES 2 678 018 T3

<160> 12

<170> BiSSAP 1.0

5 <210> 1  
 <211> 1336  
 <212> ADN  
 <213> *Streptomyces*

10 <220>  
 <221> fuente  
 <222> 1..1336  
 <223>/mol\_type = "ADN"/organismo = "*Streptomyces*"

15 <400> 1

	tagtggcgaa cgggtgagta acacgtgggc aatctgccct gcaactctggg acaagccctg	60
20	gaaacggggt ctaataccgg atatgacacg ctcccgcacg ggatgcgtgt ggaaagctcc	120
	ggcggtgcaag gatgagcccg cggcctatca gcttggttggg ggggtgatgg cctaccaagg	180
	cgacgacggg tagccggcct gagagggcga ccggccacac tgggactgag acacggccca	240
25	gactcctaag ggaggcagca gtggggaata ttgcacaatg ggcgaaagcc tgatgcagcg	300
	acgccgcgtg agggatgacg gccttcgggt tgtaaacctc tttcagcagg gaagaagcga	360
30	gagtgcagggt acctgcagaa gaagcgccgg ctaactacgt gccagcagcc gcggttaatac	420
	gtagggcgca agcgttgtcc ggaattattg ggcgtaaaga gctcgtagge ggcttgtgc	480
	gtcggatgtg aaagccggg gcttaacccc gggctctgcat tcgatacggg caggctagag	540
35	ttcggtaggg gagatcggaa ttccctgggtg agcggtgaaa tgcgcagata tcaggaggaa	600
	caccgggtggc gaagcgggat ctctgggccc atactgacgc tgaggagcga aagcgtgggg	660
	agcgaacagg attagatacc ctggtagtcc acgccgtaaa cgttgggaac taggtgtggg	720
40	cgacattcca cgtcgtccgc gccgcagcta acgcattaag ttccccgcct ggggagtacg	780
	gccgcaaggc taaaactcaa aggaattgac ggggggccc cacaagcggc ggagcatgtg	840
45	gcttaattcg acgcaacgag aagaacctta ccaaggcttg acatacacc ggaaacctct	900
	ggagacaggg gcccccttg tggtcgggtg acaggtggtg catggcttgt cgtcagctcg	960
	tgctgtgaga tgttgggta agtccccgca acgagcga cccttgttct gtgttgccag	1020
50	catgccttcc ggggntgat ggggacttnc acaggagact gccgggtca actcggagga	1080
	aggtggggac gacgtcaagt catcatgccc cttatgtctt gggctgcaca cgtgctacaa	1140
55	tggccggtac aatgagctgc gaagccgtga ggtggagcga atctcaaaa gccggtctca	1200
	gttcggattg gggctgcaa ctgcacccca tgaagtcgga gtcgctagta atcgcagatc	1260
	agcattgctg cggatgaatac gttccccggc cttgtacaca ccgcccgtca cgtcacgaaa	1320
60	gtcggtaaca cctgaa	1336

65 <210> 2  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> *Streptomyces*

ES 2 678 018 T3

5  
 <220>  
 <221> fuente  
 <222> 1.20  
 <223>/mol\_type = "ADN" /nota="cebador universal 27 f" /organismo="Streptomyces"

<400> 2  
 agagtttgat cctggctcag 20

10  
 <210> 3  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> *Streptomyces*

15  
 <220>  
 <221> fuente  
 <222> 1..19  
 <223>/mol\_type = "ADN" /nota="cebador universal 1492r" /organismo="Streptomyces"

20  
 <400> 3  
 ggttaccttg ttacgactt 19

25  
 <210> 4  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> *Streptomyces*

30  
 <220>  
 <221> fuente  
 <222> 1..24  
 <223>/mol\_type = "ADN" /nota="cebador universal PR-1" /organismo="Streptomyces"

35  
 <400> 4  
 ctggctattc tcgatttta atcg 24

40  
 <210> 5  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> *Streptomyces*

45  
 <220>  
 <221> fuente  
 <222> 1..24  
 <223>/mol\_type = "ADN" /nota="cebador universal PR-1 r" /organismo="Streptomyces"

50  
 <400> 5  
 tcctgcatat gatgctcctt attg 24

55  
 <210> 6  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> *Streptomyces*

60  
 <220>  
 <221> fuente  
 <222> 1..24  
 <223>/mol\_tipo = "DNA"/nota="cebador EF1 f"/organismo = "*Streptomyces*"

65  
 <400> 6  
 atgccccagg acatcgtgat ttca 24

<210> 7  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> *Streptomyces*

<220>

# ES 2 678 018 T3

<221> fuente  
<222> 1..24  
<223>/mol\_type = "ADN"/nota = "cebador EF1 r"/organismo = "Streptomyces"

5 <400> 7  
ttggcggcac ccttagctgg atca 24

10 <210> 8  
<211> 3483  
<212> ADN  
<213> *Streptomyces*

15 <220>  
<221> fuente  
<222> 1..3483  
<223>/mol\_type = "ADN"/nota = "rpoB"/organismo = "Streptomyces"

<400> 8

20	ttggcggcac ccttagctgg atca 24	60
	ttggcggcct cgcgcaacgc ctcgactgcc aatacgaaca atggcgccag caccgcccgc	60
	ctgcgcatct cctttgcgaa gatcagggag cctctcgagg ttccgaacct cctcgcgctg	120
25	cagaccgaga gcttcgattg gctgctcggc aatgccgcct ggaaggctcg cgtcgaggct	180

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 678 018 T3

5  
 10  
 15  
 20  
 25  
 30  
 35  
 40  
 45  
 50  
 55

gogctggaca ggggtcagga cgtccccacc aagtccggtc tggaagagat ctccgaggag 240  
 atctccccga tcgaggactt ctccgggtcg atgtccctga ctttccgtga tcaccgtttc 300  
 gagccgccga agaactcgat cgacgagtg c aaggagcgtg acttcaceta cgcgcgtccg 360  
 ctcttcgtca cggccgagtt caccaacaac gagaccggcg agatcaagtc ccagaccgtc 420  
 ttcctgggcg acttcccgtt catgaccgac aagggtcacct tctgcatcaa cggcaccgag 480  
 cgtgtcgtcg tctcgcagct ggtccgctcg ccgggtgtct acttcgactc ctccatcgac 540  
 aagacgtccg acaaggacat ctctccgtc aagggtcatcc cgtcccgggg tgcctggctg 600  
 gagatggaga tcgacaagcg tgacatggtc ggtgtgcgta tcgaccgcaa gcgcaagcag 660  
 tccgtcaccg ttctcctgaa ggctctcggc tggaccgacc agcagatcct ggaggagttc 720  
 ggcgagtacg agtcgatgcg cgcaccctg gagaaggacc acaccaggg ccaggaccgac 780  
 gogctgctcg acatctaccg caagctcgtt ccgggcgagc cccccacacg ggaggcccg 840  
 cagaccgtgc tcgagaacct ctacttcaac ccgaagcgtt acgacctcgc gaaggtcggc 900  
 cgctacaagg tcaacaagaa gctgggttcg gcgctccgc tggaccggg cgtcctgacg 960  
 gtcgaggacg tcatgcctc gatcaagtac ctggtgaagc tgcacgccg tgagaccgag 1020  
 accgtcgggg acaacggcca gtccgtggtc gtcgagaccg acgacatcga ccacttcggc 1080  
 aaccgccgta tccgtaacgt cggcgagctg atccagaacc aggtccgcac ggtctgccc 1140  
 cgtatggagc gcgtcgtgcg tgagcgcctg acgactcagg acgtcagggc gatcacgccg 1200  
 cagaccctga tcaacatccg gccgggtcgt gcctccatca aggagtctct cggcaccagc 1260  
 cagctgtcgc agttcatgga ccagaccgac ccgctgtcgg gtcctgacca caagcgcctt 1320  
 ctgaacgcgc tcggccccgg tggctctctc cgtgagcggg cgggcttcga ggtccgtgac 1380  
 gtgcaccctg cgcactacgg ccgcatgtgc ccgatcgaga cgcgccgaagg cccgaacatc 1440  
 ggtctgatcg gctcgtcgc ctcgtacggc cgggtcaacg cgttcggttt catcgagacc 1500  
 ccgtaccgca aggtcgtcga cgggtgtcgt accgaccgac tcgactacct gacggccgat 1560  
 gaagaggacc gcttcgtcat cgcgcaggcc aacgccccgc tcgaggacga cctgcgcttc 1620  
 gccgagaacc gcgtcctggt ccgcccgggt ggcggcgagg tcgactacat cccggcgac 1680  
 gacgtcgact acatggacgt ctccaccgac cagatggtgt cggtcgacac ccgatgatc 1740  
 cccttctctg agcaccgaca cgcacaaccg gcgctcatgg gctogaacat gatgcgccag 1800  
 gccgtgccgc tgatcaaggg ggagtcctcc ctggtcggca ccggcatgga gtaccgctgt 1860  
 gcggtcgacg ccggcgacgt catcaaggcc gagaaggacg gtgtcgtcca ggaggctctc 1920  
 gccgactacg tgaccgtggc caacgaccgac ggcacctaca ccacctaccg ggtggccaag 1980  
 ttctcccgtt ccaaccaggg cacctccttc aaccagaagg tcgtcgtgga caggggtcgc 2040  
 cgggtgatcg ccggccaggt gctggccgac ggcccgtcca ccgaggacgg cgagatggcg 2100

60

65

ES 2 678 018 T3

	ctcggcaaga acctcctggt ggcgttcacg ccgtgggagg gccacaacta cgaggacgcg	2160
	atcatcctca gccagcgtct ggtgcaggac gacgtcctct cctcgatcca catcgaggag	2220
5	cacgaggtcg atgcccggtga caccaagctc ggccccgagg agatcaccog ggacatcccg	2280
	aacgtctccg aggaggtcct cgcggacctc gacgagcgcg gcatcatccg gatcggtgcc	2340
	gaggtcgtcg ccggcgacat cctggtcggc aaggtcaccc cgaagggcga gaccgagctg	2400
10	accccggagg agcggctgct gcgcgcgacg ttccggtgaga aggcccgtga ggtccgtgac	2460
	acctcgctga aggtgccgca cgggtgagatc ggcaagggtca tcggcgtccg cgtcttcgac	2520
	cgcgaagagg gcgacgaact gccgcggggc gtgaaccagc tggtcgcggt ctacgtggcg	2580
15	cagaagcgca agatcaccga tgggtgacaag ctgcgccggc gtcaaggcaa caagggcgtc	2640
	atctccaaga tcctgccggt cgaggacatg ccgttcctgg aggacggcac cccggctcgac	2700
	atcatcctca acccgtctgg tgtcccgtcc cgaatgaacc cgggacaggt cctggagatc	2760
20	cacctgggct ggttgccctc ccgcggctgg aaggtcgagg gctccgagga ctggatgcag	2820
	cggctccagg ccatcggcgc cgacgaggtc gagcccggca ccaacgtcgc gaccccggtc	2880
	ttcgacggcg cccgcgagga cgagatcgcc ggtctcttcg actcgacgat cccgaaccgc	2940
25	gacggcgacc gcctggtcca gtcgtccggc aaggcccggc tcttcgacgg ccgctccggc	3000
	gagccgttcc cggagccgat ctcggtcggc tacatgtaca tcctcaagct gcaccacctg	3060
	gtggacgaca agctgcacgc ccggtccacc ggtccgtact cgatgatcac ccagcagccg	3120
30	ctgggtggtg aggcctcagtt ccggtggccag cgcttcggtg agatggagggt gtgggcgctg	3180
	gaggtctatg gcgcgcggtg cgcctccag gagctgctga ccatcaagtc cgacgacgtg	3240
	accggccgcg tgaaggtcta cgaggccatc gtcaagggcg agaacattcc cgagcccggc	3300
35	atccccgagt ccttcaaggt gctcatcaag gagatgcagt cctgtgcct caacgtggag	3360
	gtgctgtcgt ccgacggcat gtccatcgag atgcgcgaca ccgacgagga cgtcttccgc	3420
	gctgcggagg agctcggtat cgacctgtcc cggcgcgagc cgagcagcgt cgaagaggtc	3480
40	tga	3483

45 <210> 9  
 <211> 2031  
 <212> ADN  
 <213> *Streptomyces*

50 <220>  
 <221> fuente  
 <222> 1..2031  
 <223>/mol\_type = "ADN"/nota = "gyr B"/organismo = "*Streptomyces*"

55 <400> 9

60

65

ES 2 678 018 T3

5  
 10  
 15  
 20  
 25  
 30  
 35  
 40  
 45  
 50  
 55  
 60

gtgctgtgcc agaaagggcg cttcgtggcc gattccggca accccatcga aaacatcccg 60  
 tccacgcccg acgacgaggc cctggctccg ccgtcgtacg acgccagtgc gattaccgtc 120  
 ctggaagggc tggagggcgt ccgcaagcga cccggatgtg acatcggttc caccgggtgag 180  
 cgcggcctgc accatctcgt ccaagaggtc gtcgacaact ccgtcgacga ggccatggcc 240  
 ggtcacgcgg acagcatcga ggtcacgata ctgcgccagc gggcgctccg cgtcgtggac 300  
 aacggccgcg ggatcccgtt gggcatcgtc ccctcggagg ggaagccggc tgtggaggtc 360  
 gtgctgaccg tgcctgcacg gggcggcaag ttccggcgcg gggcctacgc cgtctccggc 420  
 ggtctgcacg gcctcggcgt ctccgtcgtc aacgccctgt cctcgaaggt gtcggctcag 480  
 gtcaagacgg acgctaccg ctggaccag gactacaaga cgggagcgc gaccgcgccc 540  
 ctggcccga acgagggcac ggaggagacc ggaccacggc tcacctctg ggcggaccgg 600  
 gacgtcttcg agaccaccga gtactccttc gagacgctgg ccggcgctt ccaggagatg 660  
 gcgttcctca acaagggcct gtcgatctcg ctcaaggacg agcgcgaggc ccatgtggac 720  
 gaggagggca agccgctctc cgtgaagtac cactacgagg gggcctcgt cgcactctgt 780  
 acctacctca actcccgcaa gggcgagctg gtcaccacca cggtgatcgg gttcagggcc 840  
 gaggacaagg agcggatgct ctccctcag atcgcgatgc agtggaaac ccagtacacc 900  
 gagggtgtct acagcttcgc gaacaccatc cacaccatg agggcggcac ccacgaggag 960  
 ggcttccgcg ccgcgctgac gtacctgac aacaagtacg cgcgcgacaa gaagctgctc 1020  
 cgggagcgtg acgacaacct caccgggtgag gacatccgcg agggcctgac cgcctatc 1080  
 tcggtcaagc tgggcgagcc gcagttcag ggcagacca agaccaagct gggcaacacg 1140  
 gaggccaaga cctcgtcca gaagatcgtc aacgagcacc tcgccactg gctggaccgt 1200  
 aaccctaag aggcggcgga catcgtccgc aaggggatcc agggggcgac ggcccgggtc 1260  
 gcgcccgtg aggcggcgga tctgaccgcg cgttaagggc tgctggagac cgcgtcgtg 1320  
 ccgggcaagc tgagogactg ccagtcfaat gaccctoga agtgcgagat cttcatcgtc 1380  
 gagggtgact ccgcccggcg ctccggccaag tccggccgta acccgagta tcaggcgatc 1440  
 ctcccgatcc gcgcaagat cctcaacgtg gagaaggccc ggtcgcaca gatcctgcag 1500  
 aacaacgag tccaggcgtt gatctccgcc ttccggcacg ggtgcacga ggacttcgac 1560  
 atcgccaagc tccgctatca caagatcatt ctgatggcgg acgccgatgt cgcgcccag 1620  
 cacatcaaca ccctgctgct gaccttcctc ttccgcttca tgcgcccgtt ggtcagggcg 1680  
 gggcatgtct tcctctcccg tccgcccgtc tacaagatca agtggggcgg ggcgacttc 1740  
 gagtacgct actcggaccg ggagcgggac gcgctgatcc aggtcggccg tgaacagggc 1800  
 aagcgcata gggacgactc ggtccagcgc ttcaagggtc tgggcgagat gaacgccgaa 1860  
 gagctgcggg tcaccacgat ggaccccgac caccgcgtcc tgggcccagg caccctggac 1920  
 gacgcggcgc agggcgacga cctgttctcg gtcctgatgg gtgaggacgt cgaggcacgg 1980  
 cgctcgttca tccagcga cgcgaaggat gtcgcttcc tcgacatctg a 2031

<210> 10  
 <211> 990  
 <212> ADN  
 <213> *Streptomyces*

ES 2 678 018 T3

<220>  
 <221> fuente  
 <222> 1.990  
 <223>/mol\_type = "ADN"/nota = "Rec A"/organismo = "*Streptomyces*"

5  
 <400> 10

10	ggcgatcggc cgaacgagcc ggtcgaggtc atcccaccg ggtcgaccgc tctcgacgtc	60
	gccctcggcg tcggcggctc gccgcgcggc cgggtggtcg aggtctacgg ccccgagtcc	120
	tccggttaaga cgaccctgac cctgcacgcg gtggccaatg cccagcgggc cggcggcacc	180
15	gttgcccttcg tggacgccga gcacgccctc gaccctgact acgcgcagaa gctgggctg	240
	gacaccgact ccctgatcct gtcccagccg gacaacggcg agcagggcgt cgagatcgtg	300
	gacatgctgg tccgctccgg cgcctcgcac ctcatcgtca tcgactccgt cgcgccctg	360
20	gtgccgcggc cggagatcga gggcgagatg ggcgactccc acgtcggcct ccaggcccgg	420
	ctgatgagcc aggcgctccg taagatcacc agcgcgctca accagtcca gaccaccgcg	480
	atcttcatca accagctccg cgagaagatc ggcgtgatgt tcggctcgcc ggagaccacg	540
25	accggtggcc gggcgtgaa gttctacgcg tcgggtgcga tcgacatccg ccgcatcgag	600
	accctcaagg acggcaccga cgcggctcggc aaccgcaccc gcgtcaaggc cgtcaagaac	660
	aaggtcgcgc cgccttcaa gcaggccgag ttcgacatcc tctacggcca gggcatcagc	720
30	cgtgagggcg gtctgatcga catgggcgtc gagcacggct tcgtccgcaa gtccgggtgcc	780
	tggtacacct acgagggcga ccagctcggc cagggcaagg agaacgcccg caacttcctg	840
35	aaggacaacc ccgatctcgc caatgagatc gagaagaaga tcaaggaaaa gctcggcatc	900
	ggggtgaggc cccaggaccc ggcggccgcg gcaccaccca cggacgcggc tggtgccgcg	960
40	ggcgtgaccg acgccgcacc ggcgaaggcc	990

<210> 11  
 <211> 1209  
 <212> ADN  
 <213> *Streptomyces*

<220>  
 <221> fuente  
 <222> 1..1209  
 <223>/mol\_type = "ADN"/nota = "Trp B"/organismo = "*Streptomyces*"

50  
 <400> 11

55

60

65

ES 2 678 018 T3

gtgccagcg ccgagggcta tttcggcgcc ttcggcggca agttcatccc cgaggcgctc 60  
 gtgccgcccg tcgacgaggt cgcggccgag tacgagaagg ccaagacgga ccccgcttc 120  
 5 gcgccgagc tcgaggatct gctggtcaac tacaccggcc ggcccagtgc gctgaccgag 180  
 gtgcggcggc tcgccgagca cgcggggggc gccgggtct tcctcaagcg ggaggacctc 240  
 aaccacaccg gctcccacaa gatcaacaat gtgctggggc aggcctgct caccaagcgc 300  
 10 atgggcaagt cccgggtcat cgcgagacc ggccgggtc agcacggcgt ggccaaggcc 360  
 accgcatgtg cgtggttcgg gctcgaatgc accatctaca tgggcgaggt cgacaccgag 420  
 cgcgaggcgc tcaatgtggc gcggatgcgg atgctggggc ccgaggatcat ctccgtgacc 480  
 15 tccggcagcc gcaccctgaa ggaccaccatc aacgagcgt tccgggactg ggtcgccaat 540  
 gtggaccgca cccactacct ctccggtacg gtggccggcc cccaccctt cccggcgctg 600  
 gtgcgcgact tccaccgggt gatcggcgtg gaggcggcgc ggcagatcct ggagcggacc 660  
 20 gggcggctgc cggacgcggt cgcggcctgt gtggcggcg gatccaacgc gatcggcgtg 720  
 ttcaecgct tcctgcccga cgagagcgtg cgcctcgtcg gcttcgagcc cgcggacac 780  
 ggtgtggaga ccggggagca cgcggccacg ctgagccagg gcgagcccgg gatcctgcac 840  
 25 ggctcccgt cgttcgtgct ccaggacgag gacggccaga tcaccgagcc gtactcgatc 900  
 tcggccggtc tcgactacct cggcgtcggc ccggagcacg cgtatctgaa ggacatcgcc 960  
 cgtgccgagt accggggcgt caccgacgac gaggcgatgc gggcgctgcg gctgctctcg 1020  
 30 gagaccgagc gcatcatccc ggcgatcagc agcggccacg cgcctggcgg cgcctggac 1080  
 ctccggcgtg agctggggag cgacggcctg gtgctggtca acctctccgg gcgcgcgac 1140  
 35 aaggacatgg acacggcggc tcggtacttc gggctctacg accagcagag cgaccagggc 1200  
 gcgaagtga 1209

40 <210> 12  
 <211> 1419  
 <212> ADN  
 <213> *Streptomyces*  
 45 <220>  
 <221> fuente  
 <222> 1..1419  
 <223>/mol\_type = "ADN"/nota = "Atp B"/organismo = "*Streptomyces*"  
 50 <400> 12  
 55  
 60  
 65

ES 2 678 018 T3

gtggcctccg gccgcgtcgc gcgggtcacc ggcccggctg tcgacgtgga gttccccgtc 60  
 gacgcgatgc cggagatcta caacgcgctg caggctgagg tcgccgaccc ctcccaggag 120  
 5  
 ggggcgaaga agaccctgac cctcgaggtc gcccagcacc tcggcgaggg cctggctccg 180  
 gccatctcca tggagccac cgacggcctg gtccgccagg ccgcggtgac cgacaccggc 240  
 10  
 gacggcatca cggtgccggt cggcgatgtc accaagggcc ggggtgttaa caccctcggc 300  
 aagatcctca acgagcccga gcccgagtcc gaggtcaccg agcgtctgtc catccaccgc 360  
 aaggccccg ccttcgacca gctcgagtcc aagaccgaga tgttcgagac cggcctgaag 420  
 15  
 gtcgtcgacc tgctgacccc gtacgtcaag ggcggcaaga tcggtctgtt cggcggcgcg 480  
 ggcgtcggca agaccgtgct catccaggaa atgatcatgc gtgtggccea gctgcacgag 540  
 ggcgtttccg tgttcgccg tgtcggcgag cgcacccgtg agggcaacga cctgatcgag 600  
 20  
 gagatggccg agtccggcgt gctcccgcag accgcctggg tcttcggcca gatgatgag 660  
 cccccgggca cccgtctcgc cgtcgcacctg gccggtctga ccatggcgga gtacttccgc 720  
 gatgtgcaga agcaggacgt gctgttcttc atcgacaaca tcttcgcctt caccaggcc 780  
 25  
 ggttcggagg tctcgacct gctcggcccg atgcctccg cgggtgggta ccagccgaac 840  
 ctggccgacg agatgggcat cctgcaggag cgcacacact cgaccocgtg tcaactcgatc 900  
 acctcgatgc aggcgatcta cgtccccgcg gacgacctga ccgaccocgc cccggcgacc 960  
 30  
 accttcgcgc acctcgacgc gaccacggtg ctctcccggc cgatctcgga gaaggcatc 1020  
 taccggcgcg tggaccocgt ggactcgacg tcccggatcc tggaccocgc ctacatctcg 1080  
 caggagcact acgactgcgc ctcgcgcgtg aagtcgatcc tgcagaagta caaggacctc 1140  
 35  
 caggacatca tcaacatcct gggcatcgac gagctcggcg aggaggaaa gctcaccgtc 1200  
 ttccgcgcc gccggatcga gcgcttctg tcgcagaaca cccacgcggc gaagcagttc 1260  
 accgcctcg acggatcgga tgtgccgctg gacgagtcca tcgccgcgtt caacgcgatc 1320  
 40  
 gccgatggtg agttcgacca ctccccgag caggcgttct tcatgtcggg tggcctggac 1380  
 gacctcaagg ccaaggccaa ggagctgggc gtctctga 1419

45

50

55

60

65

**Reivindicaciones**

1. Método para tratar un material vegetal, en el que se aplica una composición de tratamiento que comprende al menos un agente biológico elegido en el grupo compuesto por:

- bacterias del género *Streptomyces* que comprenden una secuencia de ADN, denominada 16S ADNr, que codifica el ARN ribosómico 16S de dicha bacteria, 100% homólogo con la SEQ ID\_NO1,
- medios de cultivo que comprenden polinucleótidos que tienen una secuencia de ADN 100% homóloga con SEQ ID\_NO1, obtenida por:

- cultivar al menos una bacteria del género *Streptomyces* que comprende la secuencia de 16S rADN 100% homóloga con SEQ ID\_NO1 en un medio de cultivo adecuado para permitir el crecimiento de dichas bacterias durante una duración mayor de 24 horas, entonces;
- eliminar dichas bacterias del medio de cultivo para formar una composición de tratamiento al menos sustancialmente libre de dichas bacterias;

la bacteria del género *Streptomyces* siendo elegida en el grupo compuesto por:

- bacterias que cumplen con la cepa depositada y registrada el 7 de abril de 2011 bajo el número 1-4467 con la Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos (CNCM) del Instituto Pasteur, y;
- bacterias mutantes obtenidas por mutagénesis de bacterias que cumplen con la cepa depositada y registrada el 7 de abril de 2011 bajo el número 1-4467 con la Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos (CNCM) del Instituto Pasteur, inhibiendo la bacteria mutante el crecimiento de agentes fitopatógenos tal como *Phaeomoniella chlamydospora*, *Phaeomoniella aelophilum*, *Eutypa lata*, *Fomitiporia mediterranea* y *Botryosphaeria obtusa*.

2. Método según la reivindicación 1, **caracterizado porque** el material vegetal se elige en el grupo compuesto por la totalidad o parte de una planta de cultivo, fruta o verdura después de la cosecha, semillas de plantas.

3. Método según una de las reivindicaciones 1 o 2, **caracterizado porque** se usa una composición de tratamiento que comprende además un nutriente sólido en estado dividido.

4. Método según una de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado porque** dicha composición de tratamiento se aplica sobre dicho material vegetal para activar el crecimiento del mismo.

5. Método según una de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado porque** dicha composición de tratamiento se aplica sobre dicho material vegetal para inhibir el crecimiento de al menos un microorganismo diana.

6. Método según una de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizado porque** dicha composición de tratamiento se aplica sobre dicho material vegetal para estimular las defensas naturales de dicho material vegetal.

7. Composición que comprende al menos un agente biológico elegido del grupo compuesto por:

- bacterias del género *Streptomyces* que comprenden una secuencia de ADN, denominada ADNr 16S, que codifica el ARN ribosómico 16S de dicha bacteria, 100% homóloga con la SEQ ID\_NO 1, y;
- medios de cultivo en los que se cultivaron bacterias del género *Streptomyces* que comprenden la secuencia 16S del ADNr 100% homóloga con la SEQ ID\_NO1 y que están sustancialmente libres de dichas bacterias, comprendiendo dichos medios de cultivo polinucleótidos que tienen una secuencia de ADN 100% homóloga con la SEQ ID\_NO1;

la bacteria del género *Streptomyces* siendo elegida en el grupo compuesto por:

- bacterias que cumplen con la cepa depositada y registrada el 7 de abril de 2011 bajo el número 1-4467 con la Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos (CNCM) del Instituto Pasteur, y;
- bacterias mutantes obtenidas por mutagénesis de bacterias que cumplen con la cepa depositada y registrada el 7 de abril de 2011 con el número 1-4467 con la Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos (CNCM) del Instituto Pasteur, la bacteria mutante que inhibe el crecimiento de agentes fitopatógenos tales como *Phaeomoniella chlamydospora*, *Phaeomoniella aelophilum*, *Eutypa lata*, *Fomitiporia mediterranea* y *Botryosphaeria obtusa*.

8. Composición según la reivindicación 7, **caracterizada porque** es líquida.

9. Composición según la reivindicación 7, **caracterizada porque** es sólida.

10. Composición según una de las reivindicaciones 7 a 9, caracterizada porque comprende al menos un excipiente aceptable para permitir la aplicación del mismo sobre un material vegetal a tratar.

11. Uso en agricultura de una composición según una de las reivindicaciones 7 a 10.

12. Uso según la reivindicación 11 para estimular el crecimiento de las plantas.

5 13. Uso según la reivindicación 11 para estimular la germinación de las semillas.

14. Uso según la reivindicación 11 para un tratamiento de fertilización de plantas.

10 15. Uso según la reivindicación 11 para un tratamiento de planta antimicrobiano y/o antiviral.

16. Uso según la reivindicación 11 para estimular las defensas naturales de las plantas.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Fig 1a

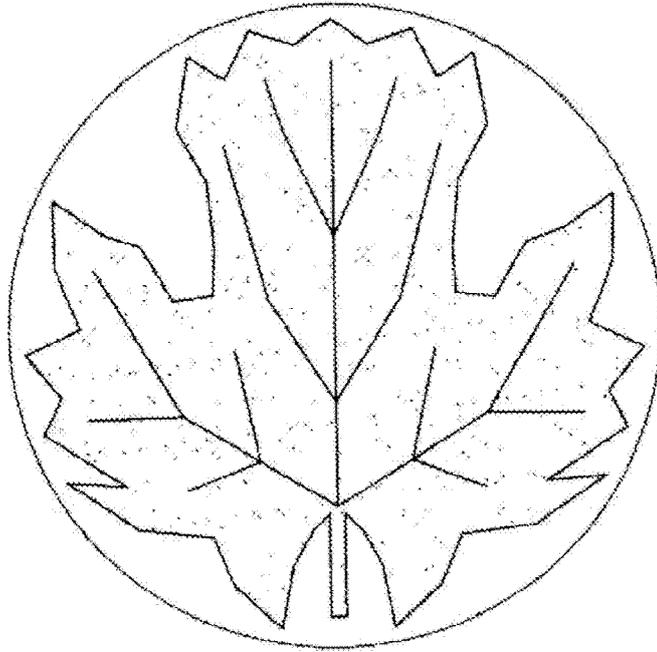


Fig 1b

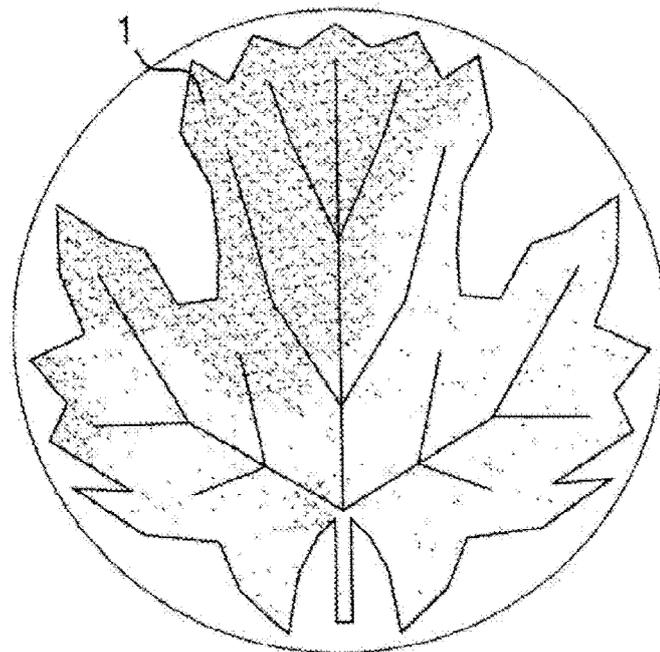


Fig 2

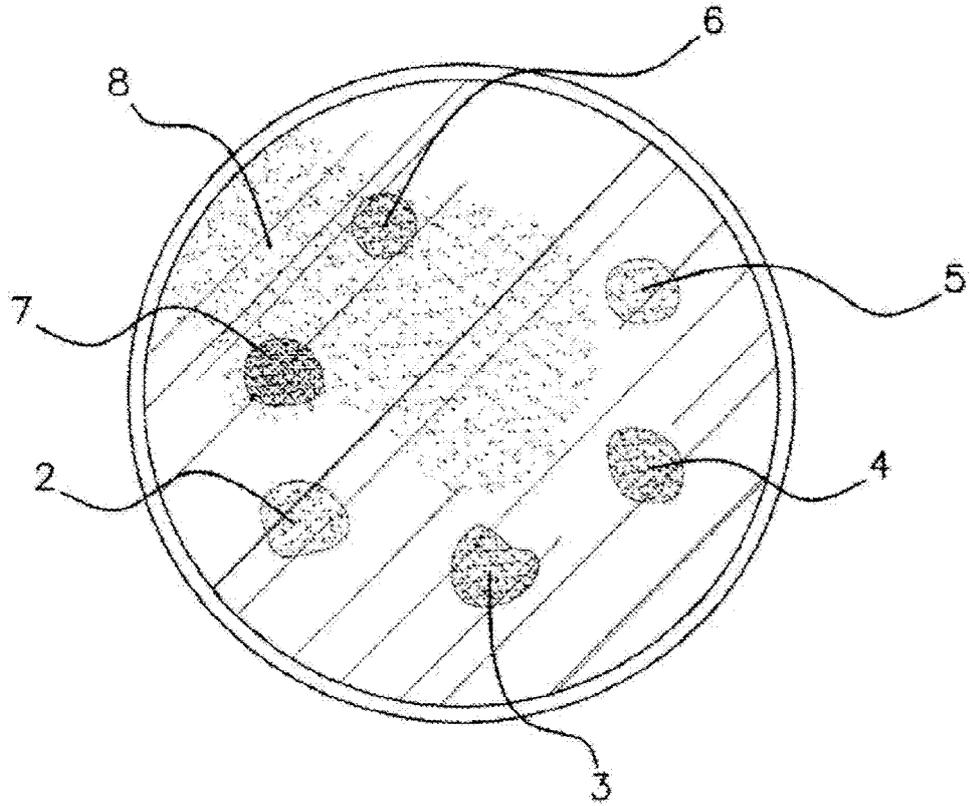


Fig 3

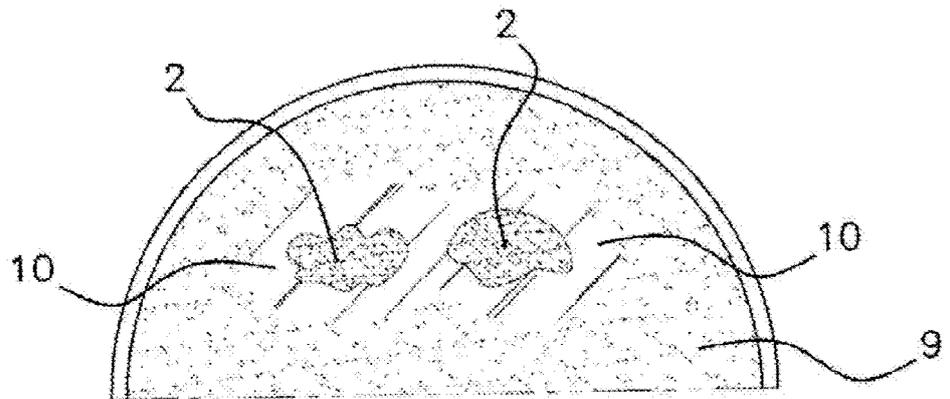


Fig 4

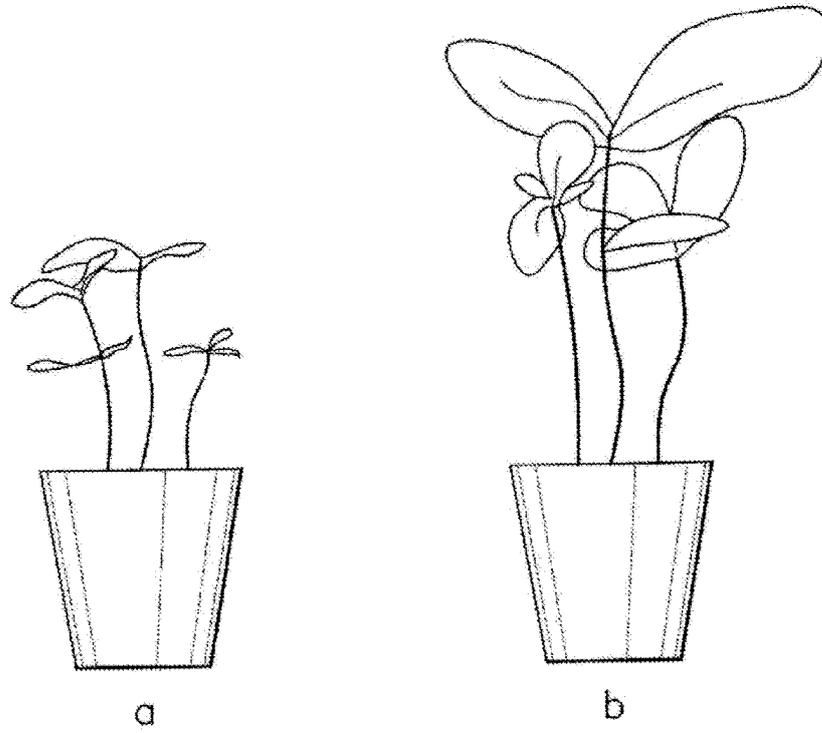


Fig 5

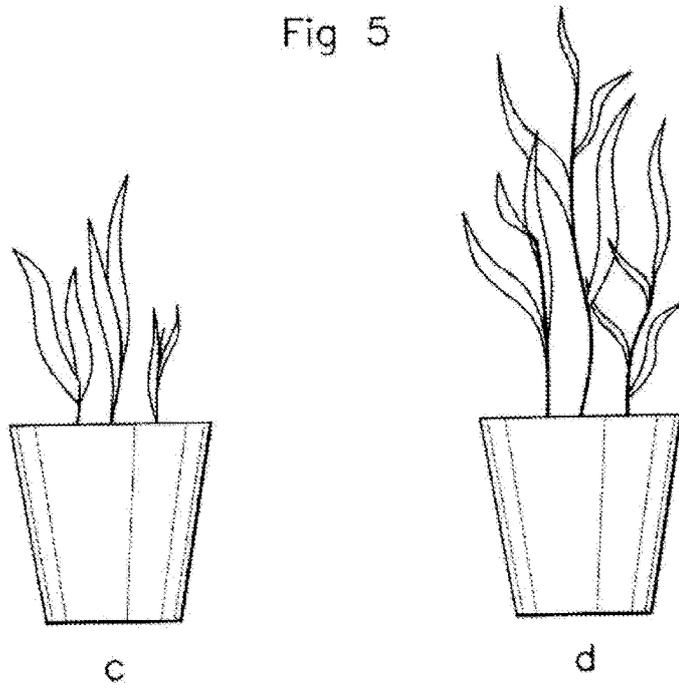


Fig 6a

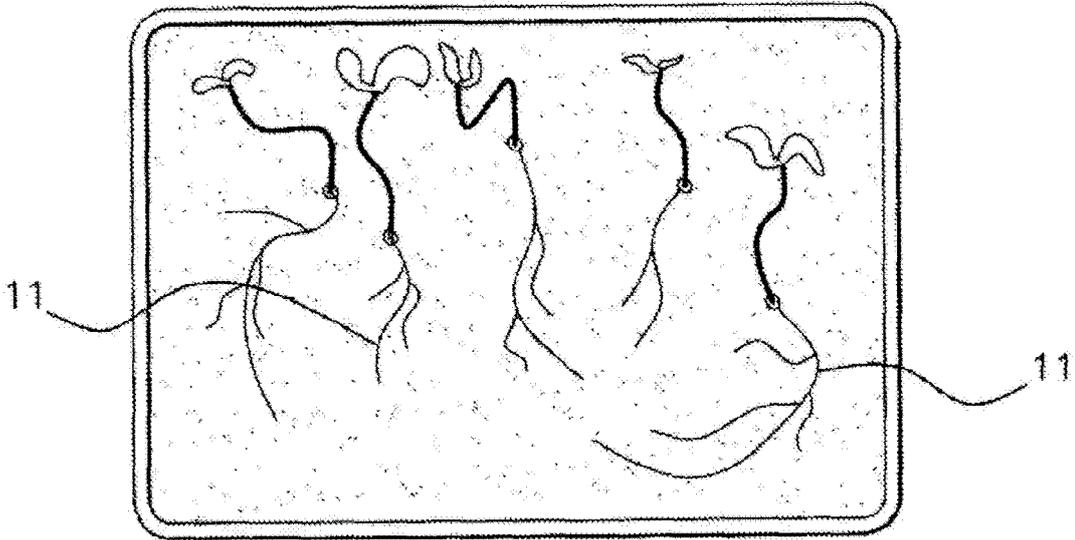
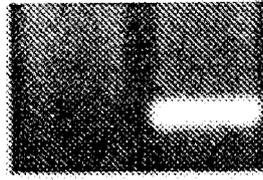


Fig 6b



A



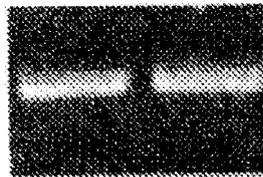
1 2

B



3 4

C



5 6

Fig 7

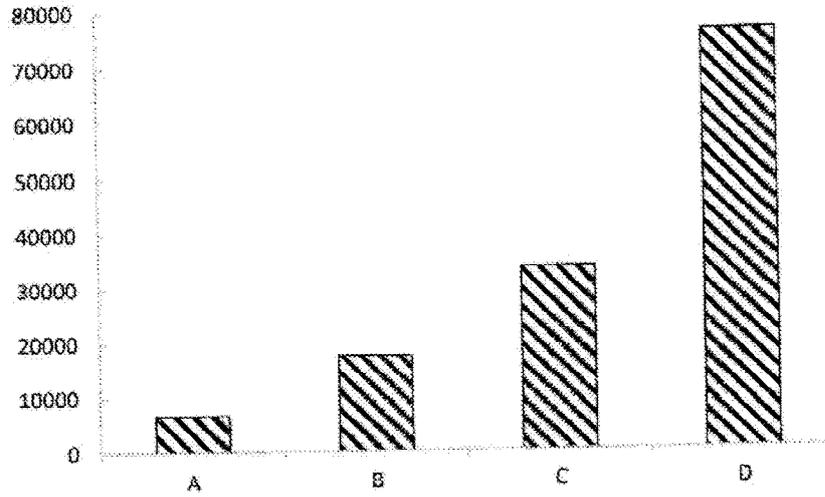


Fig 8

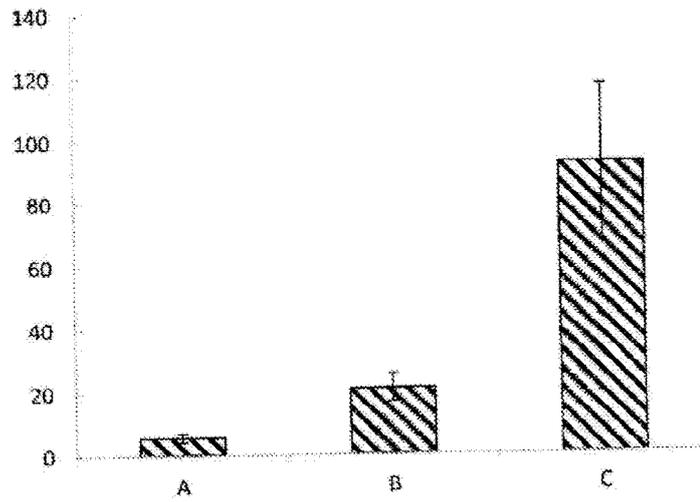


Fig 9