

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 694 810**

51 Int. Cl.:

A01N 63/00 (2006.01)

A01P 21/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.05.2014** **PCT/EP2014/061030**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.12.2014** **WO14191450**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.05.2014** **E 14726619 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.08.2018** **EP 3003047**

54 Título: **Agricultura microbiana**

30 Prioridad:

31.05.2013 US 201361830025 P
27.06.2013 US 201361840118 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.12.2018

73 Titular/es:

DSM IP ASSETS B.V. (100.0%)
Het Overloon, 1
6411 TE Heerlen, NL

72 Inventor/es:

DONNERS, RUTH EMELIA WILHELMINA y
KUMAR, MANOJ

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 694 810 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).

DESCRIPCIÓN

Agricultura microbiana

Campo de la invención

5 La presente invención describe nuevas composiciones antimicrobianas para controlar enfermedades de plantas y evitar el deterioro microbiano de las cosechas.

Antecedentes de la invención

10 Los microorganismos patógenos que afectan a la salud de las plantas son una amenaza grave y crónica para la producción de alimentos y la estabilidad del ecosistema en el mundo. Es de gran importancia, no solo desde un punto de vista económico, sino también desde un punto de vista humano, evitar el deterioro de los productos alimenticios. Después de todo, hay gente que padece hambre en muchas partes del mundo.

15 Como la producción agrícola se ha intensificado durante las últimas décadas, los productores se han vuelto cada vez más dependientes de productos agroquímicos tales como fungicidas como un método relativamente fiable de protección de la cosecha ayudando a la estabilidad económica de sus operaciones. Sin embargo, el uso creciente de fungicidas ocasiona varios efectos negativos, es decir, desarrollo de resistencia de los patógenos al fungicida aplicado e impactos medioambientales no objetivo. Además, el creciente coste de los fungicidas, en particular, en regiones del mundo menos prósperas y la demanda del consumidor de alimentos sin pesticidas han conducido a la investigación de sustitutos para estos productos. Hay también una serie de enfermedades fastidiosas para las que hay pocas soluciones químicas, las soluciones no son eficaces o bien no existen. El control biológico está siendo considerado, así, una alternativa o una manera suplementaria de reducir el uso de productos químicos en la agricultura.

20 Durante los últimos cuarenta años se han desarrollado y comercializado muchos nuevos fungicidas. Sin embargo, estos fungicidas no han sido inmunes a retos en su desarrollo y mantenimiento. Ha sido una gran preocupación el desarrollo de resistencia. Se ha observado resistencia a los fungicidas en varias enfermedades ahora.

25 Por consiguiente, se ha concluido que hay una urgente necesidad de desarrollar alternativas a los fungicidas para controlar las enfermedades de las plantas. Estas alternativas deberían desarrollarse pensando en una agricultura sostenible, reemplazando los fungicidas convencionales y ayudando a luchar contra el creciente problema de la resistencia.

Descripción de las figuras

30 Figura 1: Altura de la planta de maíz a los 84 días después de la plantación, 42 días después de inoculación de la cepa ATCC27448 (denominada cepa B en la figura 1) y/o *Cercospora zeae-maydis* productoras de natamicina. Las diferentes letras (a, b, c) significan resultados considerablemente diferentes a $\alpha=0,05$.

Descripción de la invención

La presente invención resuelve el problema proporcionando cepas bacterianas productoras de natamicina.

35 En una realización, la presente invención se refiere a un método para potenciar el crecimiento de las plantas, el rendimiento de las cosechas o ambos, comprendiendo el método la etapa de aplicar, al menos, una cepa bacteriana productora de natamicina a una planta.

40 Aplicando la cepa bacteriana productora de natamicina a una planta, puede obtenerse una respuesta positiva del rendimiento en la planta. Por otra parte, puede mejorarse la calidad de los materiales vegetales cosechados por aplicación de la cepa bacteriana productora de natamicina a la planta, ya que pueden reducirse los contenidos de micotoxinas en las plantas y/o materiales vegetales cosechados.

45 «Planta» como se usa en la presente memoria significa que puede aplicarse la cepa bacteriana productora de natamicina a una planta entera o a parte de la misma. Así, en una realización de la presente invención, puede aplicarse la cepa bacteriana productora de natamicina a una planta entera o a parte de la misma. Las plantas que pueden tratarse varían de plantas silvestres (deseadas o no) a plantas de cosecha (por ejemplo, plantas de cosecha obtenidas por técnicas de multiplicación y optimización convencionales (por ejemplo, cruzamiento o fusión de protoplasto), por técnicas biotecnológicas y de ingeniería genética (por ejemplo, mutagénesis o técnicas de ADN recombinante) o por una de sus combinaciones). Parte de las plantas incluye todas las partes y órganos aéreos y subterráneos de las plantas. Por ejemplo, puede aplicarse la cepa bacteriana productora de natamicina a raíces, brotes, tubérculos, rizomas, plántulas, tallos, follaje, esquejes, acículas, caña, hojas, frutos, flores de troncos, por nombrar algunos.

50 Preferiblemente, la cepa está viva cuando se aplica. Puede aplicarse la cepa en cualquier estado fisiológico tal como

activo o inactivo. En una realización, la cepa es una cepa formadora de esporas. La cepa puede estar purificada o no. Puede aplicarse la cepa como un cultivo biológicamente puro o inóculo. El término «cepa bacteriana productora de natamicina» como se usa en la presente memoria también incluye esporas o estructuras de tipo espora de bacterias productoras de natamicina. Las propias esporas o estructuras de tipo espora pueden producir natamicina.

Alternativamente, las esporas o estructuras de tipo espora pueden no ser capaces de producir natamicina, pero pueden desarrollarse en cepas bacterianas productoras de natamicina una vez que las condiciones sean favorables.

En una realización, la cepa bacteriana productora de natamicina se selecciona del grupo que consiste en una cepa de *Streptomyces natalensis*, una cepa de *Streptomyces gilvosporeus*, una cepa de *Streptomyces chattanoogensis* y una cepa de *Streptomyces lydicus*. Se conocen en la técnica métodos para producir cepas bacterianas productoras de natamicina, por ejemplo, en las patentes internacionales WO 93/03171, WO 93/03169, WO 2004/087934, Martin and McDaniel (1977), Chen *et al.* (2008), Farid *et al.* (2000), El-Enshasy *et al.* (2000b), He *et al.* (2002) y Liang *et al.* (2008). Las cepas de *Streptomyces natalensis* incluyen, pero no se limitan a, las siguientes cepas: ATCC27448, BCRC 15150, CBS 668.72, CBS 700.57, CCRC 15150, CCTM La 2923, CECT 3322, CGMCC 100017, CGMCC 100019, DSM 40357, F ATCC27448, Hoogerheide cepa KNGSF, IFO 13367, ISP 5357, JCM 4693, JCM 4795, KCC 693, KCC S-0693, KCC S-0795, KCCS-0693, KCCS-0795, KNGS cepa F, NBRC 13367, NCIB 10038, NCIM 2933, NCIM 5058, NCIMB 10038, NRRL 2651, NRRL B-2651, NRRL B-5314, RIA 1328, RIA 976, VKM Ac-1175, VKM Ac-1175. Además, pueden usarse en la presente invención las cepas de *Streptomyces natalensis* como se describe en los ejemplos. En una realización preferida, se usan cepas de *Streptomyces natalensis* en la presente invención. En una realización incluso más preferida, se usan las cepas de *Streptomyces natalensis* con el código interno DS73870 y DS73871 en la presente invención. Se depositaron las cepas bajo los términos del Tratado de Budapest con el Centraal Bureau voor Schimmelcultures (CBS), Utrecht, Países Bajos, el 20 de mayo de 2014. La cepa DS73870 de *S. natalensis* se ha depositado como cepa CBS 137965. La cepa DS73871 de *S. natalensis* se ha depositado como cepa CBS 137966.

Las cepas de *Streptomyces gilvosporeus* incluyen, pero no se limitan a, las siguientes cepas: A-5283, ATCC13326, NRRL B-5623. Las cepas de *Streptomyces chattanoogensis* incluyen, pero no se limitan a, las siguientes cepas: AS 4.1415, ATCC 13358, ATCC 19739, BCRC 13655, Burns J-23, CBS 447.68, CBS 477.68, CCRC 13655, CCTM La 2922, CECT 3321, CGMCC 100020, CGMCC 4.1415, CUB 136, DSM 40002, DSMZ 40002, Holtman J-23, IFO 12754, ISP 50002, ISP 5002, J-23, JCM 4299, JCM 4571, KCC S-0299, KCC S-0571, KCCS-0571, KCCS-0299, KCTC 1087, Lanoot R-8703, LMG 19339, NBRC 12754, NCIB 9809, NCIMB 9809, NRRL B-2255, NRRL-ISP 5002, R-8703, RIA 1019, VKM Ac-1775. Las cepas de *Streptomyces lydicus* incluyen, pero no se limitan a, las siguientes cepas: CGMCC n.º 1653.

Para controlar los patógenos fúngicos de las plantas y potenciar, así, el crecimiento de las plantas y el rendimiento de las cosechas, se aplica a la planta la cepa bacteriana productora de natamicina en una cantidad eficaz para controlar las enfermedades fúngicas. La cepa es eficaz cuando se suministra en una concentración de 10^3 - 10^{11} unidades formadoras de colonias (ufc) por gramo. Pueden usarse para aplicación en una planta de 0,1 g/ha a 10 000 g/ha. Puede aplicarse a la planta la cepa bacteriana productora de natamicina, por ejemplo, por inmersión, pulverización, irrigación, riego, espolvoreo, remojo, formación de espuma, pintura, aspersión o difusión. Puede aplicarse la cepa bacteriana en forma líquida, por ejemplo, como una suspensión o emulsión. Alternativamente, cuando está en forma seca, por ejemplo, como un gránulo, bolita o polvo, puede mezclarse primero la cepa bacteriana productora de natamicina con un portador líquido adecuado y aplicarse después a la planta.

Puede usarse la cepa bacteriana productora de natamicina para controlar los patógenos fúngicos de las plantas en diferentes tipos de plantas incluyendo, pero no limitándose a, maíz, choclo, tritical, cacahuete, lino, canola, colza, amapola, oliva, coco, céspedes, soja, algodón, remolacha, (por ejemplo, remolacha azucarera y remolacha forrajera), arroz (puede usarse cualquier arroz, pero se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en *Oryza sativa* sp., *japonica*, *Oryza sativa* sp., *javanica*, *Oryza sativa* sp., *indica* y sus híbridos), sorgo, mijo, trigo, trigo duro, cebada, avena, centeno, girasol, caña de azúcar, turba, pasto, alfalfa o tabaco. También se puede usar para controlar patógenos fúngicos de las plantas en plantas frutales incluyendo, pero no limitándose a, fruto de rosácea, por ejemplo, manzanas y peras; frutos de hueso, por ejemplo, melocotones, nectarinas, cerezas, ciruelas y albaricoques; cítricos, por ejemplo, naranjas, pomelos, limas, limones, kumquats, mandarinas y satsumas; frutos secos, por ejemplo, pistachos, almendras, nueces, café, cacao y nueces pacanas; frutos tropicales, por ejemplo, mango, papaya, piña, dátiles y bananas y uvas y hortalizas incluyendo, pero no limitándose a, hortalizas de hoja, por ejemplo, endibias, canónigos, rúcula, hinojo, globo (lechuga arrepollada) y ensalada de hojas sueltas, acelga, espinaca y achicoria; tubérculos, por ejemplo, coliflor, brócoli, col china, col (col de invierno o col rizada), colinabo, coles de Bruselas, col roja, col blanca y de Saboya; frutos y pepónides, por ejemplo, berenjenas, pepinos, paprika, calabacita, tomates, calabacines, melones, sandías, calabazas y maíz dulce; hortalizas de raíz, por ejemplo, apionabo, nabo, zanahorias, rutabaga, rábano, rábano picante, betarraga, salsifí, apio; legumbres, por ejemplo, guisantes y alubias y hortalizas de bulbo, por ejemplo, puerros, ajo y cebollas. La cepa bacteriana productora de natamicina también puede usarse para el tratamiento de plantas ornamentales, por ejemplo, pensamientos, impatiens, petunia, begonia, Lisianthus, girasol, Ageratum, crisantemo y geranio.

La cepa bacteriana productora de natamicina puede aplicarse a una planta como tal, es decir, sin dilución o

componentes adicionales presentes. Sin embargo, la cepa bacteriana productora de natamicina se aplica típicamente en forma de composición. Así, en una realización, la presente invención se refiere a una composición que comprende una cepa bacteriana productora de natamicina y un portador agrícolamente aceptable. La composición puede ser una composición lista para uso o un concentrado que se tiene que diluir antes de su uso.

Preferiblemente, la composición comprende un portador agrícolamente aceptable. El término «portador agrícolamente aceptable» como se usa en la presente memoria significa una sustancia orgánica o inorgánica, natural o sintética, sólida o líquida, inerte, que se mezcla o se combina con el agente activo, por ejemplo, la cepa de bacterias productoras de natamicina, para una mejor aplicabilidad en plantas y partes de las mismas. Cubre todos los portadores que se usan ordinariamente en la tecnología de las formulaciones (bio)fungicidas incluyendo, pero no limitándose a, agua, coloides protectores, aglutinantes, sales, tampones, diluyentes, minerales, cargas, colorantes, antiespumantes, adhesivos, fijadores, agentes de pegajosidad, resinas, conservantes, estabilizantes, fertilizantes, agentes antioxidantes, activadores génicos, espesantes, plastificantes, secantes, tensioactivos, dispersantes, alcoholes, formadores de complejos, agentes humectantes, ceras, disolventes, emulsionantes, aceites minerales o vegetales, agentes secuestrantes y derivados y/o mezclas de los mismos. Las composiciones pueden mezclarse con uno o más portadores sólidos o líquidos y prepararse por diversos medios, por ejemplo, por mezcla o incorporación de manera homogénea de la cepa con portadores adecuados usando técnicas de formulación convencionales. Dependiendo del tipo de composición que se prepare, pueden requerirse etapas adicionales de tratamiento tales como, por ejemplo, granulación.

En una realización, la cepa bacteriana puede estar presente en un nivel de 10^3 - 10^{10} ufc/g de portador. En una realización, la cepa bacteriana productora de natamicina está presente en desde un 1 % (p/p) a 99 % (p/p) en peso de la composición total, preferiblemente desde un 10 % (p/p) a 75 % (p/p). La presente invención, por lo tanto, se refiere también a una composición que comprende una cepa bacteriana productora de natamicina y un portador agrícolamente aceptable.

La cepa bacteriana productora de natamicina puede aplicarse a una planta de manera simultánea o sucesivamente con otros compuestos. Ejemplos de dichos compuestos son: fertilizantes, reguladores del crecimiento, (micro)nutrientes, herbicidas, rodenticidas, acaricidas, repelentes para pájaros, atrayentes, insecticidas, fungicidas, acaricidas, esterilizantes, bactericidas, nematocidas, molusquicidas o mezclas de los mismos. Si se desea, estos otros compuestos también pueden comprender portadores agrícolamente aceptables. Si se aplican de manera simultánea, pueden aplicarse la cepa bacteriana productora de natamicina y el otro compuesto como una composición o pueden aplicarse como dos o más composiciones separadas. Si se aplican sucesivamente, la cepa bacteriana productora de natamicina puede aplicarse primero seguido por el otro compuesto o puede aplicarse el otro compuesto primero seguido por la cepa bacteriana productora de natamicina. Cuando se aplican de manera secuencial la cepa bacteriana productora de natamicina y el otro compuesto, el tiempo entre las dos aplicaciones puede variar desde, por ejemplo, 10 minutos a 100 días.

La presente invención también se refiere al uso de una cepa bacteriana productora de natamicina como un potenciador del crecimiento de la planta y/o potenciador del rendimiento de las cosechas. Por supuesto, también puede usarse una composición según la presente invención, como un potenciador del crecimiento de la planta y/o potenciador del rendimiento de las cosechas.

En una realización, la composición de la presente invención comprende además al menos un compuesto antimicrobiano adicional. El compuesto antimicrobiano puede ser un compuesto antifúngico o un compuesto para combatir insectos, nematodos, ácaros y/o bacterias. Por supuesto, las composiciones según la invención también pueden comprender dos o más cualesquiera de los compuestos antimicrobianos anteriores. Compuesto, como se usa en la presente memoria, también incluye otra cepa antimicrobiana. Preferiblemente, la cepa es una cepa bacteriana antimicrobiana.

Las composiciones según la invención pueden presentar un pH de desde 1 a 10, preferiblemente de desde 2 a 9, más preferiblemente de desde 3 a 8 y lo más preferiblemente de desde 4 a 7. Pueden ser sólidas, por ejemplo, composiciones en polvo, o pueden ser líquidas. Las composiciones de la presente invención pueden ser composiciones listas para usar acuosas o no acuosas, pero también pueden ser composiciones/suspensiones concentradas acuosas o no acuosas o composiciones, suspensiones y/o disoluciones de reserva que, antes de su uso, tienen que diluirse con un diluyente adecuado tal como agua o un sistema tampón. Las composiciones de la presente invención también pueden presentar la forma de productos concentrados secos tales como, por ejemplo, polvos, granulados y comprimidos. Pueden usarse para preparar composiciones para inmersión o pulverización de plantas y/o cosechas.

La cepa bacteriana productora de natamicina y cualquier otro compuesto pueden encontrarse en un estuche de partes. Los dos o más componentes del estuche pueden envasarse por separado. Como tales, los estuches incluyen uno o más contenedores separados tales como viales, latas, tarros, saquitos, bolsas o depósitos, conteniendo cada contenedor un componente separado para una composición agroquímica. Los componentes del estuche pueden estar en forma seca o en forma líquida en el envase. Si es necesario, el estuche puede comprender instrucciones para disolver los compuestos. Además, el estuche puede contener instrucciones para aplicar los compuestos.

Ejemplos

Ejemplo 1

Selección de cepas de *Streptomyces natalensis* productoras de natamicina

5 Se seleccionaron las ocho siguientes cepas de *Streptomyces natalensis* productoras de natamicina de una colección interna de cultivos y se ensayó a su actividad antifúngica en un experimento *in vitro*: DS10599, DS73309, DS10601, DS73871, DS73870, DS73311, DS73352 y DS73312.

10 Se ensayaron tres patógenos fúngicos de plantas contra las cepas seleccionadas de *S. natalensis*: *Fusarium oxysporum* f. sp., *lycopersici* (CBS414.90), *Colletotrichum gloeosporioides* (CBS272.51) y *Alternaria alternata* (CBS103.33). *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* es un hongo de tierra que ocasiona pérdida de rendimiento, por ejemplo, en cosechas de tomate (fusariosis). *Colletotrichum gloeosporioides* ocasiona, por ejemplo, antracnosis, una enfermedad de las plantas reconocible por lesiones pardo oscuras en hojas y frutos. *Alternaria alternata* es un saprófito de todo el mundo que puede ocasionar reacciones fitopatógenas en plantas huésped económicamente importantes. Se ensayaron las cepas de *S. natalensis* seleccionadas contra estos patógenos fúngicos de las plantas como se describe a continuación.

15 Se transfirieron viales congelados (disoluciones de reserva de glicerol) o tubos liofilizados de las cepas de *S. natalensis* seleccionadas a matraces Erlenmeyer con deflector de 100 ml que contenían 20 ml de caldo de extracto de levadura y malta (YME, por sus siglas en inglés). Se volvieron a suspender los tubos liofilizados en solución salina fisiológica y se almacenaron 1 hora a temperatura ambiente antes de que se transfirieran al medio. Se inocularon los matraces Erlenmeyer en un agitador de incubación durante 3 días a 28 °C y 19 rad/s (180 rpm).

20 Para cada cepa, se transfirieron 200 µl de medios líquidos a placas de agar YME (cajas Petri de 90 mm que contenían 20 ml de medio) y se dispersaron con el uso de un extendedor estéril en la superficie del medio. Con posterioridad, se incubaron las placas de agar durante 4 días a 28 °C para potenciar la cobertura completa de las colonias de la superficie de la placa.

25 Se pusieron en placas los hongos seleccionados directamente de una disolución de reserva de glicerol (200 µl) a agar YME y con posterioridad se incubaron durante 4 días a 28 °C.

30 El bioanálisis se realizó como sigue. Se usaren placas de sobrecrecimiento de *Streptomyces* y hongos, como se describió anteriormente, para producir tapones de agar. Se prepararon los tapones recortando el agar usando un sacabocados estéril (11 mm de diámetro) y retirándolo, con posterioridad, mediante una espátula esterilizada previamente. Se marcaron las placas de agar YME no inoculadas recién producidas con una línea en el reverso de la caja Petri. Se puso esta línea con una longitud fijada de 4 cm en el medio de la caja Petri. Con posterioridad, se transfirió un tapón de agar inoculado con *Streptomyces* a la placa de agar YME reciente en el extremo izquierdo de la línea. Se repitió la etapa «transferencia del tapón» ya descrita para los respectivos hongos. Se pusieron los respectivos tapones de hongos en el extremo de la derecha de la línea en la misma placa de agar YME. Se estimuló cada cepa de *Streptomyces* por triplicado contra cada hongo. Para cada hongo ensayado, se tomó una muestra de control (por triplicado) usando un tapón de agar no inoculado que se puso en el lado izquierdo de la caja Petri. A continuación, se pusieron las placas con los tapones en la parte de arriba en una incubadora. Con posterioridad, se almacenaron las placas a 28 °C durante 7 días. Después de 7 días se midió el radio de la colonia fúngica en la dirección del tapón de agar opuesto (muestra de *Streptomyces*). Se repitió esta etapa para la muestra de control. Se calculó la zona de inhibición (en porcentaje) usando la siguiente fórmula: $100 \% * (r_0 - r_1) / r_0$, en donde r_0 es el radio (en mm, corregido para el radio del tapón) de la colonia fúngica de la muestra de control y en donde r_1 es el radio (en mm, corregido para el radio del tapón) de la colonia fúngica de la muestra inhibida con *Streptomyces*.

45 Los resultados demuestran que el crecimiento fúngico para las cepas de *S. natalensis* productoras de natamicina estaba considerablemente inhibido. Todas las cepas superaron a la muestra de control sin *S. natalensis* y la inhibición promedio varió de un 53 % a 66 % dependiendo de las cepas ensayadas (véase la tabla 1). Los resultados demuestran claramente que las cepas de *S. natalensis* presentan el potencial para inhibir diferentes especies de patógenos fúngicos de plantas.

50 Se seleccionaron *S. natalensis* con el código interno DS73870 y DS73871 para más investigación. Se depositaron las cepas bajo los términos del Tratado de Budapest con el Centraal Bureau voor Schimmelcultures (CBS), Utrecht, Países Bajos, el 20 de mayo de 2014. Se había depositado cepa DS73870 de *S. natalensis* como cepa CBS 137965. Se había depositado cepa DS73871 de *S. natalensis* como cepa CBS 137966.

Ejemplo 2 (no según la invención)

Actividad antifúngica de cepas de *Streptomyces* productoras de natamicina

Se ensayó en las siguientes cepas de *Streptomyces* productoras de natamicina la actividad antifúngica en un experimento *in vitro*: *Streptomyces natalensis* ATCC-27448 (tipo cepa), *Streptomyces natalensis* DS73871,

Streptomyces natalensis DS73870 y *Streptomyces chattanoogensis* ATCC-19673.

Se ensayaron cinco patógenos fúngicos de plantas contra las cepas de *Streptomyces* seleccionadas: *Fusarium oxysporum* f. sp., *lycopersici* (CBS414.90), *Colletotrichum gloeosporioides* (CBS272.51), *Alternaria alternata* (CBS103.33), *Aspergillus niger* (ATCC16404) y *Botrytis cinerea* (CBS156.71). *Aspergillus niger*, también conocida como moho negro, es una de las especies más comunes de *Aspergillus*. Este morador ubicuo del suelo es responsable de pérdidas graves en diferentes tipos de cultivo, tales como: cebollas (podredumbre negra), uvas (podredumbre roja) y cacahuetes (podredumbre del cuello). *Botrytis cinerea* es el agente causante de las enfermedades por humo gris. Esta enfermedad está registrada en un amplio rango de cosechas y presenta un alto impacto económico. Para las enfermedades de plantas relacionadas con *Fusarium oxysporum* f. sp., *lycopersici*, *Colletotrichum gloeosporioides* y *Alternaria alternata*, véase el ejemplo 1. Se ensayaron las cepas de *S. natalensis* seleccionadas contra estos patógenos fúngicos de las plantas como se describe a continuación.

Se transfirieron viales congelados (disoluciones de reserva de glicerol) de las cepas de *S. natalensis* seleccionadas a matraces Erlenmeyer con deflector de 100 ml que contenían 20 ml de caldo de extracto de levadura y malta (YME). Se incubaron los matraces Erlenmeyer en un agitador de incubación durante 3 días a 28 °C y 19 rad/s (180 rpm).

Para cada cepa, se transfirieron 200 µl de medios líquidos a placas de agar YME y se incubaron durante 4 días a 28 °C para potenciar la cobertura completa de las colonias de la superficie de la placa.

Se puso en placas *Botrytis cinerea* directamente de una disolución de reserva de glicerol (100 µl) en agar YME y con posterioridad se incubó durante 9 días a 28 °C. Se pusieron en placas todos los demás hongos seleccionados directamente de una disolución de reserva de glicerol (200 µl) en agar YME y con posterioridad se incubaron durante 4 días a 28 °C.

El bioanálisis se realizó según el procedimiento descrito en el ejemplo 1, con la modificación de que se ensayaron todas las variables cinco veces. Se almacenaron las placas a 28 °C durante 7 u 11 días, dependiendo del crecimiento de la colonia fúngica de las muestras de control. Después de la incubación, se midió el radio de la colonia fúngica según el método descrito en el ejemplo 1.

Los resultados demuestran que el crecimiento fúngico para las cepas productoras de natamicina (*Streptomyces natalensis* & *Streptomyces chattanoogensis*) se inhibió en todas las muestras ensayadas comparado con las muestras de control. La inhibición promedio varió de un 2 % a 78 % dependiendo de las cepas ensayadas (véase la tabla 2). Por lo tanto, estos resultados demuestran claramente que las cepas de *Streptomyces* productoras de natamicina presentan el potencial para inhibir diferentes especies de patógenos fúngicos de plantas.

Las cepas de *S. natalensis* mostraron una mayor reducción en el desarrollo del radio fúngico comparado con la *S. chattanoogensis*. Además, las cepas de *S. natalensis* DS73870 y DS73871 superaron claramente la cepa ATCC-27448 (= tipo cepa) de *S. natalensis*. Dependiendo de las cepas fúngicas ensayadas, la inhibición promedio de ATCC-27448 de *S. natalensis* varió entre un 26 % y 53 %, mientras la inhibición promedio de DS73870 y DS73871 de *S. natalensis* varió entre un 59 % y 78 % (véase la tabla 2).

Ejemplo 3 (no según la invención)

Actividad antifúngica de cepas DS73871 y DS73870 de *Streptomyces natalensis* productoras de natamicina contra *Verticillium albo-atrum*.

En otro experimento, se ensayó en las cepas DS73871 de *Streptomyces natalensis* y DS73870 de *Streptomyces natalensis* productoras de natamicina la actividad antifúngica contra *Verticillium albo-atrum* (CBS321.91).

Se asocia *Verticillium albo-atrum* con *Verticillium wilt*. Este hongo de tierra puede ocasionar graves pérdidas en las recolecciones en una amplia variedad de cultivos, principalmente en las regiones de clima más frío.

Se realizó el experimento según el método descrito en el ejemplo 1 con la condición de que se ensayaran todas las variables cinco veces. Para la producción de tapones fúngicos, se puso en placas *Verticillium albo-atrum* (CBS321.91) directamente de una disolución de reserva de glicerol (200 µl) en agar YME y, con posterioridad, se incubaron durante 4 días a 28 °C.

Se redujo el radio fúngico de *Verticillium albo-atrum* para las cepas DS73871 y DS73870 de *Streptomyces natalensis* productoras de natamicina por respectivamente un 44 % y 45 % el día 11. Después de 25 días la zona de inhibición se redujo incluso más a 76 % y 71 % para las cepas DS73871 y DS73870, respectivamente (véase la tabla 3).

Estos resultados demuestran claramente que las DS73870 y DS73871 de *S. natalensis* presentan la capacidad para inhibir *Verticillium albo-atrum*.

Ejemplo 4 (no según la invención)

Actividad antifúngica de DS73871 y DS73870 de *Streptomyces natalensis* productoras de natamicina contra *Cercospora zeae-maydis*.

En otro experimento, se ensayó en las cepas DS73871 y DS73870 de *Streptomyces natalensis* productoras de natamicina la actividad antifúngica contra *Cercospora zeae-maydis* (CBS117757). *Cercospora zeae-maydis* ocasiona «manchas de las hojas del tomate», una de las enfermedades foliares más importantes en el choclo.

Se realizó el experimento según el método descrito en el ejemplo 1, con la única excepción de que las cajas Petri para el «bioensayo» (que contenían tapones tanto bacterianos como de mohos) se almacenaron durante 28 días a 28 °C en vez de 7 días.

Los resultados (véase la tabla 4) demuestran claramente el efecto inhibitorio de las cepas DS73870 y DS73871 de *S. natalensis* sobre el crecimiento de *Cercospora zeae-maydis*. El radio de la colonia fúngica disminuyó por un 84 % y 63 % para la cepa bacteriana para DS73871 de *S. natalensis* y DS73870 de *S. natalensis*, respectivamente.

Ejemplo 5 (no según la invención) cepas productoras de natamicina

Actividad antifúngica de DS73871 y DS73870 de *Streptomyces natalensis* productoras de natamicina comparado con otras de *Streptomyces* sp. contra *Colletotrichum gloeosporioides*

Este ejemplo describe la comparación de actividad antifúngica de cepas DS73871 y DS73870 de *Streptomyces natalensis* y varias *Streptomyces* sp. (*S. griseus*, *S. griseoviridis* y *S. rochei*) no productoras de natamicina contra el patógeno fúngico de las plantas *Colletotrichum gloeosporioides*. Se solicitaron las cepas no productoras de natamicina analizadas de los siguientes depositarios públicos: *S. griseus* (NRRLB1354), *S. griseoviridis* (NRRL2427) y *S. rochei* (CBS939.68).

Se realizó el experimento según el método descrito en el ejemplo 1 con la condición de que se ensayaran todas las variables cinco veces y se potenció el tiempo de preincubación (caldo de cultivo) de 3 días a 4 para permitir el crecimiento completo de todas cepas. La inhibición fúngica en el radio de las colonias de *Colletotrichum gloeosporioides* (CBS272.51) se determinó después de 6 días de incubación a 28 °C.

Los resultados pueden encontrarse en la tabla 5. El radio fúngico de *C. gloeosporioides* se redujo claramente para la especie de *Streptomyces* opuesta en todas las muestras comparado con el control (no *Streptomyces* sp.). Además, tanto DS73871 como DS73870 de *Streptomyces natalensis* mostraron un efecto inhibitorio más fuerte (respectivamente 56 % y 54 %) comparado con las especies de *Streptomyces* no productoras de natamicina (entre 7 % y 33 %).

Ejemplo 6 (no según la invención)

Actividad antifúngica de DS73871 y DS73870 de *Streptomyces natalensis* productoras de natamicina comparado con otra *Streptomyces* sp. contra *Fusarium oxysporum* f. sp., *lycopersici*.

En otro experimento, se compararon las cepas DS73871 y DS73870 de *Streptomyces natalensis* productoras de natamicina con las especies de *Streptomyces* no productoras de natamicina: *S. noursei* y *S. griseus* por la actividad antifúngica contra *Fusarium oxysporum* f. sp., *lycopersici*.

Las tres especies de *Streptomyces* seleccionadas se describen en la bibliografía por su capacidad para producir componentes antifúngicos. Se solicitaron las cepas no productoras de natamicina analizadas de los siguientes depositarios públicos: *Streptomyces noursei* (CBS240.57) y *S. griseus* (NRRLB1354).

Se realizó el experimento según el método descrito en el ejemplo 1 con la condición de que se ensayaran todas las variables cinco veces y se potenció el tiempo de preincubación (caldo de cultivo) de 3 días a 4 para permitir el crecimiento completo de todas las cepas. Se determinó la inhibición fúngica del radio de la colonia de *Fusarium oxysporum* f. sp., *lycopersici* (CBS414.90) después de 7 días de incubación a 28 °C.

El crecimiento de la colonia de *Fusarium oxysporum* f. sp., *lycopersici* (CBS414.90) puede encontrarse en la tabla 6. La zona de inhibición promedio se redujo claramente cuando se estimuló contra la especie de *Streptomyces* (entre 11 % y 60 %). Sin embargo, la inhibición fúngica de la especie *Streptomyces* productora de natamicina (60 % y 54 % para DS73870 y DS73871, respectivamente) fue claramente mayor comparado con la especie de *Streptomyces* (11 % y 32 % para *S. griseus* y *S. noursei*, respectivamente) no productora de natamicina.

Ejemplo 7 (no según la invención)

Actividad antifúngica de ATCC 27448 de *Streptomyces natalensis* productora de natamicina comparado con natamicina pura contra *Colletotrichum gloeosporioides*.

En otro experimento, se cultivó la cepa ATCC 27448 de *Streptomyces natalensis* productora de natamicina en

placas de agar YME para determinar la concentración de natamicina en los medios de agar. En una etapa a continuación, se comparó la bioactividad de la cepa de *Streptomyces natalensis* en un rango de concentración de natamicina pura (disuelta en metanol) contra *Colletotrichum gloeosporioides*. Este experimento se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito a continuación.

5

Se transfirió un vial congelado que contenía medio de cultivo ATCC 27448 de *Streptomyces natalensis* a un matraz Erlenmeyer con deflector de 100 ml que contenía 20 ml de caldo de extracto de levadura y malta (YME). Se incubó el matraz Erlenmeyer en un agitador de incubación durante 4 días a 28 °C y 19 rad/s (180 rpm). Se transfirieron 200 µl del caldo de cultivo de crecimiento completo (duplicado) a cajas Petri de 90 mm que contenían exactamente 20 ml de agar YME (YMEA). Con posterioridad, se dispersó el inóculo con el uso de un extendedor estéril en la superficie del medio. Se incubaron las placas durante 4 días a 28 °C para potenciar la cobertura completa de las colonias. Después de la incubación se liofilizaron las placas (liofilizador Alpha 2-4 LD, Christ). Se transfirió el contenido liofilizado de cada placa de agar a un matraz volumétrico y se llenó con MilliQ precalentado (50 °C) a un volumen final de 500 ml.

10

15

Se agitó esta disolución durante aproximadamente 30 minutos, se centrifugó (8 minutos, 21 000 rcf (fuerza centrífuga relativa, en inglés)) y se ensayó el sobrenadante, con posterioridad, en cuanto a la concentración de natamicina. La concentración de natamicina se determinó usando un método basado en la bibliografía conocido (HPLC-UV) y se calculó la concentración promedio en la placa del medio.

20

En una etapa a continuación, se reprodujo el cultivo desarrollado completo de ATCC-27448 de *Streptomyces natalensis* en YMEA (20 ml de medios en cada caja Petri de 90 mm), usando el protocolo ya descrito. Este cultivo se usó para un bioanálisis contra *Colletotrichum gloeosporioides* (CBS272.51) usando el bioanálisis como se describe en el ejemplo 1. A continuación de las muestras inoculadas de ATCC-27448 de *Streptomyces natalensis*, se tomaron muestras de control usando un tapón de agar no inoculado.

25

En paralelo, se produjeron placas de YMEA que contenían diferentes concentraciones de natamicina pura. Por lo tanto, se prepararon disoluciones de reserva de natamicina disolviendo natamicina (grado analítico, DSM Food Specialties, Delft, Países Bajos) en metanol (Merck, grado gradiente para cromatografía líquida, ≥99,9 %). Con posterioridad, se añadieron las disoluciones de reserva de natamicina a agar YME líquida (45 °C, corregidas por la adición de metanol disminuyendo el contenido de agua) en una relación 1:19 y se mezclaron a fondo por el medio. Las concentraciones finales de natamicina en el agar fueron respectivamente: (500, 375, 250, 175, 100, 75, 50, 25, 10 y 0) ppm de natamicina. Las placas de YMEA de natamicina de 0 ppm contenían un 5 % (p/p) de metanol solo. Se transfirió YMEA líquido a cajas Petri (20 ml de medio en cada caja Petri de 90 mm, hecho por triplicado). Después de solidificación, se usaron las placas YMEA para el método de bioanálisis contra *Colletotrichum gloeosporioides* (CBS272.51) como se describe en el ejemplo 1. Se trataron todas las muestras en el mismo día.

30

35

Después de 7 días de incubación a 28 °C se determinaron el radio fúngico y la zona de inhibición para *Colletotrichum gloeosporioides* (CBS272.51) (véase el método descrito en el ejemplo 1).

40

Se midió que la concentración promedio de natamicina que se producía por ATCC-27448 de *Streptomyces natalensis* durante preincubación en el medio de agar, era menor que 10 ppm (sin embargo, no 0 ppm). Disolviendo 10 ppm de natamicina pura directamente en un tapón de agar, la zona de inhibición de *Colletotrichum gloeosporioides* no fue tan alta comparado con la zona de inhibición producida por el tapón de agar de ATCC-27448 de *Streptomyces natalensis* (véase la tabla 7). Se igualaron zonas de inhibición similares a tasas de concentración mucho mayores (aproximadamente 375 ppm).

Ejemplo 8

Tratamiento de plantas de maíz

45

Se proporcionó una disolución de reserva de glicerol de esporas de una cepa bacteriana productora de natamicina (ATCC27448). Se usó una alícuota de la disolución de reserva para cultivar la cepa en un matraz de 1 l con 200 ml de medio líquido YEME sin sacarosa (véase www.elabprotocols.com) y perlas de vidrio (para romper los agregados). Se puso el matraz de cultivo en un agitador a 21 rad/s (200 rpm) a 28 °C durante 72 horas. Se transfirió la suspensión resultante a un tubo de 250 ml y se centrifugó a 838 rad/s (8000 rpm) durante 15 minutos. Se resuspendió el botón resultante en agua estéril a una concentración final de 200 mg/ml. Se usó esta suspensión como el inóculo de cepa para el experimento en invernadero a continuación.

50

55

Se cultivó *Cercospora zeae-maydis* en placas de jugo de agar V8 al 30 % y se incubaron durante 2 semanas con luz diurna y 25 °C (véase Beckman and Payne, 1983). Para preparar el inóculo para el estudio en invernadero, se recolectaron conidias inundando las placas con 3 ml de Tween-20 al 0,01 % y desplazando las esporas con cuidado con puntas de pipeta estériles. Se realizó este procedimiento dos veces. La suspensión de conidias resultante obtuvo aproximadamente 10⁴ conidias/ml.

Se esterilizó la superficie de semillas de maíz (Pioneer Hybrid 35F40) enjuagándolas primero con etanol al 70 % y remojándolas después en una disolución de hipoclorito de sodio. Se remojaron las semillas de maíz resultantes en NaClO al 0,5 % + una gota de Tween-20 durante 20 minutos. Se enjuagaron después las semillas 5 veces con agua destilada estéril.

- 5 Se sembraron las semillas en macetas de 8,26 cm x 8,26 cm x 8,26 cm (3,25" x 3,25" x 3,25") que contenían vermiculita gruesa/expandida (Therm-O-Rock West, Inc., AZ). Se sembraron dos semillas en cada maceta. Cuando nacieron las plántulas, se entresacaron para dejar una planta por maceta.

- 10 Se dejó que crecieran las plantas en el invernadero con las siguientes condiciones: temperatura del día 25 °C y temperatura de la noche 18 °C; 14 horas de luz y 10 horas de oscuridad. Se suministró fertilizante completo a las plantas durante todo el periodo de crecimiento.

Cuarenta y dos (42) días después de la plantación, se iniciaron los tratamientos. Los tratamientos aplicados fueron:

- a) Tratamiento 1: Control;
- b) Tratamiento 2: Planta inoculada con una cepa bacteriana productora de natamicina primero y 4 días más tarde, se inoculó con *Cercospora zeae-maydis*;
- 15 c) Tratamiento 3: Planta inoculada con *Cercospora zeae-maydis* primero y 4 días más tarde, se inoculó con cepa bacteriana productora de natamicina;
- d) Tratamiento 4: Planta inoculada con cepa bacteriana productora de natamicina;
- e) Tratamiento 5: Planta inoculada con *Cercospora zeae-maydis*.

Se realizaron diez replicados biológicos por tratamiento.

- 20 Se inocularon las plantas de maíz con patógeno pulverizando suspensión de esporas de *Cercospora zeae-maydis* directamente en las hojas. Después se encerraron las plantas de maíz en una carpa de plástico claro para mantener una humedad relativamente alta alrededor de las plantas. Una humedad relativamente alta es un requerimiento para el establecimiento de infección por *Cercospora zeae-maydis* en hojas de maíz. Se retiraron las cubiertas de plástico 5 días después de la aplicación del tratamiento.

- 25 Se aplicó la cepa bacteriana productora de natamicina añadiendo 2 ml de la cepa en la región de la raíz de las plantas. Esto es equivalente a 400 mg de inóculo por maceta. Se vigilaron las plantas durante cinco semanas después de iniciación de cada tratamiento para desarrollo de la enfermedad así como promoción del crecimiento.

- 30 Para evaluar si había diferencias estadísticamente significativas en el crecimiento, se midió la altura de la planta (método de la altura libre) a los 84 días después de la plantación (DDP). Los resultados mostraron que las plantas tratadas con la cepa bacteriana productora de natamicina sola producían plantas más altas que cualquier otro tratamiento a los 84 DDP (véase la figura 1). Esto demuestra que las cepas bacterianas productoras de natamicina potencian el crecimiento de la planta.

Ejemplo 9 (no según la invención)

- 35 Efecto del tratamiento de la planta con DS73870 y DS73871 de *Streptomyces natalensis* en cultivo de lechuga en suelo infestado de manera artificial con *Rhizoctonia solani*.

- 40 Se obtuvo *Rhizoctonia solani* (CBS 323.84), un patógeno de plantas existente en el suelo, a partir de una placa de agar de medio MEA de 9 días (temperatura de incubación 24 °C) y disuelto en agua. Se mezcló cuidadosamente el inóculo fúngico (50 ml/l de suelo) por el suelo (90 % de turba, 10 % de arena). Se llenaron las bandejas de plántulas con el suelo inoculado (7,5 litros de suelo por bandeja de semillas) y se incubaron durante 2 días. Con posterioridad, se pusieron las semillas en el suelo a una profundidad de aproximadamente 1 cm.

- 45 El tratamiento de las plantas empezó 4 días después de la siembra (fase de siembra) y se repitió semanalmente durante un máximo de 3 semanas. Para cada tratamiento de planta, se preparó un caldo de cultivo de *S. natalensis* reciente. Por lo tanto, se transfirió un vial congelado de cepas DS73870 de *Streptomyces natalensis* a matraces Erlenmeyer de 100 ml con deflector que contenían 20 ml de caldo de extracto de levadura y malta (YME). Se incubaron los matraces Erlenmeyer en un agitador de incubación durante 3 ~ 4 días a 28 °C y 19 rad/s (180 rpm) (G24 Environmental Incubator Shaker, New Brunswick Scientific Co.). Con posterioridad, se transfirieron 2 ml de caldo cultivado a matraces Erlenmeyer de 500 ml con deflector que contenían 200 ml de caldo YME. Se incubó el medio durante otros 4 días a 28 °C y 19 rad/s (180 rpm) (Orbital Incubator Inr200-010V, Gallenkamp). El recuento bacteriano promedio después de incubación de las muestras de DS73870 de *S. natalensis* fue 7,1 (+/- 0,6) log UFC/ml.
- 50

Se transportaron las muestras (en condiciones refrigeradas) a una instalación de laboratorio de invernadero y se trataron en 24 horas. Por lo tanto, se diluyó el medio que contenía DS73870 de *S. natalensis* 100 veces en agua potable. A partir de este medio diluido, se añadieron 7 ml a cada planta por riego del suelo alrededor de la plántula o tallo. Se trataron muestras de control en las mismas condiciones que para las muestras tratadas con *S. natalensis*, con la excepción de que solo se añadió agua potable.

Se ensayó cada tratamiento en 4 replicados. Cada replicado consistió en 1 bandeja de plántulas que contenía 96 semillas. Las pruebas se llevaron a cabo de acuerdo con las directrices EPPO PP 1/148(2), PP 1/135(3) y PP 1/152(4). Se mantuvieron los tratamientos en las condiciones controladas de invernadero y se regaron a intervalos de tiempo fijados. Se valoraron las plántulas o plantas semanalmente sobre: tasa de germinación y gravedad de la enfermedad durante un máximo de un mes después de la siembra.

Los resultados de este estudio se resumen en la tabla 8 (tasa de germinación) y la tabla 9 (gravedad de la enfermedad de la planta). El número observado de plantas no afectadas aumentó cuando se trataron las plantas con DS73870 de *Streptomyces natalensis* comparado con un tratamiento con medio estéril (control). También, la cantidad de plantas de lechuga que no germinaron o que murieron después de la germinación (clasificadas como no presentes) fue mucho mayor para las muestras de control comparado con las muestras tratadas de *S. natalensis*. Esta tendencia se observó también para la gravedad de la enfermedad de la planta, en que las plantas tratadas con DS73870 de *S. natalensis* mostraron una clara reducción (véase la tabla 9) cuando se compara con el control.

Como conclusión, aplicando una cepa de *S. natalensis* productora de natamicina a una planta, se potencian tanto el crecimiento de las plantas como la vitalidad de las cosechas que se ven afectadas por patógenos fúngicos de las plantas.

Tabla 1: Radio fúngico de diferentes patógenos de plantas ensayados contra varias cepas de *Streptomyces natalensis* en placas de agar de YME después de 7 días de incubación a 28 °C.

Hongos ensayados	Cepa de <i>S. natalensis</i> ensayada	Radio fúngico (en mm)	Zona de inhibición promedio (en %)
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp., <i>lycopersici</i> (CBS414.90)	Control (no cepa de <i>S. natalensis</i>)	28,7	0
	DS10599	13,3	53
	DS10601	12,0	58
	DS73871	11,3	60
	DS73309	12,7	56
	DS73311	13,3	53
	DS73312	12,7	56
	DS73870	11,3	60
	DS73352	11,3	60
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (CBS272.51)	Control (no cepa de <i>S. natalensis</i>)	39,3	0
	DS10599	16,3	58
	DS10601	15,7	60
	DS73871	14,0	64

Hongos ensayados	Cepa de <i>S. natalensis</i> ensayada	Radio fúngico (en mm)	Zona de inhibición promedio (en %)
	DS73309	16,0	59
	DS73311	14,3	64
	DS73312	15,0	62
	DS73870	13,3	66
	DS73352	13,7	65
<i>Alternaria alternate</i> (CBS103.33)	Control (no cepa de <i>S. natalensis</i>)	22,3	0
	DS10599	9,3	58
	DS10601	9,0	60
	DS73871	8,3	63
	DS73309	8,7	61
	DS73311	8,0	64
	DS73312	8,3	63
	DS73870	8,7	61
	DS73352	8,3	63

Tabla 2: Radio fúngico de diferentes patógenos de plantas ensayados contra varias cepas de especies de *Streptomyces* productoras de natamicina en placas de agar de YME después de 7 u 11 días de incubación a 28 °C.

Hongos ensayados	Días de incubación	Cepa de <i>Streptomyces</i> ensayada	Radio fúngico (en mm)	Zona de inhibición promedio (en %)
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp., <i>lycopersici</i> (CBS414.90)	7	Control (no cepa de <i>Streptomyces</i>)	36,9	0
	7	ATCC 19673 de <i>S. chattanoogensis</i>	33,9	8
	7	ATCC27448 de <i>S. natalensis</i>	27,5	26
	7	DS73871 de <i>S. natalensis</i>	14,8	60
	7	DS73870 de <i>S. natalensis</i>	14,0	62

ES 2 694 810 T3

Hongos ensayados	Días de incubación	Cepa de <i>Streptomyces</i> ensayada	Radio fúngico (en mm)	Zona de inhibición promedio (en %)
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (CBS272.51)	7	Control (no cepa de <i>Streptomyces</i>)	42,2	0
	7	ATCC 19673 <i>S. chattanoogensis</i>	35,5	16
	7	ATCC27448 <i>S. natalensis</i>	30,2	28
	7	DS73871 de <i>S. natalensis</i>	16,6	61
	7	DS73870 de <i>S. natalensis</i>	17,4	59
<i>Alternaria alternata</i> (CBS103.33)	11	Control (no cepa de <i>Streptomyces</i>)	43,5	0
	11	ATCC 19673 de <i>S. chattanoogensis</i>	38,3	12
	11	ATCC27448 de <i>S. natalensis</i>	20,6	53
	11	DS73871 de <i>S. natalensis</i>	9,9	77
	11	DS73870 de <i>S. natalensis</i>	9,8	78
<i>Aspergillus niger</i> (ATCC16404)	7	Control (no cepa de <i>Streptomyces</i>)	43,4	0
	7	ATCC 19673 de <i>S. chattanoogensis</i>	42,5	2
	7	ATCC27448 de <i>S. natalensis</i>	28,2	35
	7	DS73871 de <i>S. natalensis</i>	14,8	66
	7	DS73870 de <i>S. natalensis</i>	15,7	64
<i>Botrytis cinerea</i> (CBS156.71)	11	Control (no cepa de <i>Streptomyces</i>)	7,7	0
	11	ATCC 19673 de <i>S. chattanoogensis</i>	5,4	30

Hongos ensayados	Días de incubación	Cepa de <i>Streptomyces</i> ensayada	Radio fúngico (en mm)	Zona de inhibición promedio (en %)
	11	ATCC27448 de <i>S. natalensis</i>	5,1	33
	11	DS73871 de <i>S. natalensis</i>	2,3	70
	11	DS73870 de <i>S. natalensis</i>	2,0	74

Tabla 3: Radio fúngico de *Verticillium albo-atrum* (CBS321.91) ensayada contra DS73870 de *Streptomyces natalensis* y DS73871 en placas de agar YME después de 11 días y 25 días de incubación a 28 °C.

Hongos ensayados	Días de incubación	Cepa de <i>S. natalensis</i> ensayada	Radio fúngico (en mm)	Zona de inhibición promedio (en %)
<i>Verticillium albo-atrum</i>	11	Control (no <i>S. natalensis</i> cepa)	7,1	0
	11	DS73871 de <i>S. natalensis</i>	4,0	44
	11	DS73870 de <i>S. natalensis</i>	3,9	45
	25	Control (no <i>S. natalensis</i> cepa)	17,5	0
	25	DS73871 de <i>S. natalensis</i>	4,2	76
	25	DS73870 de <i>S. natalensis</i>	5,0	71

- 5 Tabla 4: Radio fúngico de *Cercospora zeae-maydis* (CBS117757) ensayada contra DS73870 y DS73871 de *Streptomyces natalensis* en placas de agar YME después de 28 días de incubación a 28 °C.

Hongos ensayados	Cepa de <i>S. natalensis</i> ensayada	Radio fúngico (en mm)*	Zona de inhibición promedio (en %)
<i>Cercospora zeae-maydis</i>	Control (no cepa de <i>S. natalensis</i>)	6,3	0
	DS73871 de <i>S. natalensis</i>	1,0	84
	DS73870 de <i>S. natalensis</i>	2,3	63

Tabla 5: Radio fúngico de *Colletotrichum gloeosporioides* (CBS272.51) ensayada contra varias *Streptomyces* sp. en placas de agar YME después de 6 días de incubación a 28 °C.

Hongos ensayados	Días de incubación	Cepa <i>Streptomyces</i> ensayada	Radio fúngico (en mm)	Zona de inhibición promedio (en %)
------------------	--------------------	-----------------------------------	-----------------------	------------------------------------

Hongos ensayados	Días de incubación	Cepa <i>Streptomyces</i> ensayada	Radio fúngico (en mm)	Zona de inhibición promedio (en %)
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	6	Control (no cepa de <i>Streptomyces</i>)	37,9	0
	6	DS73870 <i>S. natalensis</i>	17,4	54
	6	DS73871 <i>S. natalensis</i>	16,7	56
	6	NRRLB1354 <i>S. griseus</i>	25,4	33
	6	NRRL2427 <i>S. griseoviridis</i>	35,1	7
	6	CBS939.68 <i>S. rochei</i>	34,2	10

Tabla 6: Radio fúngico de *Fusarium oxysporum* f. sp., *lycopersici* (CBS414.90) ensayada contra varias *Streptomyces* sp. en placas de agar YME después de 7 días de incubación a 28 °C.

Hongos ensayados	Días de incubación	Cepa <i>Streptomyces</i> ensayada	Radio fúngico (en mm)	Zona de inhibición promedio (en %)
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp., <i>lycopersici</i>	7	Control (no cepa de <i>Streptomyces</i>)	37,0	0
	7	DS73870 <i>S. natalensis</i>	15,0	60
	7	DS73871 de <i>S. natalensis</i>	17,0	54
	7	NRRLB1354 <i>S. griseus</i>	33,1	11
	7	CBS240.57 <i>S. noursei</i>	25,1	32

- 5 Tabla 7: Bioanálisis de tapón de agar. Radio fúngico de *Colletotrichum gloeosporioides* (CBS272.51) ensayada contra ATCC27448 de *S. natalensis* y diferentes relaciones de natamicina pura disuelta en metanol (5 % p/p). Resultados producidos en placas de agar YME después de 7 días de incubación a 28 °C.

Hongos ensayados	Contenido del tapón	Radio fúngico (en mm)	Zona de inhibición promedio (en %)
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Control (tapón estéril)	46,3	0
	ATCC27448 de <i>S. natalensis</i> (que contiene <10 ppm de natamicina procedente de preincubación)	29,3	37
	0 ppm de natamicina*	45,2	2
	10 ppm de natamicina*	44,3	4
	25 ppm de natamicina*	43,2	7
	50 ppm de natamicina*	39,3	15

Hongos ensayados	Contenido del tapón	Radio fúngico (en mm)	Zona de inhibición promedio (en %)
	75 ppm de natamicina*	37,8	18
	100 ppm de natamicina*	36,7	21
	175 ppm de natamicina*	34,8	25
	250 ppm de natamicina*	33,2	28
	375 ppm de natamicina*	30,3	35
	500 ppm de natamicina*	27,3	41
* disuelto en YMEA que contiene metanol al 5 % p/p, la concentración dada es la concentración del tapón de agar			

Tabla 8: Efecto del tratamiento de la planta con DS73870 de *Streptomyces natalensis* en la tasa de germinación de lechuga que crece en suelo infestado artificialmente con *Rhizoctonia solani*.

Tratamiento de la simiente	Día de medición t*	tasa de germinación (n = 96)			
		Crecimiento no afectado	Crecimiento anormal	Crecimiento inhibido	No presente**
control (no tratado)	7	11,3	20,8	1,3	62,8
DS73870 de <i>S. natalensis</i>		13,0	19,5	1,8	61,5
control (no tratado)	12	4,3	1,8	8,8	81,3
DS73870 de <i>S. natalensis</i>		11,0	2,0	8,3	74,8
control (no tratado)	19	6,0	8,5	7,0	74,5
DS73870 de <i>S. natalensis</i>		10,0	7,5	8,3	70,0
control (no tratado)	26	5,5	0,0	10,3	80,3
DS73870 de <i>S. natalensis</i>		8,3	0,0	13,3	74,5
control (no tratado)	32	5,3	1,3	11,8	77,8
DS73870 de <i>S. natalensis</i>		10,5	2,5	10,0	73,0
*medido desde día de la siembra (día 0)					

Tratamiento de la simiente	Día de medición t*	tasa de germinación (n = 96)			
		Crecimiento no afectado	Crecimiento anormal	Crecimiento inhibido	No presente**
**No germinado o muerto después de germinación					

Tabla 9: Efecto del tratamiento de la planta con DS73870 de *Streptomyces natalensis* sobre la gravedad de la enfermedad de la planta de lechuga que crece en suelo infestado artificialmente con *Rhizoctonia solani*.

Tratamiento de la planta	Día de medición*	Gravedad de la enfermedad de la planta (n = 96)				
		Sana	Leve	Moderada	Grave	No presente**
control	7	12,5	20,8	0,0	0,0	62,8
DS73870		14,8	19,5	0,0	0,0	61,5
control	12	1,5	0,0	0,8	12,5	81,3
DS73870		6,0	0,0	1,3	14,0	74,8
control	19	13,3	1,0	1,8	5,5	74,5
DS73870		19,8	2,8	0,5	2,8	70,0
control	26	11,0	0,0	0,0	4,8	80,3
DS73870		17,3	0,0	0,0	4,3	74,5
control	32	14,5	2,3	0,3	1,3	77,8
DS73870		20,3	1,3	0,3	1,3	73,0
*medido desde día de la siembra (día 0)						
**No germinado o muerto después de germinación						

REFERENCIAS

- Beckman PM and Payne GA (1983), Cultural techniques and conditions influencing growth and sporulation of *Cercospora zeae-maydis* and lesion development in corn. *Phytopathology* 73:286-289.
- 5 Chen GQ, Lu FP and Du LX (2008), Natamycin production by *Streptomyces gilvosporeus* based on statistical optimization. *J. Agric. Food Chem.* 56:5057-5061.
- Farid MA, El-Enshasy HA, El-Diwany AI and El-Sayed, EA (2000), Optimization of the cultivation medium for natamycin production by *Streptomyces natalensis*. *J. Basic Microbiol.* 40: 157-166.
- El-Enshasy HA, Farid MA and El-Sayed, EA (2000), Influence of inoculum type and cultivation conditions on natamycin production by *Streptomyces natalensis*. *J. Basic Microbiol.* 40: 333-342.
- 10 He YL, Wu JG, Lu FP and Du LX (2002) Fed-batch fermentation to improve the yield of natamycin. *Med. Biotechnol.* 9:224-226.
- Liang JG, Xu ZN, Liu TF, Lin HP and Cen PL (2008), Effects of cultivation conditions on the production of natamycin with *Streptomyces gilvosporeus* LK-196. *Enzyme Microb. Technol.* 42:145-150.
- 15 Martin JF and McDaniel LE (1977), Production of polyene macrolide antibiotics. *Advances in Appl. Microbiol.* 21:1-52.

Archivo del solicitante o agente número de referencia 29371-WO-PCT	Solicitud internacional n.º
--	-----------------------------

INDICACIONES RELATIVAS A UN MICROORGANISMO DEPOSITADO

(Regla PCT 13bis)

A. Las indicaciones que se hacen a continuación son relativas al microorganismo referido en la descripción mencionada primero en la página 4, línea 5.	
B. IDENTIFICACIÓN DE DEPÓSITO	
Se identifican más depósitos en una hoja adicional ☒	
Nombre de la institución depositaria CENTRAAL BUREAU VOOR SCHIMMELCULTURES	
Dirección de la institución depositaria (<i>incluyendo código postal y país</i>) Uppsalaalan 8 P.O. Box 85167 NL-3508 AD Utrecht Países Bajos	
Fecha de depósito	20 de mayo de 2014
Número de acceso CBS	137965
C. INDICACIONES ADICIONALES (<i>dejar en blanco si no aplicable</i>)	
Esta información continúa en una hoja adicional ☐	
Se informa que la disponibilidad del microorganismo identificado anteriormente, referido a la Regla 13bis PCT, se efectuará solo por expedición de una muestra para un experto elegido por el solicitante hasta la publicación de la mención de la concesión de la patente nacional o, cuando sea aplicable, durante veinte años a partir de la fecha de presentación si la solicitud ha sido denegada, retirada o se considera retirada.	
D. ESTADOS DESIGNADOS PARA LOS QUE SE HACEN LAS INDICACIONES (<i>si las indicaciones no son para todos los Estados designados</i>)	
E. SUMINISTRO SEPARADO DE INDICACIONES (<i>dejar en blanco si no aplicable</i>)	
Las indicaciones enumeradas a continuación serán presentadas en la Agencia Internacional más adelante (<i>especifique la naturaleza general de las indicaciones, por ejemplo, «número de acceso del depósito»</i>)	

Solo para uso de la Oficina receptora	
☐	Esta hoja fue recibida con la solicitud internacional
Agente responsable autorizado	

Solo para uso de la Agencia Internacional	
☐	Esta hoja fue recibida por la Agencia Internacional en:
Agente responsable autorizado	

Archivo del solicitante o agente número de referencia 29371-WO-PCT	Solicitud internacional n.º
--	-----------------------------

INDICACIONES RELATIVAS A UN MICROORGANISMO DEPOSITADO

(Regla PCT 13bis)

A. Las indicaciones que se hacen a continuación son relativas al microorganismo referido en la descripción mencionada primero en la página 4, líneas 5 y 6.	
B. IDENTIFICACIÓN DE DEPÓSITO	
Se identifican más depósitos en una hoja adicional ☐	
Nombre de la institución depositaria CENTRAAL BUREAU VOOR SCHIMMELCULTURES	
Dirección de la institución depositaria (<i>incluyendo código postal y país</i>) Uppsalaalan 8 P.O. Box 85167 NL-3508 AD Utrecht Países Bajos	
Fecha de depósito	20 de mayo de 2014
Número de acceso CBS	137966
C. INDICACIONES ADICIONALES (<i>dejar en blanco si no aplicable</i>)	
Esta información continúa en una hoja adicional ☐	
Se informa que la disponibilidad del microorganismo identificado anteriormente, referido a la Regla 13bis PCT, se efectuará solo por expedición de una muestra para un experto elegido por el solicitante hasta la publicación de la mención de la concesión de la patente nacional o, cuando sea aplicable, durante veinte años a partir de la fecha de presentación si la solicitud ha sido denegada, retirada o se considera retirada.	
D. ESTADOS DESIGNADOS PARA LOS QUE SE HACEN LAS INDICACIONES (<i>si las indicaciones no son para todos los Estados designados</i>)	
E. SUMINISTRO SEPARADO DE INDICACIONES (<i>dejar en blanco si no aplicable</i>)	
Las indicaciones enumeradas a continuación serán presentadas en la Agencia Internacional más adelante (<i>especifique la naturaleza general de las indicaciones, por ejemplo, «número de acceso del depósito»</i>)	

Solo para uso de la Oficina receptora Esta hoja fue recibida con la solicitud internacional Agente responsable autorizado	Solo para uso de la Agencia Internacional Esta hoja fue recibida por la Agencia Internacional en: Agente responsable autorizado
--	--

REIVINDICACIONES

1. Un método para potenciar el crecimiento de las plantas, el rendimiento de las cosechas o ambos, comprendiendo el método la etapa de aplicar al menos una cepa bacteriana productora de natamicina a una planta.
- 5 2. El método según la reivindicación 1, en donde la cepa se aplica en la forma de una composición que comprende un portador agrícolamente aceptable.
3. El método según la reivindicación 2, en donde la composición comprende de 10^3 - 10^{10} ufc/g de portador.
4. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la cepa bacteriana productora de natamicina se selecciona del grupo que consiste en: una cepa de *Streptomyces natalensis*, una cepa de *Streptomyces gilvosporeus* y una cepa de *Streptomyces chattanoogensis*.
- 10 5. Uso de al menos una cepa bacteriana productora de natamicina como un potenciador del crecimiento de las plantas y/o potenciador del rendimiento de las cosechas.

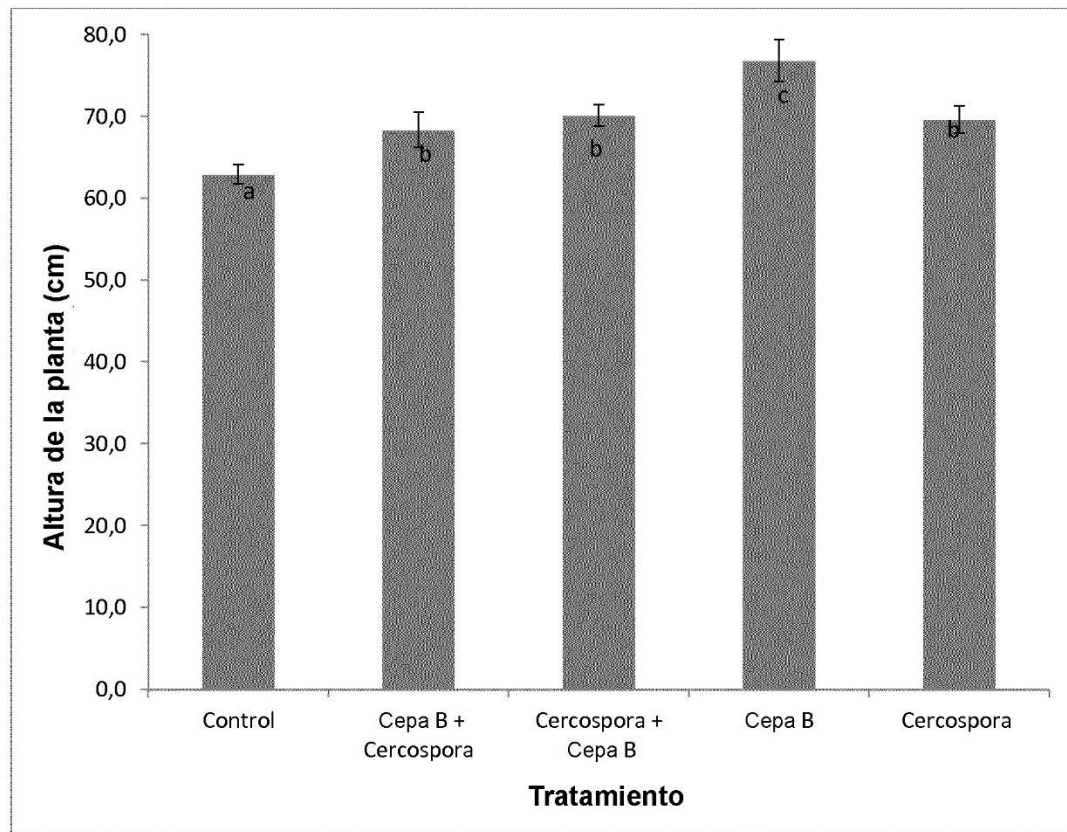


Fig. 1