

**USO DE COMPOSICIONES QUE CONTIENEN *STREPTOMYCES*
MELANOSPOROFACIENS AGL225 EN EL CONTROL DE ENFERMEDADES DE LAS
PLANTAS**

- 5 Esta solicitud reivindica la prioridad de la Solicitud de Patente Europea EP17382669.4 presentada el 06.10.2017.

Campo de la invención

- 10 La presente invención se refiere al campo de los bioplaguicidas, más concretamente a las cepas de *Streptomyces melanosporafaciens* y su utilización en el control biológico de las enfermedades de las plantas causadas por bacterias, hongos y nematodos, especialmente en los cultivos de hortalizas y árboles frutales.

15 **Antecedentes**

- Los efectos adversos del uso masivo de plaguicidas sintéticos en el medio ambiente y en la salud de los consumidores son bien conocidos. Debido a estos problemas el control de las enfermedades de las plantas tiende al uso racional de fungicidas y bactericidas, y a la
- 20 aplicación de productos menos tóxicos. Además, la protección de las plantas se orienta hacia la gestión integrada de plagas (MIP), combinando diferentes métodos (físicos, mecánicos, químicos, biológicos, genéticos, legales y culturales). Esta reorientación en la lucha contra las plagas y enfermedades ha dado lugar a un nuevo marco legislativo para la comercialización y el uso de productos fitosanitarios tanto en los Estados miembros de la Unión Europea como
- 25 en otros países. Este reglamento tiene por objeto reducir el uso de los productos fitosanitarios convencionales y poner en práctica su sostenibilidad mediante la gestión integrada de plagas y enfermedades, estableciendo que los medios de control fitosanitario deben ser preferentemente biológicos y físicos.

- 30 En este contexto, los bioplaguicidas basados en cepas de microorganismos beneficiosos para las plantas, principalmente las bacterias y los hongos asociados a ellas, ofrecen una alternativa o complemento a los plaguicidas sintéticos convencionales. Una de las principales ventajas de los plaguicidas microbianos es que su uso permite una producción de cultivos libre de residuos, lo cual es una ventaja especialmente para su autorización en la producción
- 35 agrícola orgánica. Sin embargo, en comparación con los plaguicidas químicos, actualmente

se dispone de un pequeño número de plaguicidas microbianos, la mayoría de los cuales son eficaces contra las enfermedades causadas por hongos pero no contra las enfermedades bacterianas. A pesar de las intensas investigaciones en este campo, la mayoría de las cepas microbianas que son ingredientes activos de productos biológicos comerciales, producen
5 metabolitos secundarios tóxicos, carecen de una idoneidad ecológica adecuada para la colonización de las plantas, muestran menos eficacia que los productos sintéticos, así como cierta inestabilidad a lo largo del tiempo, lo que dificulta su formulación en composiciones de larga duración. Además, como los plaguicidas microbianos son organismos vivos, las condiciones ambientales (temperatura, humedad relativa, lluvia, etc.) y las del huésped
10 (especie vegetal, cultivar, estado fenológico, etc.) influyen mucho en su actividad biológica, lo que hace que la eficacia del control de las enfermedades sea menor o más variable que con los plaguicidas químicos convencionales.

Un problema de muchos bioplaguicidas microbianos es que son incompatibles con los
15 plaguicidas sintéticos convencionales, lo que limita su uso en la gestión integrada de plagas y enfermedades en la agricultura. Por ejemplo, la mayoría de los ingredientes activos basados en cepas de hongos como *Trichoderma* o cepas antagonistas de *Gliocladium*, son sensibles a los fungicidas. En este sentido, las bacterias tienen la ventaja de que son insensibles a los fungicidas y, por lo tanto, compatibles con su uso simultáneo.

Además, uno de los principales requisitos para la aprobación de los microorganismos como bioplaguicidas por las autoridades competentes es su bioseguridad, que es evaluada por organismos como la Agencia de Protección Ambiental (EPA) o la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, Europa). Así pues, ciertos microorganismos que han
25 demostrado eficacia en el control de plagas y enfermedades han sido descartados como seguros debido a su posible patogenicidad oportunista para los seres humanos o los animales, como en el caso de ciertas especies de *Pseudomonas* y *Pantoea*, a las que se ha hecho referencia en casos clínicos, lo que constituye un obstáculo para su utilización como agentes bioplaguicidas.

En el desarrollo de un bioplaguicida microbiano también debe considerarse la capacidad de industrializar la producción de la cepa microbiana, así como su formulación, a fin de disponer de productos de larga vida útil. Esto se logra principalmente mediante formulaciones en polvo obtenidas por deshidratación, pero los procesos de secado afectan drásticamente la viabilidad
35 de los microorganismos, especialmente de las bacterias Gram negativas (por ejemplo,

Pseudomonas), que son más sensibles que las Gram positivas. En el caso de los géneros *Streptomyces* y *Bacillus* que producen esporas, se pueden preparar formulaciones adecuadas en tres componentes (células vegetativas, esporas y metabolitos de fermentación) con un alto rendimiento y aptitud en el entorno del cultivo de campo.

5

En un esfuerzo por reunir todas las ventajas descritas anteriormente, se han desarrollado comercialmente varias cepas de *Streptomyces* o especies afines como agentes de control biológico, como *Streptomyces lydicus* WYEC 108 y *Streptomyces* K61 (Montesinos y Bonaterra, 2009). Sin embargo, estas cepas muestran un perfil de actividad centrado principalmente en el control de patógenos fúngicos. Se han divulgado algunas cepas de *Streptomyces*, como *S. melanosporofaciens* EF-76 (WO2010115802) activo contra las enfermedades del tubérculo de la patata y varios patógenos de plantas del suelo, *S. yatesensis* CJS-24 (KR100869668) contra varias enfermedades fúngicas, y *Streptomyces saracetius* SS31 (US20140057336) con actividad antifúngica y nematocida.

15

Por consiguiente, sigue siendo necesario utilizar cepas bacterianas mejoradas en la lucha biológica contra las plagas, con una amplia actividad contra los hongos, las bacterias y los nematodos fitopatógenos.

20 **Resumen de la invención**

Los inventores han aislado una nueva cepa de *Streptomyces* a partir de una muestra natural de la rizosfera de una planta, que posee características que la hacen muy adecuada para su uso en la lucha biológica contra las plagas. La cepa se caracteriza por un espectro plaguicida sorprendentemente amplio, siendo muy eficiente en el control de diversos hongos y bacterias fitopatógenas, así como de nematodos. Esta cepa también induce las defensas de las plantas, lo que aumenta aún más su interés para su uso como bioplaguicida. La cepa también es convenientemente resistente al procesamiento industrial, tiene una larga vida útil y es resistente al estrés ambiental. En conjunto, esta cepa supera varias limitaciones que muestran otras cepas descritas en el estado de la técnica, como se muestra a continuación.

30

Por lo tanto, un primer aspecto de la invención se refiere a una cepa de *Streptomyces melanosporofaciens* AGL225 identificada en la Colección Española de Cultivos Tipo como *Streptomyces melanosporofaciens* CECT9420.

35

La cepa *S. melanosporofaciens* AGL225 de la invención fue aislada de las raíces de un álamo (*Populus nigra*) en Girona y fue depositada por el solicitante, de acuerdo con el Tratado de Budapest, el 18 de julio de 2017 en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), ubicada en la Universidad de Valencia, Parc Científic Universitat de València, Catedrático Agustín Escardino, 9, 46980 Paterna (Valencia). La cepa de *S. melanosporofaciens* fue depositada con la referencia de identificación AGL225 y recibió el número de adhesión CECT9420. En particular, esta cepa se caracteriza por mostrar:

- i) Actividad antagónica in vitro contra hongos y bacterias fitopatógenas en diversos medios de cultivo como el ISP2 (agar del Proyecto Internacional *Streptomyces*), el AIA (agar de aislamiento de *actinomices*), el Benedict y el SNM (agar de nitrato y almidón) (CUADRO 1).
- ii) Actividad antagónica contra las bacterias *Erwinia amylovora*, *Pseudomonas syringae* pv. *tomate*, *P. syringae* pv. *actinidiae*, *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*, y el hongo *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum* y *Stemphylium vesicarium* (CUADROS 1 y 2);
- iii) Actividades quitinolíticas y nematocidas contra el nematodo modelo *Caenorhabditis elegans* (CUADRO 1, CUADRO 4, FIG. 5).
- iv) Posee los genes para la producción de policétidos antimicrobianos de tipo II (act04), pero no tiene los genes para los antibióticos aminoglucósidos (FIG. 3).
- v) El medio de cultivo en el que se ha cultivado la cepa, una vez libre de células (sobrenadante de la suspensión de células cultivadas), tiene un perfil HPLC distintivo de metabolitos activos que son producidos por la cepa mediante fermentación. Este perfil de metabolitos es característico de la cepa AGL225 y la distingue de otras cepas de *Streptomyces* (FIG.4). Estos metabolitos también tienen actividad bactericida, fungicida y nematocida.
- vi) Induce las defensas naturales de la planta al ejercer una reacción de hipersensibilidad y también al inducir los genes de defensa en la planta (TABLA 3).
- vii) Tiene la capacidad de inhibir las infecciones causadas por las bacterias fitopatógenas *E. amylovora* en la pera, *P. syringae* pv. *tomate* en las plantas de tomate; *X. arboricola*

pv pruni en *Prunus*; y los hongos fitopatógenos *Sclerotinia sclerotiorum* en la lechuga, *F. oxysporum f. sp. radicis lycopersici* en el tomate, y *B. cinerea* en el tomate (FIG.6).

La cepa AGL225 tiene la gran ventaja de ejercer simultáneamente una actividad antifúngica, antibacteriana y nematocida. Además, esta cepa induce mecanismos de defensa naturales en las plantas. La existencia de estos cuatro mecanismos simultáneamente en una cepa de *Streptomyces* tiene la ventaja de reunir una amplia gama de mecanismos de control de enfermedades para un solo ingrediente activo en un producto fitosanitario.

La elevada actividad antagónica de la cepa de la invención contra los agentes fitopatógenos es en parte consecuencia de la producción de compuestos antimicrobianos que inhiben el crecimiento de las bacterias y los hongos fitopatógenos, y también de los nematodos. Estos compuestos incluyen policétidos, quitinasas y presumiblemente otros compuestos con actividad antimicrobiana aún desconocida.

Muchas cepas de estreptomicetos (a pesar de poseer genes de biosíntesis antimicrobianos como los aminoglucósidos o los policétidos), no tienen una actividad antagónica significativa contra los hongos y las bacterias fitopatógenas. Por el contrario, en el CUADRO 1 se puede observar que la cepa *S. melanosporofaciens* AGL225 de la invención exhibe un amplio espectro de antagonismo prominente contra diferentes bacterias fitopatógenas y contra diferentes hongos fitopatógenos, y esto se mantiene sorprendentemente en cuatro tipos de medios de cultivo. Esto muestra la eficacia de la cepa de la invención en la inhibición de las infecciones causadas por bacterias como *E. amylovora* en el peral, *P. syringae pv. tomate* en el tomate y *X. arboricola pv. pruni* en *Prunus* (GF677), y de otros patógenos vegetales (FIG. 6). Además, sorprendentemente, la cepa AGL225, además de presentar genes de biosíntesis poliquística (FIG. 3), produce quitinasas, que son activas tanto contra los hongos como contra los nematodos. La actividad nematocida se demuestra en un ensayo de mortalidad de nematodos de *C. elegans* con sobrenadantes libres de células de cultivos como se describe en el ejemplo 6 (FIG.5, TABLA 4).

Este perfil antimicrobiano (antibacteriano y antimicótico simultáneamente), es sorprendente cuando se compara con otras cepas de *Streptomyces* (véase la TABLA 1 donde se enumeran otras cepas de *Streptomyces* aisladas). Además, la potente actividad antimicrobiana se complementa con su actividad nematocida y de defensa de las plantas, algo peculiar de la cepa de la invención.

La presencia de los genes relacionados con la síntesis de los policétidos antimicrobianos puede determinarse como se describe en el ejemplo 5. La actividad antagónica contra los hongos y bacterias fitopatógenas puede determinarse como se describe en los Ejemplos 2 y 3. La capacidad de controlar las enfermedades fúngicas y bacterianas en las plantas puede determinarse como se describe en el Ejemplo 7.

Otra propiedad sorprendente de la cepa es que desarrolla una reacción de hipersensibilidad en las plantas de tabaco (reacción HR) e induce la expresión de genes relacionados con los mecanismos de defensa en las plantas de tomate (Ejemplo 4, TABLA 3). Se sabe que ciertos microorganismos asociados a las plantas, cuando se aplican como tratamientos en la rizosfera o en la parte aérea, pueden inducir en ellas una respuesta defensiva contra los patógenos, es la llamada Resistencia Sistémica Inducida (RSI). La RSI puede determinarse por la reacción HR en las plantas de tabaco, como se describe en el ejemplo 4. En otros casos, los componentes de estos microorganismos o los metabolitos producidos durante su crecimiento (metabolitos de la fermentación) pueden inducir un tipo de respuesta denominada Resistencia Sistémica Adquirida (RSA). La RSA puede determinarse induciendo genes de defensa como los genes de Harp u otros en las plantas de tomate, como se describe en el ejemplo 4. Estos mecanismos de defensa inducidos en la planta confieren resistencia a la infección por diversos patógenos, e incluso a situaciones de estrés como la sequía. Hay ejemplos de bacterias asociadas a la planta como *Pseudomonas*, *Bacillus*, etc. que inducen estas defensas en varias especies de plantas, pero esta propiedad no ha sido demostrada anteriormente en las cepas de *Streptomyces*.

La cepa AGL225 también tiene la ventaja de que no produce antibióticos aminoglucósidos. Las cepas de *Streptomyces* son productores bien conocidos de antibióticos aminoglucósidos, lo que limita su uso en la lucha integrada contra las plagas y, en particular, en la lucha biológica contra las plagas, por motivos de seguridad. El AGL225 no produce aminoglucósidos, ya que carece de los genes para expresar estas sustancias. Esto se muestra en la FIG. 3. En cambio, AGL225 sí contiene los genes de la vía biosintética para la síntesis de policétidos de tipo II (act04) (Ejemplo 5), lo que supone la capacidad de producir policétidos antimicrobianos adecuados para la lucha biológica contra las plagas.

La cepa AGL225 de *S. melanosporofaciens* tiene varias ventajas que la hacen especialmente adecuada para su utilización en la lucha integrada contra las plagas. En la presente invención,

el término "lucha integrada contra las plagas" tiene el significado habitual en el campo de la agronomía, donde se entiende como una estrategia que utiliza una variedad de métodos complementarios: aspectos físicos, mecánicos, químicos, biológicos, genéticos, jurídicos y culturales de la lucha contra las plagas. Es un método ecológico que tiene por objeto reducir o
5 eliminar el uso de plaguicidas de síntesis química y reducir al mínimo el impacto en el medio ambiente. También se habla de control de plagas ecológico o biológico. Así pues, en la presente invención los términos "control de plagas" y "control biológico de plagas" se utilizan indistintamente y se refieren al control integrado de plagas.

10 Como se muestra efectivamente en los ejemplos que figuran a continuación, la cepa de la invención es muy eficaz para prevenir las infecciones causadas por diferentes patógenos bacterianos y fúngicos en plantas hortícolas y árboles frutales. A partir de los datos que se muestran a continuación, también puede concluirse que esta eficacia se debe principalmente a su elevada actividad antagónica contra estos patógenos en los órganos aéreos de las
15 plantas (hojas, frutos y/o flores), así como en las raíces. Esta asombrosa capacidad es muy importante para el control biológico de plagas.

Así, otro aspecto de la invención se relaciona con el uso de la cepa *S. melanosporofaciens* AGL225 como plaguicida en las plantas.

20

En la presente invención el término "plaguicida" se entiende con su significado habitual en el campo de la agronomía como un producto destinado a matar, repeler, regular o interrumpir el crecimiento de los seres vivos considerados como plagas. Evidentemente, debido a la naturaleza de la cepa *S. melanosporofaciens* AGL225, en la presente invención se entiende
25 que "plaguicida" es un plaguicida biológico o ecológico, también llamado bioplaguicidas.

En otro aspecto, la invención prevé el uso de la cepa *S. melanosporofaciens* AGL225 para controlar una enfermedad causada por una bacteria, un hongo o un nematodo en una planta. Por "control de enfermedades" se entiende la prevención, la curación o la mejora de las
30 enfermedades de las plantas causadas por bacterias, hongos o nematodos. La cepa logra este efecto porque previene, disminuye o erradica la plaga que causa la enfermedad y/o porque mejora las defensas naturales de las plantas. En una realización particular, el uso de la cepa *S. melanosporofaciens* AGL225 es para el control de plagas de plantas causadas por bacterias, hongos o nematodos. Esta realización también puede expresarse como el uso de la
35 cepa como plaguicida con actividad bactericida, fungicida y nematocida. La invención también

proporciona un método para el control biológico de las plagas de las plantas que consiste en administrar a la planta la cepa de *S. melanosporofaciens* AGL225.

En una de las realizaciones, la planta a tratar es una planta hortícola o frutal.

5

Habida cuenta de su utilización como plaguicida en las plantas, es importante poder obtener cantidades suficientes de células viables de la cepa y también de metabolitos de fermentación. Como se muestra en el ejemplo 2, la composición muestra una viabilidad muy alta que se mantiene durante el almacenamiento, incluso después de la concentración y la liofilización.

10

En un aspecto más amplio, la presente invención se relaciona así con un método de obtención de células viables de la cepa *S. melanosporofaciens* AGL225, tal como se define en la reivindicación 1 que comprende los pasos de:

15

- i) La inoculación de la cepa AGL225 en un medio de cultivo adecuado,
- ii) Someter el medio de cultivo inoculado de la fase i) a condiciones adecuadas para el crecimiento de la cepa a fin de obtener una suspensión celular,
- iii) Someter la suspensión celular del paso ii) a una separación para obtener células viables de *S. melanosporofaciens* AGL225 y un sobrenadante que contenga metabolitos,
- iv) Recoger las células de *S. melanosporofaciens* AGL225, y
- v) Opcionalmente, someter las células obtenidas a un proceso de deshidratación.

20

25 La cepa de la invención puede ser inoculada en el medio líquido en una concentración final entre el 1 y el 5%. Preferentemente, el cultivo a inocular se encuentra en una fase de crecimiento exponencial. Preferentemente, la multiplicación celular se permite continuar hasta alcanzar la fase exponencial final o el comienzo de la fase estacionaria, alcanzando una concentración celular entre 7×10^8 and 2×10^9 UFC / ml. Es bien sabido que las cepas de *Streptomyces* producen esporas. Esta capacidad es conveniente para formular biopesticidas comerciales. Las esporas son altamente resistentes a las condiciones de estrés, lo que resulta en la facilidad de procesamiento industrial, larga vida útil y alta tasa de supervivencia cuando se aplican a las plantas de los productos que contienen *Streptomyces*. En algunas realizaciones de la invención, el cultivo de AGL225 se cultiva hasta la fase estacionaria o se

30

35 somete a condiciones de estrés para obtener esporas. El cultivo puede ser luego sometido a

otros procesos como se describe a continuación o filtrado a través del filtro Miracloth (Millipore) para separar las esporas. A continuación puede añadirse una solución apropiada, como Tween 20, para mantener una suspensión homogénea de esporas. La presente invención también proporciona en otro aspecto esporas de AGL225. Estas esporas pueden
5 obtenerse como se ha explicado anteriormente.

Es bien sabido que las esporas forman parte del ciclo de vida de algunas plantas y microorganismos, por lo que también pueden denominarse células de esporas. Así pues, en las siguientes realizaciones, el término "células" puede incluir las células de esporas cuando
10 las condiciones han sido apropiadas para su formación.

Los medios de cultivo adecuados para el crecimiento de la cepa de la invención son los medios de cultivo sintéticos, como el ISP2, el AIA, el Benedict y el SNM. Las condiciones adecuadas para el crecimiento de la cepa son temperaturas entre 25 y 30 °C, pH entre 6 y 8, y concentración de oxígeno entre 10 y 50%. El crecimiento de la cepa de la invención se
15 produce en medio sólido o bajo agitación en medio líquido. Preferentemente, se utiliza un medio líquido. Un ejemplo del procedimiento detallado para obtener células de la cepa de la invención en medio líquido está establecido en el Ejemplo 2. Para la producción en medio sólido, la cepa AGL225 puede ser sembrada en placas de Petri con agar ISP2 e incubada a 28 °C durante 1-2 semanas. Después de someter las placas inoculadas a condiciones
20 adecuadas para el crecimiento de la cepa, por ejemplo, con las condiciones descritas anteriormente, se preparan suspensiones de 40-60 ml con agua destilada estéril desde 3-4 placas de cultivo.

Las técnicas de separación adecuadas incluyen la centrifugación o el filtrado del cultivo. Realizando la centrifugación del cultivo, por ejemplo, a un mínimo de 8000 rpm, se pueden
25 separar las células del medio de cultivo (sobrenadante). A continuación, las células pueden utilizarse directamente, resuspendidas a una densidad deseada, sometidas a deshidratación o alteradas para obtener un extracto libre de células.

Las células obtenidas con el método anterior pueden resuspenderse a una densidad deseada, por ejemplo 10^{10} UFC/ml, en soluciones adecuadas como una solución tampón. De esta manera se obtiene una suspensión celular. Para obtener una suspensión celular, una solución adecuada también puede ser el medio de cultivo en el que han crecido las células, es decir, el
30 sobrenadante que contiene metabolitos resultante de la separación del paso iii) anterior. Esto puede ser ventajoso porque el sobrenadante contiene metabolitos activos que de otro modo
35

se pierden parcialmente por la separación. Otra solución adecuada para resuspender las células puede ser el uso de un medio de cultivo fresco. La suspensión celular también puede obtenerse directamente por un método que comprende los pasos i) y ii) del método definido más arriba, es decir, no sometiendo la suspensión celular obtenida del paso ii) a la separación. De este modo, la suspensión contiene los metabolitos activos secretados por las células bacterianas. La suspensión obtenida directamente puede ser concentrada por cualquier medio adecuado que conozca el experto.

En otro aspecto de la invención se proporciona una suspensión celular de células AGL225 obtenibles como se ha descrito anteriormente y el uso de esta suspensión celular como plaguicida en plantas, en particular para el control de plagas de plantas causadas por hongos, bacterias o nematodos. En una realización particular de la invención, la suspensión celular contiene células viables AGL225, medios de cultivo y metabolitos activos que han sido producidos por la cepa mediante la fermentación de los medios de cultivo. Esta suspensión celular es particularmente ventajosa para formular un biopesticida adecuado. En otra realización, la suspensión celular contiene células viables AGL225, preferiblemente en una concentración alta, por ejemplo, por encima de 10^9 , resuspendidas en un medio de cultivo fresco. Esta última suspensión celular en alta concentración también puede denominarse "inóculo" y utilizarse para obtener nuevas células viables de la cepa cuando se inocula en un medio de cultivo adecuado.

Como ya se ha mencionado, el sobrenadante obtenido por separación de las células del medio de cultivo contiene metabolitos activos con actividades antagónicas. Por lo tanto, otro aspecto de la invención proporciona un método para obtener un sobrenadante que contiene el metabolito AGL225, que comprende los pasos (i)-(iii) del método para obtener células viables de los *S. melanosporofaciens* AGL225, como se ha definido anteriormente, y un paso más para recoger el sobrenadante. Opcionalmente, el sobrenadante resultante puede concentrarse por cualquier medio adecuado, como la evaporación o la ultrafiltración. Otro aspecto se refiere a un método para obtener un sobrenadante que contenga el metabolito AGL225 que consiste en los pasos (i)-(iii) del método para obtener células viables de los *S. melanosporofaciens* AGL225 como se define arriba, recogiendo el sobrenadante resultante del paso (iii) y opcionalmente concentrando dicho sobrenadante. Otro aspecto proporciona un sobrenadante que contiene el metabolito AGL225 obtenible por estos métodos, así como el uso de este sobrenadante que contiene el metabolito AGL225 como plaguicida en las plantas,

en particular para el control de plagas de plantas causadas por hongos, bacterias o nematodos.

Opcionalmente, las células AGL225 obtenidas por los métodos definidos anteriormente pueden ser sometidas a un proceso de deshidratación. La deshidratación puede llevarse a cabo mediante un proceso de liofilización, pero la lechada (slurry en inglés) también puede secarse mediante secado en lecho fluidizado o por atomización. A este respecto, otra característica ventajosa de la cepa de la invención es que presenta una gran resistencia a los procesos de deshidratación que son comunes en la producción de microorganismos a escala industrial, ya que produce esporas. Así pues, la invención también proporciona células deshidratadas de la cepa AGL225 obtenibles como se define en el presente documento. Las células deshidratadas pueden, por supuesto, utilizarse también como plaguicidas en las plantas, en particular para controlar las plagas de las plantas causadas por hongos, bacterias o nematodos.

Las células de *S. melanosporofaciens* AGL225 pueden seguir siendo procesadas para obtener un extracto sin células. Así pues, otro aspecto de la invención proporciona un método para obtener un extracto sin células de *S. melanosporofaciens* AGL225 que comprende someter a las células de *S. melanosporofaciens* AGL225 a:

- i) ruptura de las células de *S. melanosporofaciens* AGL225,
- ii) separación del extracto libre de células de los restos celulares,
- iii) recolección del extracto libre de células, y
- iii) opcionalmente, someter el extracto sin células a un proceso de concentración.

La persona capacitada conoce los medios de ruptura adecuados y puede incluir la ruptura física, por ejemplo, la congelación-descongelación o la prensa francesa, o la ruptura química, por ejemplo, mediante la adición de lisozima. Los medios de separación adecuados se han descrito anteriormente. Ejemplos no limitantes de procesos adecuados para la concentración son la deshidratación (liofilización-secado por pulverización), la filtración, la ultrafiltración, la precipitación, la centrifugación y la cromatografía. El extracto libre de células también puede obtenerse a partir de una suspensión celular como la definida anteriormente, que contenga preferentemente un sobrenadante que contenga metabolitos.

Otro aspecto proporciona un extracto libre de células de *S. melanosporofaciens* AGL225 obtenible por el proceso definido anteriormente, así como el uso de este extracto libre de células como plaguicida en las plantas, en particular para el control de plagas de plantas causadas por hongos, bacterias o nematodos.

5

La invención también se refiere a un método para el control biológico de plagas de plantas que comprende la administración a la planta de las células de *S. melanosporofaciens* AGL225, células AGL225 deshidratadas, una suspensión celular de AGL225, un sobrenadante que contiene metabolitos AGL225 o un extracto libre de células AGL225, todo ello según se ha definido anteriormente.

10

En vista de su uso en la lucha contra las plagas, los agentes plaguicidas suelen formularse en composiciones que también incluyen aditivos adecuados para el uso agrícola para el que están diseñados. Las composiciones de la invención pueden ser sólidas (incluyendo, por ejemplo, concentrado de bacterias deshidratadas) o líquidas (incluyendo suspensiones concentradas de bacterias). Así pues, otro aspecto de la invención proporciona una composición que comprende la cepa *S. melanosporofaciens* AGL225, y uno o más compuestos aceptables para la agricultura. Los "compuestos agrícolamente aceptables" se refieren a aquellos compuestos y/o materiales que son adecuados y generalmente aceptados para su uso en la agricultura. En general, esos compuestos no deben ser tóxicos para los seres humanos y deben ser preferentemente inocuos para el medio ambiente.

15

20

La invención también proporciona composiciones que comprenden células deshidratadas, una suspensión celular, un sobrenadante que contiene metabolitos, un extracto libre de células como se ha definido anteriormente, o combinaciones de los mismos, junto con uno o más compuestos agrícolamente aceptables. En adelante, la "composición de la invención" se refiere a cualquiera de las composiciones mencionadas anteriormente, todas las cuales comprenden la cepa AGL225 o un producto derivado de la cepa AGL225.

25

En una determinada realización, la composición de la invención puede contener compuestos para mejorar la adherencia de las cepas en las plantas a tratar, compuestos fitofortificantes, nutrientes, humectantes, estabilizadores, osmoprotectores, antioxidantes, protectores solares, compuestos amortiguadores o combinaciones de los mismos. Algunos compuestos potenciadores de la adherencia son las gelatinas, los almidones, las pectinas, los alginatos y diversos tipos de gomas como los xantanos. Muchos de estos compuestos son también

30

35

humectantes. Los protectores solares incluyen tintes como el rojo Congo. Los fitofortificantes son compuestos que pueden favorecer en los cultivos el vigor o la tolerancia a los patógenos o a las condiciones ambientales adversas. Ejemplos no limitantes de fitofortificantes son los análogos del ácido jasmónico y ciertos estimulantes defensivos en plantas como las harpinas, los quitosanos y las laminarinas. En particular, las composiciones de la invención contienen al menos un osmoprotector. Ejemplos no limitantes de compuestos osmoprotectores son las betaínas, los aminoácidos y la trehalosa. La mejora de la eficacia de los agentes de control biológico contra la infección por varios fitopatógenos mediante la adaptación fisiológica (osmoprotectores) y la mejora nutricional, se ha demostrado en varios plaguicidas microbianos. Por ejemplo, se ha demostrado la supervivencia bajo estrés hídrico y la eficacia del control de enfermedades en los aglomerados de *Pantoea* EPS125 contra la podredumbre postcosecha de la fruta causada por *Penicillium expansum*, mediante la modificación de la formulación con osmolitos (por ejemplo, la trehalosa) (Bonaterra y otros, 2005). Además, se ha mejorado la idoneidad y eficacia del control de la enfermedad del fuego bacteriano de los manzanos y perales en *Pseudomonas fluorescens* EPS62a mediante la mejora nutricional (por ejemplo, añadiendo glicina, Tween80) y osmolitos (por ejemplo, glicina-betaína) (Cabrefiga et al. 2011, Cabrefiga et al. 2014). Curiosamente, el efecto de la combinación de las bacterias de control biológico con el osmolito y/o con el nutriente específico, proporcionó un efecto sinérgico con una mejor eficacia de control, pero también más consistente entre los ensayos.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición que comprende la cepa AGL225 y al menos un plaguicida adicional, dicho plaguicida adicional no afecta negativamente a la actividad de la cepa AGL225. En una de las incorporaciones, el plaguicida adicional es un bactericida, un fungicida, un nematocida o un insecticida. En otra realización, el plaguicida adicional es un bioplaguicida. En otra realización el biopesticida es otra cepa bacteriana con actividad fungicida, bactericida y/o nematocida. Preferiblemente, el plaguicida adicional es *Streptomyces yataensis* AGL148.

Un aspecto adicional de la invención prevé el uso de cualquiera de las composiciones definidas anteriormente como plaguicida en plantas, en particular para el control de plagas de plantas causadas por hongos, bacterias o nematodos, así como un método para el control biológico de plagas de plantas que comprende la administración a la planta de cualquiera de las composiciones definidas anteriormente.

Al igual que con la cepa *S. melanosporafaciens* AGL225, los inventores han descubierto que la cepa *S. yatensis* AGL148 presenta la gran ventaja de ejercer simultáneamente una actividad antifúngica, antibacteriana y nematocida. La cepa *S. yatensis* AGL148 fue aislada del suelo en un campo de nogales en Girona (España), y fue depositada por el solicitante, de acuerdo con el Tratado de Budapest, el 18 de julio de 2017 en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), situada en la Universidad de Valencia, Parc Científic Universitat de València, Catedrático Agustín Escardino, 9, 46980 Paterna (Valencia). La cepa de *S. yatensis* fue depositada con la referencia de identificación AGL148 y recibió el número de adhesión CECT9421.

Esta cepa también induce mecanismos naturales de defensa en las plantas. La *S. yatensis* AGL148 difiere de la AGL225 en el patrón antagónico específico, pero ofrece la misma ventaja de reunir una amplia gama de control de enfermedades para un solo ingrediente activo en un producto fitosanitario. La *S. yatensis* AGL148 también es segura para su uso en el control biológico de plagas y tiene propiedades, como la capacidad de formación de esporas, que la hacen especialmente adecuada para la producción y el uso de bioplaguicidas industriales.

Así pues, la divulgación también se refiere a una cepa de *S. yatensis* AGL148 identificada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) como *Streptomyces yatensis* CECT9421. Como se ilustra en los ejemplos que figuran a continuación, la cepa AGL148 se caracteriza por tener las siguientes propiedades

i) Actividad antagónica contra las bacterias *E. amylovora*, *P. syringae* pv *tomate*, *P. syringae* pv *actinidiae*, *arboricola* pv *pruni* X., y los hongos *B. cinerea*, *F. oxysporum* y *S. vesicarium* (TABLA 1) ;

ii) Actividad antagónica in vitro en una amplia variedad de medios de cultivo como ISP2, AIA, Benedict y SNM (CUADRO 1).

iii) Actividad quitinolítica y nematocida contra el nematodo *C. elegans* (FIG. 5, TABLA 4).

iv) Posee los genes para la producción de policétidos antimicrobianos de tipo II (act04 / ACT8), pero no tiene los genes de los antibióticos aminoglucósidos (FIG. 3).

v) El medio de cultivo en el que se ha cultivado la cepa, una vez libre de células (sobrenadante de la suspensión de células cultivadas), tiene un perfil HPLC distintivo de metabolitos activos que son producidos por la cepa mediante fermentación. Este perfil de metabolitos es característico de la cepa AGL225 y la distingue de otras cepas de *Streptomyces* (FIG.4). Estos metabolitos también tienen actividad bactericida, fungicida y nematocida.

vi) Induce las defensas naturales de la planta al ejercer una reacción de hipersensibilidad al infiltrarse en las células de las hojas de tabaco (reacción HR) y también al inducir los genes de defensa Harp en las plantas de tomate (TABLA 3).

vii) Tiene la capacidad de inhibir las infecciones causadas por las bacterias fitopatógenas *E. amylovora* en la pera, *P. syringae* pv. *Tomato* en las plantas de tomate; *X. arboricola* pv y. *pruni* en *Prunus*; y los hongos fitopatógenos *S. sclerotiorum* en la lechuga, *F. oxysporum* f. *Sp. radialis lycopersici* en el tomate y *B. cinerea* en el tomate (FIG.6).

Todos los aspectos y realizaciones descritos anteriormente para la cepa AGL225 de *S. melanosporofaciens* también se aplican a la cepa AGL148 de *Streptomyces yatensis*. Por lo tanto, la invención también proporciona métodos para obtener células de *Streptomyces yatensis* AGL148 (que incluyen o consisten en células en forma de esporas cuando las condiciones han sido apropiadas para la formación de esporas como se ha explicado anteriormente), células AGL148 deshidratadas, una suspensión celular de AGL148, un sobrenadante que contiene metabolitos AGL148 y un extracto libre de células AGL148 que comprende las mismas características que se han definido anteriormente. La invención también proporciona células AGL148 de *Streptomyces yatensis*, células AGL148 deshidratadas, una suspensión celular de AGL148, un sobrenadante que contiene metabolitos AGL148 y un extracto libre de células AGL148 obtenible por dichos métodos. Las composiciones que comprenden células de *Streptomyces yatensis* AGL148, células AGL148 deshidratadas, una suspensión celular de AGL148, un sobrenadante que contiene metabolitos AGL148, un extracto sin células AGL148 o mezclas de los mismos, también se proporcionan en términos análogos a los definidos anteriormente. El uso de la cepa AGL148, sus derivados (células deshidratadas, suspensión celular, sobrenadante que contiene metabolitos o extracto libre de células) o las composiciones que los contienen se proporciona como plaguicida en las plantas, en particular para el control de plagas de plantas causadas por hongos, bacterias o nematodos. Por último, se proporciona un método para el control biológico de las plagas de

las plantas que consiste en administrar a la planta la cepa AGL148, sus derivados (células deshidratadas, suspensión celular, sobrenadante que contiene metabolitos o extracto libre de células) o composiciones que los contengan. Las realizaciones particulares de cada uno de estos aspectos que se han descrito anteriormente para *S. melanosporofaciens* AGL225 también se aplican a los aspectos relacionados con la cepa *Streptomyces yatensis* AGL148. Además, como se ha indicado anteriormente, el término "células" puede incluir o consistir en células de esporas cuando las condiciones han sido apropiadas para su formación.

La invención también se refiere a los mutantes de la cepa *S. melanosporofaciens* AGL225 y *Streptomyces yatensis* AGL148. El término "mutantes" se refiere a las cepas obtenidas utilizando como cepa de partida la *S. melanosporofaciens* AGL225 o *Streptomyces yatensis* AGL148 de la invención, y caracterizadas por mantener las propiedades descritas anteriormente. Un "mutante" de la cepa también se entiende según la invención como una "variante". Un experto en la materia comprenderá que utilizando las cepas de la invención como material de partida es posible obtener rutinariamente, por ejemplo mediante mutación espontánea o mutagénesis dirigida, mutantes que conservan las características y ventajas pertinentes aquí descritas. Los métodos para obtener mutantes de una determinada cepa bacteriana son conocidos en la técnica. Pueden encontrarse ejemplos en (Sambrook, J. y Russell, DW "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", capítulo 13, "Mutagénesis", Cold Spring Harbor, 3ª ed., 2001).

En toda la descripción y las reivindicaciones, la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Además, la palabra "comprende" incluye el caso "consiste en". Otros objetos, ventajas y características de la invención serán evidentes para los expertos en la materia en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a título ilustrativo y no se pretende que limiten la presente invención. Además, la invención presente cubre todas las combinaciones posibles de realizaciones particulares y preferidas aquí expuestas.

Breve descripción de los dibujos

FIG. 1. Árbol filogenético obtenido mediante la secuencia parcial de los genes *rpoB* y *16S rRNA* para las cepas de *Streptomyces*. Las cepas AGL225 y AGL148 aparecen en la parte

superior del dendrograma como *S. yatensis*/*S. melanosporofaciens*. El dendrograma se construyó usando el método de unión vecinos de Dice.

FIG.2. Dendrograma obtenido con los patrones RAPD para aislados de *Streptomyces*. La matriz de distancia fue calculada usando el coeficiente de Dice y la agrupación UPGMA. Los datos se combinan para cada cepa utilizando los patrones RAPD obtenidos con los cebadores LTI, d8635 y 1.80.7. Las cepas mostradas incluyen 25 aislados de *Streptomyces* obtenidos en este estudio y nueve cepas de colecciones de referencia (*S. saraceticus* , *S. hygroscopicus* , *S. griseoviridis* , *S. violascens* , *S. lipmanii* , *S. antibioticus* , *S. fradiae* , *S. rochei* y *S. violasceus*). Se indican las cepas AGL225 y AGL148.

FIG. 3. Presencia de los genes de la vía biosintética de diferentes tipos de metabolitos (aminoglicósidos, policétidos y betalactámicos) en las cepas de *Streptomyces* sp. La detección se realizó mediante amplificación por PCR. Las cepas fuera de los círculos son cepas en las que no se encontró ningún producto de amplificación con ninguno de los cebadores de los tres genes de la ruta.

FIG. 4. Perfiles cromatográficos (HPLC) de las cepas de *Streptomyces* en una columna C18 Kinetex 250 (panel izquierdo) o en una columna C18-XB (panel derecho). Panel izquierdo: Medio de cultivo fresco ISP2 (A), extracto de la cepa *S. yatensis* AGL148 (B) y extracto de la cepa *S. melanosporofaciens* AGL225 (C). Panel derecho: en el medio de cultivo fresco ISP2 (A), extracto de la cepa *S. yatensis* AGL148 (B) y extracto de la cepa *S. melanosporofaciens* AGL225 (C) comparado con la cepa *Streptomyces* sp. AGL260 (D). El eje Y muestra la absorbancia de cada una de las fracciones recogidas (mAU = mili - unidades de absorbancia), y el eje x es el tiempo de elución (en min).

FIG. 5. Actividad nematocida en *Caenorhabditis elegans*, tras el tratamiento con sobrenadantes de cultivos de cepas de *Streptomyces* en medio de ISP2. Control del tampón M9 con *E. coli* OP50 (A), azida sódica (B, control de la mortalidad), sobrenadantes de AGL148 (C) y AGL225 (D). Obsérvese que los nematodos rectos corresponden a los muertos, y los curvos a los vivos.

FIG. 6. Efecto del tratamiento con las cepas *Streptomyces* AGL225 y AGL148 en el control de las infecciones causadas por *X. arboricola* pv. *pruni* en el híbrido *Prunus* melocotón x almendra GF677 (Xap), *E. amylovora* en pera (Ea), *P. syringae* pv. *tomate* en tomate (Pst), ,

F. oxysporum f.sp. lycopersici en tomate (Fox), *Botrytis cinerea* en tomate (Bc), y *S. sclerotiorum* en lechuga (Ss). Los resultados se comparan con un control sin tratamiento (NTC). El eje Y representa la gravedad de la enfermedad. El eje X representa el código de la cepa. Se utilizaron las cepas QST713 (*Bacillus subtilis*) y Ss31 (*Streptomyces saraceticus*) como biocontrol de referencia. Los valores son medias de tres réplicas y las barras de error representan el 95% del intervalo de confianza de la media. Nd: no determinado.

Ejemplos

10 **Ejemplo 1. Aislamiento y caracterización de las cepas *S. melanosporofaciens* AGL225 y *S. yatensis* AGL148**

a) Preparación de muestras de campo para el aislamiento de cepas de *Streptomyces*

15 La toma de muestras para la obtención de aislamientos de *Streptomyces* se realizó durante los meses de julio a septiembre de 2014. En total se tomaron 54 muestras en tierras de cultivo, zonas forestales y zonas con condiciones extremas (dunas costeras). Las muestras se procesaron mediante la extracción de materiales vegetales o del suelo en una solución de agua tamponada con fosfato, utilizando un homogeneizador. Las suspensiones obtenidas se
20 diluyeron y se colocaron en placas de Petri que contenían agar de Benedicto, y se incubaron a 30 °C durante 3 días. Se utilizaron colonias con morfología típica de *Streptomyces* para obtener más cultivos puros. Se obtuvieron un total de 397 aislamientos de supuestos *Streptomyces* de las 54 muestras. Para preservar los aislamientos, se obtuvieron células y suspensiones de esporas de cultivos puros de unos 5 días en medio sólido raspando las
25 colonias y resuspendiendo en tampón fosfato. Luego, el mismo volumen de suspensión se mezcló con 40% de glicerol. El volumen se dividió en dos criotubos y después de 24h a -20°C, se almacenaron en un congelador a -70°C.

b) Identificación de los aislamientos a nivel del género *Streptomyces*

30

Para confirmar que los aislados pertenecen al género *Streptomyces*, se utilizó un método basado en la PCR con cebadores (Strep/StrepF y StrepB/StrepE) específicos del género (Rintala et al. 2001). Cada cultivo en suspensión se sometió a la extracción de ADN mediante un choque térmico a 100 °C durante 15 min. La primera PCR se realizó con los primers
35 StrepB / StrepF (Adelante 5'-3' 'ACAAGCCCTGGAAACGGGT; SEQ ID NO: 1, reverso 5'-3'

ACGTGTGCAGCCCAAGACA; SEQ ID NO: 2), y con aquellas cepas que dieron una amplificación negativa, se realizó una nueva serie de PCR con los primers StrepB / StrepE (adelante 5' -3' ACAAGCCCTGGAAACGGGT; SEQ ID NO: 1, Reverso 5'-3' CACCAGGAATTCCGATCT; SEQ ID NO: 3). Los aislados se consideraban pertenecientes al género *Streptomyces* si el ADN se amplificaba con alguno de los primers. De los 397 aislados, se confirmó finalmente que 311 pertenecían al género *Streptomyces*. Paralelamente, también se examinó la morfología de la colonia en diversos medios de cultivo descritos para *Streptomyces* (ISP2, YEMES y avena) y en el agar de dextrosa de patata (PDA) que es adecuado para los hongos (Shirling y Gottlieb, 1996, Scheper et al. 2010).

c) Actividad antagónica y quitinolítica in vitro

Los aislamientos obtenidos en cultivo puro, pertenecientes a *Streptomyces*, se estudiaron primero por su capacidad de inhibir el crecimiento de hongos y bacterias.

Los ensayos de antagonismo se realizaron utilizando discos de cultivos de *Streptomyces* cultivados durante 5-7 días en medio de ISP2. Estos discos se colocaron en placas de agar Petri ISP2 (u otro medio de crecimiento adecuado para el cultivo de *Streptomyces*), que habían sido previamente sembradas con el patógeno en un crecimiento confluyente. Se estudió la actividad antagónica contra varios patógenos de plantas. Los patógenos se seleccionaron dentro de las bacterias patógenas de las plantas: *Erwinia amylovora* 6076, una cepa avirulenta mutante CFBP1430 (Colección Bacteriana Francesa de Bacterias Patógenas de las Plantas, Angers, Francia) que causa el fuego bacteriano en *Rosaceae*, *Pseudomonas syringae* pv. *tomate* DC3000, que causa la mancha bacteriana en el tomate, *P. syringae* pv. *actinidiae* NCPPB3793 (Colección Nacional de Bacterias Patógenas de las Plantas, Reino Unido) que causa el cancro bacteriano en el kiwi, *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* CFBP 5563 que causa la mancha bacteriana en los árboles frutales de hueso; y *Ralstonia solanaceum* CECT 125 (Colección Española de Cultivos Tipo, Valencia, España) que causa la podredumbre parda o marchitez bacteriana. Como hongos fitopatógenos, los indicadores seleccionados fueron: *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* ATCC 201829 (Colección Americana de Cultivos Tipo, EE.UU.) que causan marchitez vascular en el tomate; *Botrytis cinerea* 33759B que causa podredumbre gris en muchas plantas, y *Stemphylium vesicarium* EPS 26 (INTEA, Instituto Tecnológico Agroalimentario, Girona) que causan mancha marrón en peras y cebollas.

Una vez que las placas de Petri se incubaron a 30 °C durante varios días, se determinó el diámetro de la zona de inhibición del crecimiento alrededor de la cepa *Streptomyces* y en el microorganismo objetivo. Se utilizó un índice de actividad teniendo en cuenta el diámetro de la zona de inhibición. En el caso de las bacterias se utilizó el siguiente índice: 0, sin inhibición; 1, 0 cm < IZ ≤ 1 cm; 2, 1 cm < IZ ≤ 2 cm; 3, 2 cm < IZ ≤ 3 cm. Para los hongos se utilizó la siguiente escala: 0, sin inhibición; 1, 0 cm < IZ ≤ 0,6 cm; 2, 0,6 cm < IZ ≤ 1,2 cm; 3, 1,2 cm < IZ ≤ 2 cm.

La actividad quitinolítica de las cepas bacterianas se evaluó utilizando un medio de quitina. Se preparó un medio de cultivo mínimo consistente en sales minerales complementadas con quitina como único nutriente (Rodríguez-Kabana y otros, 1983; Frändberg y Schnürer, 1998). El medio de cultivo contenía 1,5 g/l de quitina coloidal, 2,7 g de K₂HPO₄; 0,3 g de KH₂PO₄, 0,7 g de MgSO₄ · 7H₂O, 0,5 g de NaCl, 0,13 g de extracto de levadura y 20 g de agar en 1 l de agua destilada. Los aislamientos de *Streptomyces* se recogieron por triplicado en la superficie de agar quitina, y las placas se incubaron durante 7 días a 28 °C. Las colonias capaces de secretar quitinasa mostraron un halo transparente a su alrededor. Como control positivo de las quitinasas se utilizó la cepa de referencia *Pseudomonas fluorescens* BL915. De los 281 aislamientos probados, la mayoría (247) mostraron actividad de quitinasa. Significativamente, *S. melanosporofaciens* AGL225 y *S. yateensis* AGL148 eran productores activos de quitinasa, lo que confiere a estas cepas una potencial actividad nematocida e incluso insecticida.

De los 311 aislamientos de *Streptomyces* obtenidos, 66 poseían actividad antimicrobiana y quitinolítica a diferentes niveles, y fueron seleccionados para un estudio más detallado de la actividad antimicrobiana. El primer examen de las 66 cepas seleccionadas mostró diferentes espectros e intensidades de acción contra los ocho microorganismos fitopatógenos.

En cuanto al tipo de medio de cultivo, se observó una mayor actividad antimicrobiana en el medio ISP2 contra los hongos y las bacterias, en comparación con los otros medios (AIA, Benedict, SNM). En un grupo, las cepas mostraron actividad antibacteriana (por ejemplo, AGL7, AGL113, AGL15), mientras que en el otro grupo mostraron predominantemente actividad antimicótica (por ejemplo, AGL148, AGL164, AGL227, AGL219). Sorprendentemente, la cepa AGL225 presentó actividad antibacteriana simultáneamente con una potente actividad antimicótica. Un ejemplo de cepas seleccionadas se muestra en la TABLA 1.

Tabla 1. Actividad antimicrobiana y quitinolítica de los aislamientos de *Streptomyces* sp. contra las bacterias fitopatógenas (*X. arboricola* pv. *pruni*, *E. amylovora*, *P. syringae* pv. *tomate*, *P. syringae* pv. *actinidiae*, *Ralstonia solanacearum*); y los hongos fitopatógenos (*S. vesicarium*, *F. oxysporum* y *B. cinerea*). Los resultados que se muestran son el halo medio obtenido con los medios de crecimiento ISP2, AIA, Benedict y SNM. También se indica la actividad de la quitinasa. Los valores corresponden a los índices de actividad (0 a 3 para cada patógeno) que tienen en cuenta el diámetro del halo alrededor de las colonias de bacterias o el halo de quitina.

<i>Streptomyces</i> strain	Bacteria				Hongos				Actividad quitinasa
	<i>Xap</i>	<i>Ea</i>	<i>Pst</i>	<i>Psa</i>	<i>Rs</i>	<i>Sv</i>	<i>Fo</i>	<i>Bc</i>	
AGL225	2	1	2	2	0	3	3	3	1
<i>S. fradiae</i>	2	1	2	2	2	2	3	3	0
<i>S. hygroscopicus</i>	2	1	1	1	1	2	2	2	0
<i>S. violaceus</i>	2	1	1	0	0	3	3	3	0
<i>S. rochei</i>	1	1	1	0	1	3	3	3	0
<i>S. melanosporofaciens</i>	2	1	0	0	1	3	3	3	0
AGL148	2	0	0	0	0	3	3	3	2
<i>S. saraceticus</i> Ss31	1	1	1	0	0	2	3	3	1
AGL368	0	0	1	1	0	1	0	0	0

Xap, *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*; *Ea*, *Erwinia amylovora*; *Pst*, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*; *Psa*, *P. syringae* pv. *actinidiae*; *Rs*, *Ralstonia solanacearum*. *Sv*, *Sthemphylium vesicarium*; *Fo*, *Fusarium oxysporum*; *Bc*, *Botrytis cinerea*.

d) Identificación de las cepas de *Streptomyces* a nivel de especie

De los 311 aislamientos originalmente clasificados como *Streptomyces*, seleccionamos 66 con actividad antimicrobiana significativa. Los aislados se sometieron a una secuenciación parcial de los genes *16S rDNA* y *rpoB* (Ki y otros, "Structure of a protein-DNA complex essential for DNA spores of *Bacillus* protection in species", 2009, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America of the United States of the United States of America, Vol. 105, pp. 2806-2811). La PCR se realizó en el ADN de los cultivos con los cebadores StrepB/StrepF, que amplifican un fragmento de 519 pb de *16S rADN* (Rintala et al. 2001) y con los primers SRPOF1 (5'-TCGACCACTTCGGCAACCGC-3'; SEQ ID NO: 4) y

SRPOR1 (5'-TCGATCGGCACATGCGCC-3'; SEQ ID NO: 5) que produce un amplicón de 352 pb (Kim et al. 2001).

La amplificación de los dos genes se realizó en un volumen final de 25 µl, que contenía una concentración de 1x tampón, 3 mM de cloruro de magnesio, 200 µM de dNTPs, 0,2 µM de cada cebador, 2 U de Taq polimerasa (Biootols, España) y 2 µl de muestra. El programa del termociclador consistió en 1 ciclo de 95°C durante 5 min, 30 ciclos de 95°C durante 45 s, 60°C durante 40 s y 2 min a 72 °C; finalmente a 72°C para la amplificación 10 min y al final un mantenimiento a 4 °C. Se utilizó el termociclador profesional TRIO de Biometra (Biometra).

Una vez completada la amplificación los resultados fueron vistos en un gel de agarosa al 1%, sometidos a un campo eléctrico de 75 V durante 40 min, y teñidos con bromuro de etidio durante 20 min. Las imágenes se capturaron con el Imager Molecular ChemiDoc XRS + (BioRad Laboratories).

Los productos de la PCR se purificaron (Qiagen Kit Ququick purification PCR), la concentración de ADN se ajustó a 50 ng /microlitro, y la secuenciación se realizó con 5 µl de ADN y 5 µl de primers a 5 uM utilizando un secuenciador ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer (PE Applied Biosystems, CA, USA). La secuenciación se realizó en ambas direcciones de la cadena de ADN. Las secuencias editadas se obtuvieron con el programa Chromas 2.4 (programa <http://downloads.informer.com/chromas/2.4/>) y fueron analizadas y alineadas utilizando el programa BioEdit Sequencing Editor (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>), y la homología determinada por el programa BLAST en la base de datos del NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

El análisis de la secuencia del *rDNA* 16S con el programa BLAST (GenBank) no permitió distinguir claramente todos los aislados a nivel de especie. Por esta razón se procedió a una nueva secuenciación del gen de la subunidad beta de la ARN polimerasa (*rpoB*) (Kim y otros, 2004), que puede aplicarse a las cepas de *Streptomyces*, y que también es adecuado para el análisis filogenético (Dahllöf y otros, 2000; Kim y otros, 2004).

De las 66 cepas, se obtuvieron 25 coincidencias con la base de datos del GenBank. En 9 de las 25 cepas hubo acuerdo entre los dos sistemas de identificación (16S *rDNA* y *rpoB*). Entre los aislamientos pertenecientes a *Streptomyces*, se confirmó que las cepas antimicrobianas más activas pertenecían a *S. yatusensis* (AGL148, AGL164 y AGL219) o *S. melanosporofaciens* (AGL171 y AGL225). Las secuencias de las cepas de *S. melanosporofaciens* AGL225 y *S. yatusensis* AGL148, fueron depositadas en el GenBank (cepa AGL225: gen 16S *rDNA*

accession No. MG008625, gen *rpoB* accession No. MG007902 ; cepa AGL148: gen *16S rDNA* accession No. MG008626 , gen *rpoB* accession No . MG007903).

Además, se realizó un árbol filogenético con las secuencias de los genes *16S rDNA* y *rpoB*.

5 En primer lugar, se alineó con el programa CLUSTALW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw/>) para elegir la longitud de fragmento apropiada para el análisis. El dendrograma se realizó con el método de unión de vecinos con una réplica de 1000 bootstraps usando el MEGA6 (Tamura K, et al. 2013).

10 El análisis filogenético mostró que la mayoría de las cepas estaban distribuidas a lo largo del dendrograma, pero había un grupo distinto muy homogéneo y bien definido que consistía en AGL219, AGL225, AGL164, AGL161 y AGL148 (FIG. 1). De acuerdo con la homología con la base de datos del GenBank, la cepa AGL148 corresponde a la especie *S. yatensis* y la cepa AGL225 a *S. melanosporofaciens*.

15

e) Diferenciación de los aislamientos de *Streptomyces* a nivel de cepa

Con el fin de diferenciar las cepas de *Streptomyces* AGL225 y AGL148 de otras cepas de *Streptomyces*, procedimos a determinar su perfil de huellas dactilares de ADN. Utilizamos la

20 técnica RAPD (Amplificación Aleatoria de ADN Polimórfico), con cebadores arbitrarios cortos y simples (8-12 nucleótidos) generados por amplificaciones de PCR que permiten la tipificación de las cepas (Williams et al., 1990). Se utilizó un conjunto de 25 cepas de muestras de campo y nueve cepas de referencia, entre ellas *S. saraceticus* SS31.

Las cepas se cultivaron en medio líquido ISP2 durante 5 días, y el ADN se extrajo utilizando el

25 mini-kit de extracción de ADN QIAamp siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para realizar los RAPD, el ADN de las cepas (25 ng/μl) se sometió a amplificación con 12 cebadores en una primera prueba: LIT (5'-3' (TGCCGAGCTG; SEQ ID NO: 6, OPA9 (5'-3' GGGTAACGCC; SEQ ID NO: 7), OPA10 (5 GTTGGCGGTGTCGGGCTGCTT; SEQ ID NO:

30 8), OPA2 5'-3) (Kong et al., 2001) ' -3' GTGATCGCAG; SEQ ID NO: 9) (Gharaibeh et al., 2003), OPA B9 (5'-3' GGGCGACTAC; SEQ ID NO: 10) (Boroujeni et al. 2012), d8635 (5'-3' GAGCGCCAAAGGAGCAGAC; SEQ ID NO: 11) (Kutchma et al . , 1998) , Gen 1.80.5 (5'-3' 'ACCCAGCCG; SEQ ID NO: 12), Gen 1.80.7 (5'-3' GCACGCCGGA; SEQ ID NO: 13), Gen 2.80.11 (5'-3' 'GCAGCAGCCG; SEQ ID NO: 14), Gen 4.80.35 (5'-3' CACCTGCCGC; SEQ ID

35 NO: 15), Gen 4.80.36 (5'-3' 'GGCCTCCACG; SEQ ID NO: 16), Gen 4.80.37 (5'-3'

CGCCAGGAGC; SEQ ID NO: 17) (Martin et al . , 2000). Los mejores resultados se obtuvieron con los cebadores LIT, d8635 y 1.80.7 permitiendo un mayor número de bandas.

El cóctel de PCR fue de 25 µl, 2 µl de los cuales eran el ADN de la cepa. La concentración final del tampón fue de 1x, el MgCl 2 2,5 mM, 2 mM dNTPs, 0,4 uM de primers y 1 unidad de Taq polimerasa. Se utilizó un programa con una secuencia de dos ciclos de amplificación diferentes (5 ciclos a 37 ° C y 30 ciclos a 55 ° C). Se utilizó el termociclador profesional TRIO de Biometra (Biometra). Una vez completada la amplificación, los resultados fueron vistos en un gel de agarosa al 1,5%, que fue sometido a un campo eléctrico de 75 V durante 60 min, y teñido con EtBr durante 20 min. Los resultados se capturaron con el Imager Molecular ChemiDoc XRS + (BioRad Laboratories). Las imágenes de los geles, fueron procesadas con el programa Image Lab v.4 (Bi-Rad) para calcular el tamaño del fragmento (bp). Con los datos de los tres cebadores se construyó una matriz binaria para determinar la presencia o ausencia de un fragmento de un peso molecular determinado en las cepas. El cálculo de la similitud se realizó utilizando el coeficiente de Dice y finalmente el dendrograma se realizó con un análisis de agrupación utilizando el método UPGMA (Unweighted Pair Group Method With Arithmetic Mean en inglés) con el programa NTSYSpc v2.0.

En la figura 2 se muestra el dendrograma obtenido con el método UPGMA derivado de la combinación de los patrones RAPD con los cebadores LIT, d8635 y 1.80.7, para los 25 aislados y diez cepas de referencia de las especies *S. saraceticus*, *S. hygroscopicus*, *S. griseoviridis*, *S. violascens*, *S. lipmanii*, *S. antibioticus*, *S. fradiae*, *S. rochei* y *S. violasceus*. Se puede ver que cada una de las cepas se puede distinguir con la huella del ADN de la RAPD, en particular las cepas AGL225 y AGL148. Así pues, las cepas de la invención tienen un patrón RAPD único y distintivo diferente de otros aislados, incluidos los de las colecciones o de los productos comerciales.

Ejemplo 2. Preparación de cultivos de las cepas de la invención y de extractos libres de células, para obtener concentrados de suspensiones celulares y extractos del medio de cultivo.

Para la producción de células o metabolitos de las cepas AGL225 y AGL148, se cultivaron cultivos en placas ISP2. Para obtener una suspensión celular concentrada o un sobrenadante libre de células de los cultivos que contenían los metabolitos de fermentación de los *Streptomyces* del invento, las cepas se cultivaron durante 1 semana en medio líquido de ISP2

y se incubaron a 28 °C con agitación a 150 rpm. El material obtenido en fase estacionaria se sometió a centrifugación a 8000 rpm durante 15 min. El pellet que contiene las células puede resuspenderse en un pequeño volumen de tampón fosfato para obtener una suspensión celular concentrada de 10^9 UFC / ml. La suspensión celular concentrada puede utilizarse en otros ensayos, como el control de enfermedades en plantas infectadas artificialmente con fitopatógenos.

El sobrenadante de la centrifugación, que contiene metabolitos producidos por el cultivo de la cepa, se utilizó para ensayos de actividad antimicrobiana. Los sobrenadantes se filtraron a través de filtros de poro de 0,45 micrómetros y los filtrados se congelaron a -80 °C para su posterior uso. Estos extractos se concentraron adicionalmente mediante liofilización para obtener un extracto sólido, que puede almacenarse hasta su utilización. En este caso, el material sólido se suspende en agua destilada o metanol, o puede someterse a una extracción/purificación parcial de sus componentes mediante extracción en fase con acetato de etilo o hexano/cloroformo. Esas fracciones pueden ser evaporadas y el pellet resuspendido en metanol. Todos estos materiales pueden utilizarse en ensayos de actividad antimicrobiana o nematocida, y para el análisis de los componentes activos mediante cromatografía HPLC.

Ejemplo 3. Actividad antimicrobiana de sobrenadantes de cultivos sin células

Los sobrenadantes de cultivo fueron ensayados por el sistema Bioscreen (LabSystems) utilizando 100 placas de micropocillos. Cada pocillo de la placa contenía 100 ul de sobrenadante (directo o en la dilución deseada), 80 de caldo Luria Bertani (2x) y 20 ul de una suspensión de *X. arboricola* pv. *pruni* o esporas de *F. oxysporum*. Los resultados de la inhibición se transformaron en unidades arbitrarias como AU ml⁻¹. Las AU se calcularon como el inverso de la dilución más alta que inhibía el crecimiento del patógeno (D) y se multiplicaron por 40 (Parente et al. 1995). En el cuadro 2 se muestran los resultados de las seis mejores cepas. Los sobrenadantes de las cepas AGL13, AGL25 y AGL31 tenían actividad antimicótica contra *F. oxysporum*, y la cepa AGL286 tiene actividad antibacteriana. Sin embargo, los sobrenadantes de las cepas AGL148 y AGL225 eran simultáneamente antibacterianos y antimicóticos.

Tabla 2. Actividad antimicrobiana in vitro (AU ml⁻¹) contra dos patógenos de los sobrenadantes de cultivo de las cepas de *Streptomyces*.

<i>Streptomyces</i>	<i>X.arboricola</i> <i>pv. pruni</i>	<i>F. oxysporum</i>
---------------------	---	---------------------

AGL13	0	640
AGL25	0	2560
AGL31	0	1280
AGL286	1280	0
AGL148	160	2560
AGL225	160	1280

Ejemplo 4. Inducción de las defensas de la planta

a) Respuesta hipersensible en las plantas de tabaco (HR)

Para demostrar la capacidad de inducir la defensa en las plantas se utilizó una técnica consistente en infiltrar las hojas de las plantas de tabaco. Este método mide la respuesta hipersensible (HR) en un indicador de la planta contra células o extractos (Freeman y Beattie, 2008). Se infiltraron suspensiones de 39 cepas seleccionadas de *Streptomyces* en el mesófilo de las hojas de tabaco (*Nicotiana tabacum*). Para la infiltración se realizó una punción en el reverso de la hoja con la ayuda de una aguja hipodérmica. Las infiltraciones se realizaron en cuatro plantas diferentes con una jeringa sin aguja cargada con el material de la cepa *Streptomyces*. La bacteria fitopatógena *Pseudomonas syringae* EPS94 a 10⁸ cfu/ml, se utilizó como control positivo, y el agua como control negativo. Después de 24-72 h de incubación de las plantas se observaron los síntomas. La respuesta del HR consistió en una necrosis de bloqueo limitada entre dos costillas y un tejido desecado de color marrón claro. De las 39 cepas analizadas, 10 cepas de la colección resultaron positivas (AGL31, AGL214, AGL225, AGL227, AGL260, AGL272, AGL305, AGL148, AGL161, AGL164, AGL171, AGL174, AGL186), particularmente *S. yatensis* AGL 148 y *S. melanosporofaciens* AGL 225. Este resultado indica su capacidad para inducir la defensa de las plantas de acuerdo con la reacción de HR en las hojas de tabaco.

b) Inducción de la expresión de genes relacionados con la defensa o el estrés en las plantas

Para confirmar que la reacción HR observada en las hojas de la planta de tabaco con el tratamiento con las cepas AGL225 y AGL148 se debía a la inducción de genes relacionados con la respuesta defensiva de la planta, se realizó un estudio transcriptómico, en este caso en plantas de tomate. El tomate se utilizó como planta modelo debido al abundante número de estudios disponibles sobre la expresión de genes.

Las plantas de tomate se cultivaron en hidroponía, en lana de roca de sustrato inerte (Grodan © Plugs). Después de 2-3 semanas (etapa fenológica de dos cotiledones) las plántulas fueron trasplantadas en bloques de lana de roca (Grodan © Delta). Estas fueron aclimatadas en el invernadero aproximadamente 8 semanas antes de realizar las pruebas. Se realizó un único tratamiento con las cepas de *Streptomyces* y se tomaron muestras de material vegetal (hojas) a las 24 horas para proceder a la extracción del ARNm. Como control positivo se utilizó un tratamiento de referencia con benzotiadiazol (Bion, Syngenta), que estimula las defensas de la planta. El diseño experimental consistió en 9 plantas por tratamiento (3 réplicas de tres plantas cada una). Para la extracción del ARN de las muestras, se mezclaron y congelaron tres hojas jóvenes de tres plantas individuales (unos 30 mg) con nitrógeno líquido en dos bolas (borosilicato de 4 mm de diámetro) y se almacenaron a -70°C. Las muestras se homogeneizaron con TissueLyser II (Qiagen) utilizando una frecuencia de 30 Hz durante 10 s. La extracción del ARNm se realizó con el reactivo Trizol (Invitrogen). La cuantificación del ARN obtenido se realizó con el sistema Nanodrop (NanoDrop quantitated © ND-1000, NanoDrop Technologies). Para eliminar los rastros de ADN, las muestras se trataron con DNasa (Ambion® TURBO DNA-free™. Live Technologies). Posteriormente, la transcripción inversa de los extractos de ácido nucleico de las muestras (conversión de ARNm a ADNc) se realizó con KITS de transcripción inversa de ADNc (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Finalmente, se realizó la qPCR para ambos, el gen de referencia endógeno *Actin* (F 5'-3': CACTGTATGCCAGTGTCTGT, SEQ ID NO 18; R 5'-3': GACGGAGAATGCATGTGGA, SEQ ID NO: 19) , así como para cada uno de los genes de las proteínas relacionadas con la patogénesis: *PR1a* (F 5' - 3': TCTTGTGAGGCCCAAAATTC, SEQ ID NO: 20 ; R 5'-3': ATAGTCTGGCCTCTCGGACA, SEQ ID NO: 21) (Aime et al 2008) , *Glucanases: GluA* (F 5'-3': TCTTGTGAGGCCCAAAATTC, SEQ ID NO: 22 ; R 5'-3': ATAGTCTGGCCTCTCGGACA, SEQ ID NO: 23) (. Aime et al 2008) , *GLUB* (F 5'-3': TTGTCGCCACCAACATTCA, SEQ ID NO: 24 ; R 5'-3': ACCATCTCGCGTGTTCATC, SEQ ID NO: 25) , *chitinases: chia* (F 5'-3':

TTCGGCACTGATGGAAGTGG, SEQ ID NO: 26; R 5'-3': TTTTAAGCTTGCTACACGCGG, SEQ ID NO: 27) , *PERAJ* (F 5'-3' : AGGCCCATTTTATCCGGTGG, SEQ ID NO: 28; R 5'-3': GCTAAGGCCACGTCTAGCAA, SEQ ID NO: 29) , *PER1* (F 5' '3': TCTTAGCTGTTGCAGCTCGT, SEQ ID NO: 30; R 5'-3' ': CTAGTGTATGGCCACCGGAC, SEQ ID NO: 31) , *HARP* (F 5'-3': ATTATGGCCCGTCCATTCCG, SEQ ID NO: 32; R 5'-3' ': ATGCAATGACTCCGAGGACG, SEQ ID NO: 33).

En la TABLA 3 se muestra el efecto de los tratamientos sobre los niveles de expresión génica (ARNm) correspondientes a cuatro genes relacionados con la respuesta de defensa en las plantas. Se comparó el efecto de las cepas AGL148 y AGL225, en relación con un control positivo (Bion de Syngenta) y con un control negativo (agua). En comparación con el control negativo, la cepa AGL148 induce la expresión de los genes *PerAJ*, *Pr1a*, *Chia A* and *Harp*, mientras que la cepa AGL225 induce el gen *Harp*. El control positivo de Bion induce *PR1a*, *Chia* y *Harp*. Por lo tanto, se puede concluir que ambas cepas inducen las defensas de la planta, pero el efecto es más extenso y fuerte en el AGL148 que en el AGL225.

TABLA 3. Efecto del tratamiento de las plantas de tomate con las cepas AGL225 y AGL148 en los niveles de expresión (ARNm) de los genes, *Pr1a*, *Chi A*, *PerAJ* y *Harp* relacionados con la respuesta defensiva. Control positivo (Bion) y control negativo (agua).

Tratamiento	HR	Genes			
		<i>PR1a</i>	<i>ChiA</i>	<i>PerAJ</i>	<i>Harp</i>
NTC	-	1.05±0.14	1.17±0.29	1.48±0.50	1.52±0.61
Bion	-	>40	8.54±4.00	0.34±0.16	13.52±2.02
AGL148	+	22.23±4.92	3.74±0.42	1.92±0.89	13.41±2.82
AGL225	+	0.39±0.20	1.05±0.42	0.19±0.072	3.01±0.59

PR1a, Proteína relacionada con la patogénesis; *ChiA*, quitinasa; *Per AJ*, peroxidasa; *Harp*, proteína inducida similar a Harpin.

Ejemplo 5. Genes y metabolitos implicados en la actividad de las cepas

Se estudió la producción de metabolitos de fermentación por cultivos de *Streptomyces* porque se ha asociado con la actividad de control biológico en varios bioplaguicidas microbianos (Montesinos y Bonaterra 2009). En el género *Streptomyces* se ha descrito la producción de numerosos compuestos antimicrobianos del grupo de los aminoglucósidos y los policétos. El

género *Streptomyces* es notable por la producción de metabolitos secundarios que dan a sus miembros una amplia gama de aplicaciones en el campo fitosanitario.

a) Caracterización de los genes que intervienen en la síntesis de los metabolitos antimicrobianos

Para confirmar la producción de metabolitos antimicrobianos beneficiosos para las plantas por parte de las cepas, se realizó un enfoque molecular antes del análisis químico de los perfiles de metabolitos específicos. Se procedió a detectar los genes relacionados con la síntesis de tres grupos de metabolitos secundarios bioactivos producidos por los actinomicetos. Se utilizaron tres pares de cebadores para la biosíntesis de metabolitos con el fin de detectar aminoglucósidos (strD01f 5'-3'': CTTGCCCATGTATCTCGGCGACAA, SEQ ID NO: 34; strD01r 5'-3'': TGCCGGTGTCTTCCAGTAG, SEQ ID NO: 35), policétidos tipo II (act04f 5'-3'': GATGGTCTCCACCGGCTGC, SEQ ID NO: 36; act06r 5'-3'': GTCTCGTGGCG GTCGTTCTGC, SEQ ID NO: 37) y betalactámicos (pcb03f 5'-3'': CGAGTCCTGGTGCTACC TGAACC, SEQ ID NO: 38; pcb03r 5'-3'': TCATCGACACGTCCAGGTGGTC, SEQ ID NO: 39) (Bervanakis, 2008). El ADN de los cultivos se extrajo siguiendo el mismo protocolo que para la identificación de los aislados, y que se describe en el ejemplo 1, párrafo b). La amplificación se realizó en un cóctel con un volumen de 25 µl, con una concentración final de 1x tampón, 3 mM de cloruro de magnesio, 200 µM de dNTPs, 0,2 µM de cada uno de los cebadores, 2 U Taq polimerasa (BioTools, España) y 2,5 µl de muestra. El programa del termociclador consistió en 1 ciclo de 95 °C durante 5 min, 30 ciclos de 95 °C durante 45 s, 65 °C durante 45 s y 1 min a 72 °C; finalmente a 72 °C para la amplificación 10 min y una etapa final de mantenimiento a 4 °C. Se utilizó el termociclador profesional TRIO de Biometra. Los amplicones se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 1,5% en un campo eléctrico de 90 V durante 40 min. Luego, los geles fueron teñidos con EtBr durante 20 min. Los resultados se capturaron con el Imager Molecular ChemiDoc XRS + (BioRad Laboratories). Se utilizó *Streptomyces griseus* DSM40236 como comprobación positiva de la presencia de genes biosintéticos de aminoglucósidos; *S. cattleya* DMS46488 (NRRL8057)) para los betalactámicos y *S. nogalater* DSM40546 para los policétidos.

La figura 3 muestra que de las 59 cepas de la colección analizada, 14 mostraron genes de biosíntesis de aminoglicósidos, 26 cepas genes de síntesis de policétidos, mientras que ocho cepas poseían ambos grupos de genes. Ninguna de las cepas mostraba genes de síntesis de

betalactámicos, y 17 cepas no mostraban ninguno de los genes. Las cepas AGL225 y AGL148 sólo dieron positivo en los genes de los policétidos de tipo II.

b) Perfiles de metabolitos de la fermentación

5

Tras el análisis de los tres tipos de genes relacionados con el metabolismo antimicrobiano, procedimos a determinar los perfiles de los metabolitos producidos por las cepas mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Los metabolitos producidos en el cultivo líquido se determinaron como perfiles característicos de cada cepa. Esto se hizo

10 específicamente para las cepas AGL225 y AGL148. El medio de cultivo ISP2 fue inoculado con las cepas, cultivadas durante una semana a 28 °C bajo agitación a 150 rpm. Los cultivos se filtraron y los sobrenadantes se congelaron a -80 °C. El mismo procedimiento se llevó a cabo con el medio no inoculado ISP2 para ser usado como control.

15 La extracción de metabolitos se realizó en los cultivos de sobrenadantes. El proceso de extracción consistió en hexano (1: 1) y acetato de etilo (1: 1), seguido de evaporación y resuspensión de acetonitrilo. Se analizaron 50 µl de cada extracto en las siguientes condiciones: Flujo: 1,25 ml / min; Disolventes: A: Agua + 0,1% TFA B: acetonitrilo + 0,1% TFA. Los cromatogramas se realizaron a 220 nm (compuestos peptídicos), 254 nm

20 (compuestos aromáticos), 280 nm (compuestos fenólicos). El uso de las columnas C18-XF y PFP permite detectar en los cromatogramas picos diferenciales y de identificación a varias longitudes de onda (220, 245 y 280 nm) entre las cepas AGL148 y AGL225, que se ajustan a los diversos metabolitos producidos.

25 En la figura 4 se pueden ver varios perfiles que muestran picos diferenciales con respecto a los componentes del medio, que son producidos por *S. melanosporofaciens* AGL225 y *S. yatensis* AGL148. Estos perfiles son característicos de tales cepas y son huellas moleculares distintivas, que difieren de otras cepas de *Streptomyces*. Se desconoce la naturaleza de los compuestos, pero probablemente fueron productos de genes policetidos, de acuerdo con los

30 genes de estas vías detectados por la PCR.

Ejemplo 6. Actividad nematocida

Para determinar la actividad nematocida de las cepas, se utilizó como nematodo modelo el

35 nematodo *Caenorhabditis elegans* WT Bristol N2, que es una cepa silvestre del Centro

Genético de *Caenorhabditis* (CGC). Los nematodos fueron cultivados alimentados con *E. coli* OP50 de forma rutinaria. La población heterogénea de nematodos resultante fue tratada con hipoclorito de sodio (1,5%) para preservar sólo los huevos y eliminar los individuos. Después de varios lavados con tampón M9 se procedió a la eclosión de los huevos, que se transfirieron a un medio NMG con *E. coli* OP50 como alimento, y se incubaron hasta la etapa L2. En esta etapa se hicieron ensayos de supervivencia en medios sólidos y líquidos. En los ensayos en medio sólido, la cepa correspondiente de *Streptomyces* fue sembrada en NMG, en lugar de *E. coli* OP50. Después de 12 días de crecimiento se depositaron los nematodos del estadio L2. Como controles positivos (controles de patógenos) se utilizaron *S. enterica subsp. enterica* cepa ATCC14028 (CECT4594) y LT2 (CECT4085). En el medio líquido se ensayó en microplacas el sobrenadante de cultivo de las cepas de *Streptomyces*, obtenido por centrifugación como se ha descrito anteriormente. La prueba consistió en depositar 1 ml de sobrenadante de cultivo y 30 microlitros de NMG con una suspensión de nematodos (75-100 individuos) en cada pocillo de la microplaca. Como controles negativos se utilizaron NMG fresco, medios de cultivo ISP2 y tampón M9, y como control nematocida se utilizó el biocida azida sódica. Las placas se incubaron a 23 °C y se determinaron los individuos que sobrevivieron 24 y 48 h. Se utilizó un estereomicroscopio (SMZ NIKON 1000) para observar los nematodos. Se midió la longitud y la forma de los nematodos, y los nematodos muertos aparecieron con una morfología recta, mientras que los individuos sinusoidales y móviles se consideraron vivos.

Las células de las cepas de *Streptomyces* por sí solas no afectaron significativamente a la supervivencia de los nematodos en las pruebas realizadas en medio sólido, mientras que las dos cepas de la *Salmonella* patógena causaron mortalidad. Sin embargo, los sobrenadantes de los cultivos sin células de *S. melanosporofaciens* AGL225 y *S. yatensis* AGL148 tuvieron un fuerte efecto nematocida (FIG. 5, TABLA 4). Se observó que también en dosis elevadas, una parte de los individuos nematodos estaban lisados y prácticamente irreconocibles. Este efecto se atribuyó a la posible acción de las quitinasas y a los numerosos metabolitos nematotóxicos producidos por las cepas de *Streptomyces*. Esa propiedad puede considerarse importante para el uso de las cepas como nematocidas biológicos, con aplicaciones en la protección de las plantas.

Cuadro 4. Actividad nematocida de *S. melanosporofaciens* AGL225 y *S. yatensis* AGL148.

Tratamiento	Dilución	Inicial	Muertos	Vivos	lisados
Sobrenadante AGL148	1/2	58	11	0	47
	1/10	55	21	0	34
Sobrenadante AGL225	1/2	62	36	0	26
	1/10	65	45	0	20
Azida sódica (control de muerte)	1	70	68	0	2
Medio control ISP2	1	60	0	57	3
Tampón control M9	1	61	0	60	1

Ejemplo 7. Eficacia de las cepas de la Invención en la lucha contra las infecciones bacterianas y fúngicas en las plantas

Para demostrar la eficacia de las cepas de la invención, se realizaron varios ensayos en condiciones de ambiente controlado (invernadero) sobre varios sistemas patogénicos representativos (plantas de cultivo y patógenos), con la participación tanto de bacterias fitopatógenas como de hongos fitopatógenos. Los sistemas patogénicos bacterianos fueron *X. arboricola* pv. *pruni* (Xap) en el GF677, un patrón híbrido de almendra x melocotón, *P. syringae* pv. *tomate* (Pto) en el tomate, y *E. amylovora* en la pera. En el caso de los hongos se utilizaron los sistemas patogénicos *S. sclerotiorum* en la lechuga, *B. cinerea* en el tomate, y *F. oxysporum* f. sp. *radicis lycopersici* (Forl) en el tomate,. Los resultados se muestran en la FIG. 6.

Para la preparación de los tratamientos, se sembraron las cepas de *Streptomyces* en ISP2 y se incubaron a 28 °C durante cinco días, para obtener células vegetativas, esporas y metabolitos de fermentación. Se prepararon suspensiones de las cepas en agua destilada estéril como se describe en el ejemplo 2. Los recuentos viables fueron de 3-4x10⁸ ufc/ml, dependiendo del ensayo.

a) Control de *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* en *Prunus*

Se utilizaron rizomas de *Prunus* GF667, un híbrido de almendra y melocotón (*Prunus amygdalus* x *Prunus persica*), cuando presentaba entre 6 y 7 hojas. El diseño experimental consistió en 3 replicados de 3 plantas por replicado para cada tratamiento. Los tratamientos

con cepas de *Streptomyces* se aplicaron con un aerógrafo hasta el punto de escorrentía, 7 y 1 días antes de la inoculación del patógeno. Se utilizó *S. saraceticus* SS31 como control de referencia. La cepa de *X. arboricola* pv. *pruni* CFBP 5563, el patógeno, se inoculó en la superficie de placas de agar LB y se incubó a 28 °C, y el inóculo se preparó a partir de placas incubadas durante 24 h. La suspensión del patógeno se ajustó a una concentración de aproximadamente $6,8 \times 10^7$ ufc/ml. Todas las hojas de una planta se inocularon rociándolas con un aerógrafo hasta el punto de escorrentía. Una vez inoculadas, las plantas se colocaron en bolsas de plástico durante 48 h para acelerar el proceso de infección, y luego se incubaron a 26 ± 2 °C con una humedad relativa del 60% y 16 h de luz durante el día y 15 ± 2 °C, 80% HR y 8 h de oscuridad durante la noche. Las evaluaciones se hicieron a los 15 días de la inoculación del patógeno (dpi) asignando un índice de enfermedad basado en el área foliar afectada. 0: sin síntomas; 1, 0 a 25% del área foliar; 2, 25-50% del área foliar, 3, 50 a 75% del área foliar; y 4, más del 75%.

En la figura 6 (Xap) se muestra el efecto de los tratamientos con *S. saraceticus* SS31 como control de referencia, así como con las cepas de *Streptomyces* de la invención. Las cepas AGL148 y AGL225 fueron efectivas y redujeron significativamente la gravedad de la infección en relación con el control no tratado.

b) Control de *Erwinia amylovora* en la peral

Este ensayo se realizó con plantas de peral de dos años de edad de un cultivar Conferencia (clon CAV) autoenraizadas y cultivadas en macetas. El diseño experimental consistió en tres replicados de 3 plantas por replicado para cada tratamiento. En este ensayo los tratamientos se aplicaron a los 7 y 1 días antes de la inoculación del patógeno. Los tratamientos con cepas se realizaron en las hojas jóvenes superiores (3-4 hojas/planta) con un aerógrafo hasta el punto de escorrentía. Un día antes del tratamiento, las plantas fueron heridas con una incisión en el nervio principal de las hojas. Los tratamientos consistían en las cepas de *Streptomyces*. La cepa de patógeno utilizada fue *E. amylovora* EPS101 que fue descongelada y mantenida mediante subcultivo en placas de agar LB frescas incubadas a 28 °C. Se preparó un inóculo fresco para las infecciones a una dosis de $3,5 \times 10^7$ ufc/ml. La inoculación de *E. amylovora* se realizó aplicando una gota de 10 µl en cada herida. Una vez inoculadas, las plantas se colocaron en bolsas de plástico para acelerar el proceso de infección y mantener el patógeno en cuarentena. La evaluación de la enfermedad se realizó a 5, 7 y 12 dpi, utilizando un índice de 0 a 4 basado en el desarrollo de la necrosis en la planta: 0: no hay infección 1: inicio de la

necrosis fuera de la herida; 2: inicio de la necrosis por el nervio de la hoja; 3: la necrosis llega al pecíolo, y 4: necrosis de la hoja al brote. La figura 6 (Ea) muestra como la cepa AGL225 redujo significativamente los niveles de infección en comparación con el control no tratado.

5 c) Control de *Pseudomonas syringae* pv. *tomate* en plantas de tomate

Para obtener plantas de tomate, se sembraron semillas de la variedad Río Grande en alvéolos y 15-21 días después se trasplantaron a macetas. Las condiciones en el invernadero fueron 16 h de luz a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ y 8 h de oscuridad a $15 \pm 2^\circ\text{C}$. El diseño experimental consistió en 3 repeticiones de 3 plantas por repetición, por cada tratamiento. Se utilizó como patógeno la cepa DC3000 de *P. syringae* pv. *tomate* (Pst). Para la preparación del inóculo se descongeló una colonia y se mantuvo en placas LB frescas incubadas a 28 durante 24 h. Se preparó una suspensión de agua que se ajustó a aproximadamente 10^8 ufc/ml. El inóculo se complementó con tierra de diatomeas (1 g/l) para facilitar las micro heridas en las hojas y por lo tanto la infección. Cada planta se inoculó con el aerógrafo hasta el punto de escorrentía, se incubó a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ con una humedad relativa del 60% y 16 h de luz durante el día y $15 \pm 2^\circ\text{C}$, 80% HR y 8 h de oscuridad durante la noche.

Los tratamientos comenzaron cuando emergieron la tercera y cuarta hoja verdadera y se hicieron 7 y 1 días antes de la inoculación del patógeno. El *Bacillus subtilis* QST713 fue usado como control. Las evaluaciones se hicieron a 7 dpi y se calificaron dependiendo del área foliar afectada, según un índice de 0 cuando no se detectan síntomas; 1, menos del 25% del área afectada, 25-50% del área foliar 2 afectada; 3, 50-75% del área foliar afectada y 4, más del 75% del área afectada. Todos los tratamientos, excepto el de Serenade, mostraron una reducción en la severidad de la infección por Pst (FIG. 6 Pst). Las cepas AGL225 y AGL148 fueron efectivas en la reducción de la severidad de la enfermedad, comparadas con el control no tratado.

d) Control de *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis lycopersici* en el tomate

Las plantas de tomate se prepararon como en el Ejemplo 7 sección b. Para la preparación del inóculo de patógenos *F. oxysporum* f. sp. *radicis lycopersici*, se utilizó la cepa FORL. Las placas de agar PDA se sembraron 10 días antes de la inoculación del patógeno y se incubaron a $23-25^\circ\text{C}$ con un fotoperíodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad. Se preparó una suspensión del patógeno y se ajustó a $2,9 \times 10^6$ conidias/mL. Antes de inocular el hongo, se

hicieron cuatro lesiones en las raíces de la planta con un bisturí. Se inoculó a cada planta 10 ml de la suspensión de FORL por irrigación. Los primeros tratamientos realizados comenzaron cuando surgieron la tercera y cuarta hoja verdadera de la planta. Los tratamientos se realizaron 7 y 1 días antes de la inoculación del patógeno y se aplicaron 20 ml de cada preparación de la cepa por medio del riego. El *Bacillus subtilis* QST713 se utilizó como control. Las evaluaciones de las plantas enfermas se hicieron a 21 dpi. Se utilizó un índice basado en la evolución de la necrosis en el tallo: 0: no hay infección; 1: la superficie de la lesión no llega al tallo; 2: la infección sube por el tallo de la planta, y 3: la planta estaba muerta. Como se muestra en la FIG.6 (Fox), las cepas AGL148 y AGL225 fueron eficaces en el control de las infecciones.

e) Control de *Botrytis cinerea* en el tomate

Las plantas de tomate se prepararon como en el Ejemplo 7 sección c. Para la preparación del inóculo de patógenos se utilizó una cepa de *B. cinerea*. Se sembraron placas de agar PDA 10 días antes de la inoculación del patógeno y se incubaron a 23-25°C con un fotoperíodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad. Se preparó una suspensión del patógeno y se ajustó a $2,9 \times 10^6$ conidias/mL. Como tratamientos de referencia se utilizó como control el producto comercial Serenade MAX (*Bacillus subtilis* QST713). Las plantas fueron rociadas con la suspensión de hongos hasta el punto de escorrentía. Las evaluaciones se hicieron a los 7 días de la inoculación del patógeno (dpi). El índice de gravedad en las hojas se estableció en 0, no infectado; 1, menos del 25% de superficie; 2, 25 a menos del 50%; 3, 50 a menos del 75%; 4, más del 75%.

La FIG.6 (Bc) muestra que las cepas AGL148 y AGL225 fueron altamente efectivas, así como *B. subtilis* QST713.

f) Control de *Sclerotinia sclerotiorum* en lechuga

Las semillas de lechuga se sembraron en alvéolos y 15-21 días después se trasplantaron a macetas. Los tratamientos se realizaron 7 y 1 días antes de la inoculación del patógeno. Como tratamientos de referencia se utilizaron como controles Serenade MAX (*Bacillus subtilis* QST713) y *S. saraceticus* SS31. El hongo fitopatógeno *S. sclerotiorum* se cultivó en frascos Erlenmeyer de 250 ml con 25 g de semillas de centeno esterilizadas en autoclave y 25 ml de agua destilada. La inoculación del patógeno a las plantas se realizó 21 días después de la

siembra y cada planta se infectó con una semilla de centeno infestada. Las evaluaciones se hicieron a los 3 y 7 días de la inoculación del patógeno (dpi). El índice de gravedad se estableció en 0: planta sana; 1: podredumbre de la raíz hasta la corona; 2: la podredumbre afecta a la corona; 3: la podredumbre supera a la corona, y 4: lechuga muerta. La FIG.6 (Ss) muestra que la gravedad de la enfermedad en los controles no tratados fue bastante alta. Las cepas AGL148 y AGL225 tuvieron un efecto inhibidor.

BIBLIOGRAFÍA

10

Aimé. S.; Cordier, C.; Alabouvette, C.; Olivain, c.2008. Comparative analysis of PR gene expression in tomato inoculated with virulent *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* and *F. oxysporum* Fo47 the biocontrol strain. *Physiol Mol Plant Pathol* . 73 (1-3): 9-15. doi: 10.1016 / j.pmpp.2008.10.001.

15

Ait-Barka E. et al. 31.3.2009. Use of composition comprising at least one actinomycetes strains for control of microorganisms inducing plant disease, where actinomycetes strains are different from *Streptomyces melanosporofaciens*. WO2010115802-A1.

Beaulieu C. et al. 8.12.2003. Geldamycin-producing strains, uses thereof and methods of producing same. US2007/0237755-A1.

20

Bervanakis, G. 2008. Detection and Expression of Biosynthetic Genes in Actinobacteria. Thesis for the degree of Master of Science. Flinders University.

Bonaterrea, A.; Camps, J.; Montesinos, E. 2005. Osmotically induced trehalose and glycine betaine accumulation improves tolerance to desiccation, survival and efficacy of the postharvest biocontrol agent *Pantoea agglomerans* EPS125. *FEMS Microbiology Letters*. 250:7-15.

25

Boroujeni, ME; Das, A.; Prashanthi, K.; Suryan, S. and Bhattacharya, S. 2012. Enzymatic screening and random amplified polymorphic DNA fingerprinting of soil *Streptomyces* isolated from Wayanad district in Kerala, India. *Journal of Biological Sciences* 12 (1): 43-50.

Cabrefiga, J., Francés, J., Montesinos, E., Bonaterrea, A.. 2011. Improvement of fitness and efficacy of a fire blight biocontrol agent via nutritional enhancement combined with osmoadaptation. *Applied and Environmental Microbiology* **77**: 3174-3181.

30

Cabrefiga, J., Francés, J., Montesinos, E., Bonaterrea, A. 2014. Improvement of a dry formulation of *Pseudomonas fluorescens* EPS62e for fire blight disease biocontrol by combination of culture osmoadaptation with a freeze-drying lyoprotectant. *J. Applied Microbiology*. 06/2014; DOI: 10.1111/jam.12582.

35

- Dahllöf, I.; Baillie, H.; Kjelleberg, S. 2000. rpoB-based microbial community analysis 16S rRNA Avoids limitations inherent in intraspecies gene heterogeneity. *Appl Environ Microbiol* **66**: 3376-3380.
- Frändberg, E.; Schnürer, J. 1998. Antifungal activity of chitinolytic bacteria isolated from cereal grain stored airtight. *127*: 121-127.
- Freeman, BC; and Beattie, GA 2008. An Overview of Plant Defenses Against Pathogens and Herbivores. The Plant Health instructor. DOI: 10.1094 / PHI-I-2008-0226-01.
- Gharaibeh, R.; Saadoun, I.; Mahasneh, A.2003. Genotypic and phenotypic Characteristics of antibiotic-producing *Streptomyces* soil Investigated by RAPD. *J Basic Microbiol* . 43 (1): 18-27. doi: 10.1002 / jobm.200390000.
- Kim, BJ; Kim, CJ; Chun, J.; Koh, YH; Lee, SH; Hyun, JW; Cha, CY; Kook, 2004. Phylogenetic analysis of the generated YH *Streptomyces* and *Kitasatospora* based on partial RNA polymerase β -subunit gene (rpoB) sequences. *Int J Syst Evol Microbiol* 54 (2): 593-598. doi: 10.1099 / ijs.0.02941-0.
- Kong, L.; Tzeng, D.; Yang, C. .2001. Generation of PCR-based DNA Fragments for Specific Detection of *Streptomyces saraceticus* N45. *Proc. Natl. Sci.* 25 (2): 119-127.
- Kuchma, AJ; Roberts, MA; Knaebel, DB and Crawford, DL 1998.- Small-scale isolation of genomic DNA from *Streptomyces* mycelia or spores. *BioTechniques* 24: 452-457.
- Montesinos, E. and Bonaterra A. 2009. Microbial pesticides. *Encyclopedia of Microbiology*, Publisher: Elsevier Inc., Editors: Schaechter M, pp.110-120.
- Parente, E.; Brienza, C.; Moles, M.; Riccardi, A. 1995. A comparison of methods for the measurement of bacteriocin activity. *Journal of Microbiological Methods*, 22: 95-108).
- Rintala, H.; Nevalainen, A.; Rönkä, E.; Suutari, M.2001. PCR primers targeting the 16S rRNA gene for the specific detection of streptomycetes. *Mol Cell Probes* . 15 (6): 337-347. doi: 10.1006 / mcpr.2001.0379.
- Rodriguez-Kabana, R.; Godoy G, Shelby RA. 1983. The determination of soil chitinase activity: Conditions for assay and ecological studies. *Plant Soil.* 106: 95-106.
- Sambrook, J. and Russell, DW "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Chapter 13, "Mutagenesis", Cold Spring Harbor, 3rd Ed., 2001.
- Shepherd, MD; Kharel, MK; Bosserman, MA; Rohr, J. 2010. Laboratory maintenance of *Streptomyces* species. *Curr Protoc Microbiol* ; Chapter 1: 1-10. . doi: 10.1002 / 9780471729259.mc10e01s18.Laboratory.
- Shirling, EB and Gottlieb D. 1966. Methods for characterization of *Streptomyces* species. *International Journal of Systematic Bacteriology.* 13: 313-340.

Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, and Kumar S (2013) Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0 program, Molecular Biology and Evolution 30 : 2725-2729.

Tzeng D. et al. 10.5.2005. Biocontrol formulation containing *Streptomyces* spp., method for preparing the formulation and relevant use. US20140057336 A1.

- 5 Williams, JGK; Kubelik, AR; Livak, KL; Rafalski, JA; SV Tingey 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers ", Nucleic Acids Res., 1990, vol. 18, pp. 6531-6535).

Yoon-Byung D. et al. A novel *Streptomyces yatensis* CJS-24 KCTC 11107BP active against plant fungal pathogens and a microbial pesticide using the same. KR100869668.