

## COMPUESTO FUNGICIDA

La presente invención se refiere a un compuesto novedoso que tiene actividad pesticida. La invención también se refiere a composiciones que comprenden el compuesto, a un  
5 procedimiento para preparar el compuesto y al uso del compuesto o de las composiciones en agricultura u horticultura para evitar o controlar la infestación fitófaga de plantas, cultivos alimentarios cosechados, semillas o materiales no vivos.

10

## ANTECEDENTES

Los plaguicidas se utilizan ampliamente en la agricultura para proteger las plantas de los daños causados por insectos y hongos. Los pesticidas pueden ser de origen químico o biológico. Debido a algunos efectos negativos de  
15 los plaguicidas químicos en el medio ambiente, existe una necesidad creciente de plaguicidas tales como los fungicidas de origen biológico. Los microorganismos conocidos que producen antibióticos contra los hongos son los actinomicetos, por ejemplo *Streptomyces sp.* Una especie muy  
20 conocida es *Streptomyces natalensis*, que produce el compuesto antifúngico natamicina, utilizado en la protección de alimentos y cultivos. En el documento US 5,356,624 se divulga una cepa de *Streptomyces rimosus* que se encontró activa contra varios hongos que degradan la madera. En el documento  
25 WO2022/038180 se divulgan nuevos *Streptomyces sp.* que

producen varios compuestos antifúngicos conocidos, tales como estreptimidona, natamicina (pimaricina) o albofungina. Se observó que los extractos de estas cepas bacterianas son activos contra plagas vegetales muy conocidas tales como

5 *Fusarium graminearum*, *Zymoseptoria tritici* y *Puccinia striiformis*.

Se sabe que las especies de *Streptomyces* producen compuestos de polieno antifúngicos.

El documento WO2004/065401 divulga una clase de

10 policétidos de polieno, obtenibles por cepas de *Streptomyces aizunensis*, que resultaron activos frente a levaduras y hongos filamentosos, tales como especies de *Candida* y *Aspergillus*.

Park et al, *Frontiers in Bioengineering and*

15 *Biotechnology*, 2021, Vol. 9 p. 1-10, divulga un compuesto de polieno altamente homólogo a la neotetrafibricina, con actividades contra *Candida albicans* y *Fusarium oxysporum*. El compuesto de polieno se obtuvo a partir de una cepa de *Streptomyces* estrechamente relacionada con una *Streptomyces*

20 *rubrisoli*, que se aisló a partir de un cribado de 2400 cepas de *Streptomyces*.

Bobek et al, 2022, *Int. J. of Molecular Sciences*, Vol, 23, 15045, divulga varios antibióticos de polieno producidos por especies hemolíticas de *Streptomyces*.

Debido al desarrollo de resistencias por parte de los hongos frente a los fungicidas existentes, a las normativas de los gobiernos y a la presión social, existe una necesidad continua de buscar nuevos compuestos, tales como nuevos  
5 compuestos de polieno, que tengan actividad fungicida de origen biológico.

### SUMARIO

La presente invención se refiere a un compuesto, en el que el compuesto es un compuesto de polieno que tiene una  
10 fórmula molecular  $C_{67}H_{115}NO_{25}$ , en el que el polieno se caracteriza además por el espectro de absorción de luz que tiene máximos de absorbancia a una longitud de onda de 235.5 nm, 301.1 nm, 315.8 nm, 330.9 nm y 348.3 nm cuando se miden en una solución acuosa de acetonitrilo. El polieno que tiene  
15 la fórmula molecular  $C_{67}H_{115}NO_{25}$  tiene una masa molecular de 1333.7758 g.

Sorprendentemente, se ha descubierto que el nuevo compuesto de acuerdo con la presente invención tiene un nivel sorprendente de actividad biológica para evitar o controlar  
20 microorganismos fitopatógenos tales como hongos. La actividad biológica tal como se utiliza en el presente documento incluye actividad fungicida. En consecuencia, el compuesto de la presente invención presenta actividad fungicida.

En un segundo aspecto, la invención se refiere a una  
25 composición que comprende el compuesto de acuerdo con la

presente invención y un microorganismo que comprende al menos una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína que tiene al menos 90 % de identidad con al menos una de las secuencias de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 26-49, 5 preferiblemente SEQ ID NO: 46 y 47, preferiblemente en el que la secuencia de nucleótidos tiene al menos un 90 % de identidad con al menos una de las secuencias de nucleótidos de acuerdo con SEQ ID NO: 2 a 25, preferiblemente en el que los microorganismos comprenden una secuencia de nucleótidos 10 que tiene al menos un 90 % de identidad con el SEQ ID NO: 22 y/o SEQ ID NO: 23. El microorganismo para producir el compuesto de acuerdo con la presente invención.

En un tercer aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para preparar el compuesto, o una composición 15 de acuerdo con la presente invención, que comprende cultivar un microorganismo en un medio de fermentación adecuado en condiciones que permitan la producción del compuesto.

En un cuarto aspecto, la presente invención se refiere a un método para controlar o evitar la infestación de una 20 planta por un microorganismo fitopatógeno, en el que una cantidad eficaz del compuesto de acuerdo con la presente invención o una sal del mismo, o una composición de acuerdo con la invención tal como se divulga en el presente documento, se aplica a la planta, a una parte de la misma o a 25 un emplazamiento de la misma.

De acuerdo con un quinto aspecto de la invención, se proporciona el uso de un compuesto o una composición de acuerdo con la presente invención como pesticida, preferiblemente como fungicida. De acuerdo con el presente  
5 aspecto de la invención, el uso excluye métodos para el tratamiento del cuerpo humano o animal mediante cirugía o terapia.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA

La presente invención se refiere a un compuesto de  
10 polieno, que tiene una fórmula molecular de acuerdo con  $C_{67}H_{115}NO_{25}$ , en el que el polieno se caracteriza además porque un espectro de absorción de luz como el mostrado en la figura 1, preferiblemente en el que el espectro de absorción de la luz tiene máximos de absorbancia a una longitud de onda de  
15 235.5 nm, 301.1 nm, 315.8 nm, 330.9 nm y 348.3 nm cuando se miden en una solución acuosa de acetonitrilo. Las longitudes de onda de estos máximos de absorbancia son que se muestra en la figura 1. Tal como se utiliza en el presente documento, una solución acuosa de acetonitrilo es un acetonitrilo: agua,  
20 típicamente un acetonitrilo: gradiente de agua utilizado para medir el espectro de absorción de la luz. El polieno que tiene una fórmula molecular de acuerdo con  $C_{67}H_{115}NO_{25}$  tiene una masa molecular de 1333.775 8 g.

El compuesto de acuerdo con la presente invención se  
25 caracteriza además por un tiempo de retención en

cromatografía líquida de 5.55-5.57 minutos cuando se ejecuta en las siguientes condiciones: Columna Kinetex Polar C18 100A 4.6x100 mm, P.N. H17-055453. Temp: 40 °C, intervalo de longitud de onda de DAD: de 250 a 260 nm, gradiente de  
5 disolvente: Disolvente A: H<sub>2</sub>O con ácido fórmico al 0.1 %, Disolvente B: CH<sub>3</sub>CN con ácido fórmico al 0.1 %, gradiente: 0 min B al 10 %, A al 90 %; 1 min B al 10 %, A al 90 %; 6.50 min B al 95 %, A al 5 %; 8.00 min B al 95 %, A al 5 %; 9.00 min B al 10 %, A al 90 %; 10.00 min B al 10 %, A al  
10 90 %, Caudal: 1.0 ml/min, Volumen de inyección: 5 µl, Tiempo total de ejecución: 10.0 min.

En una realización preferente, el compuesto de acuerdo con la presente invención es un compuesto aislado. La expresión «aislado» en referencia al compuesto significa que  
15 éste ha sido aislado de su entorno nativo.

Un polieno es un compuesto formado por al menos tres enlaces dobles (C=C) y simples (C-C) alternativos de carbono-carbono. Los polienos conocidos son, por ejemplo, la anfotericina B, la nistatina, la pimaricina y la filipina. Se  
20 descubrió sorprendentemente que el compuesto de polieno de acuerdo con la presente invención tiene un nivel sorprendente de actividad fungicida. La actividad fungicida del compuesto de polieno puede ser similar a la de otros compuestos de polieno conocidos.

En una realización, el compuesto de acuerdo con la presente invención obtenible cultivando, o es producido por un microorganismo que comprende al menos una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína que tiene al menos 90 %  
5 de identidad con al menos una de las secuencias de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 26-49, preferiblemente SEQ ID NO: 46 y 47, preferiblemente en el que la secuencia de nucleótidos tiene al menos un 90 % de identidad con al menos una de las secuencias de nucleótidos de acuerdo con SEQ ID  
10 NO: 2 a 25, preferiblemente en el que los microorganismos comprenden una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 90 % de identidad con el SEQ ID NO: 22 y/o SEQ ID NO: 23. Tal como se utiliza en el presente documento, obtenible por un microorganismo es obtenible cultivando el microorganismo en  
15 un caldo de fermentación adecuado que permita producir el compuesto de la invención.

Preferiblemente, el microorganismo tiene además al menos un 91 % de identidad con el genoma completo de *Streptomyces* sp. Saigon413 depositado en el Instituto Westerdijk con el  
20 número de acceso CBS149411.

En una realización, el microorganismo comprende además una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 99.5 % de identidad con la secuencia de nucleótidos de acuerdo con SEQ  
ID NO: 1.

En una realización, el microorganismo es un *Streptomyces chrestomyceticus*, preferiblemente *Streptomyces sp.* Saigon413 depositado en el Instituto Westerdijk con el número de acceso CBS149411.

5        En una realización, el microorganismo divulgado en el presente documento comprende un gen que participa en la síntesis del compuesto de acuerdo con la presente invención. Preferiblemente, el microorganismo comprende al menos una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína que tiene  
10 al menos un 90 %, preferiblemente al menos un 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, preferiblemente al menos un 99 % de identidad, preferiblemente un 100 % de identidad con al menos una de las secuencias de aminoácidos elegidas entre SEQ ID NO: 26 al 49.

15        Preferiblemente, el microorganismo divulgado en el presente documento comprende o contiene al menos uno, preferiblemente al menos dos, preferiblemente al menos tres, preferiblemente al menos cuatro, preferiblemente al menos cinco, preferiblemente al menos seis, preferiblemente al  
20 menos siete, preferiblemente al menos ocho, preferiblemente al menos nueve, preferiblemente al menos diez, preferiblemente al menos once, preferiblemente al menos doce, preferiblemente al menos trece, preferiblemente al menos catorce, preferiblemente al menos quince, preferiblemente al  
25 menos dieciséis, preferiblemente al menos diecisiete,

preferiblemente al menos dieciocho, preferiblemente al menos diecinueve, preferiblemente al menos veinte, preferiblemente al menos veintiuno, preferiblemente al menos veintidós, preferiblemente al menos veintitrés, preferiblemente las  
5 veinticuatro secuencias de nucleótidos que codifican una proteína que tiene / tienen al menos 90 %, preferiblemente al menos 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, preferiblemente al menos 99 % de identidad, preferiblemente 100 % de identidad con las secuencias amino de acuerdo con  
10 SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45,  
15 SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48, y/o SEQ ID NO: 49, preferiblemente una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de acuerdo con la o las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 46 y/o SEQ ID NO: 47.

Preferiblemente, el microorganismo divulgado en el  
20 presente documento comprende un gen que participa en la síntesis del compuesto de acuerdo con la presente invención. Preferiblemente, el microorganismo comprende al menos una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 90 %, preferiblemente al menos un 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96  
25 %, 97 %, 98 %, preferiblemente al menos un 99 % de identidad,

preferiblemente un 100 % de identidad con al menos una de las secuencias de nucleótidos elegidas entre las secuencias de nucleótidos de acuerdo con SEQ ID NO: 2 al 25.

Preferiblemente, el microorganismo en la composición y/o  
5 en el procedimiento para producir el compuesto y/o producir la composición de la presente invención comprende o contiene al menos uno, preferiblemente al menos dos, preferiblemente al menos tres, preferiblemente al menos cuatro, preferiblemente al menos cinco, preferiblemente al menos  
10 seis, preferiblemente al menos siete, preferiblemente al menos ocho, preferiblemente al menos nueve, preferiblemente al menos diez, preferiblemente al menos once, preferiblemente al menos doce, preferiblemente al menos trece, preferiblemente al menos catorce, preferiblemente al menos  
15 quince, preferiblemente al menos dieciséis, preferiblemente al menos diecisiete, preferiblemente al menos dieciocho, preferiblemente al menos diecinueve, preferiblemente al menos veinte, preferiblemente al menos veintiuno, preferiblemente al menos veintidós, preferiblemente al menos veintitrés,  
20 preferiblemente las veinticuatro secuencias de nucleótidos que tiene / tienen al menos 90 %, preferiblemente al menos 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, preferiblemente al menos 99 % de identidad, preferiblemente 100 % de identidad con las secuencias de nucleótidos de acuerdo con  
25 SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ

ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24 y/o SEQ ID NO: 25.

Preferiblemente, el microorganismo de la composición y/o que produce el compuesto y/o que produce la composición en un procedimiento de acuerdo con la presente invención comprende o contiene una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 90 %, preferiblemente al menos un 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, preferiblemente al menos un 99 % de identidad, preferiblemente un 100 % de identidad con las secuencias de nucleótidos de acuerdo con el SEQ ID NO: 22 o SEQ ID NO: 23. El microorganismo en la composición y/o que produce el compuesto y/o composición de la presente invención comprende una o más de las secuencias de nucleótidos de acuerdo con SEQ ID NO: 2 a 25, preferiblemente al menos SEQ ID NO: 22 y/o SEQ ID NO: 23.

El microorganismo puede ser un microorganismo natural existente o un microorganismo recombinante. Los microorganismos recombinantes pueden producirse por métodos conocidos por un experto en la técnica. Se puede producir un microorganismo recombinante transformando el microorganismo con al menos una de las secuencias de nucleótidos que codifican una proteína de las secuencias de aminoácidos de

acuerdo con SEQ ID NO: 26-49, preferiblemente al menos una de las secuencias de nucleótidos de SEQ ID NO: 2 a 25, preferiblemente al menos una de las secuencias de nucleótidos de SEQ ID NO: 22 y/o 23, o una secuencia de nucleótidos que  
5 tenga al menos un 90 %, preferiblemente al menos un 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, preferiblemente al menos un 99 % de identidad con la misma.

Preferiblemente, el microorganismo divulgado en el presente documento es una bacteria del género *Streptomyces*  
10 *sp.*, preferiblemente la bacteria es un *Streptomyces chrestomyceticus*. Preferiblemente, el compuesto comprende *Streptomyces sp.* Saigon413 depositado en el Instituto Westerdijk con el número de acceso CBS149411.

Preferiblemente, el microorganismo en la composición y/o  
15 que produce el compuesto y/o la composición y/o en el procedimiento tal como se divulga en el presente documento es un microorganismo que comprende una secuencia de nucleótidos, preferiblemente una secuencia de nucleótidos de ARN 16S, que tiene al menos 99.5 %, 99.6 %, 99.7 %, 99.8 %, 20 preferiblemente al menos 99.9 %, preferiblemente al menos 99.91 %, 99.92 %, 99.93 %, 99.94 %, 99.95 %, 99.96 %, 99.97 %, 99.98 %, 99.99 % o tiene 100 % de identidad con la secuencia nucleotídica de acuerdo con SEQ ID NO: 1.

Preferiblemente, el microorganismo en la composición o  
25 en el procedimiento de acuerdo con la presente invención, por

ejemplo un *Streptomyces chrestomyceticus*, comprende una secuencia genómica que tiene al menos 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o al menos 99 % de identidad con el genoma completo de *Streptomyces chrestomyceticus* NRRL-3672 o  
5 con el genoma completo de *Streptomyces sp.* Saigon413 depositado en el Instituto Westerdijk con el número de acceso CBS149411. En una realización, la composición o procedimiento de acuerdo con la presente invención comprende un *Streptomyces chrestomyceticus* que es *Streptomyces sp.*  
10 Saigon413 depositado en el Instituto Westerdijk con el número de registro CBS149411.

En el presente documento, los términos "porcentaje de identidad" y "porcentaje de coincidencia" se refieren a la relación entre dos o más secuencias de nucleótidos o  
15 aminoácidos, que puede calcularse (i) comparando dos secuencias óptimamente alineadas en un intervalo de comparación, (ii) determinar el número de posiciones en las que la base de ácido nucleico idéntico (para secuencias de nucleótidos) o residuo de aminoácido (para proteínas) se  
20 produce en ambas secuencias para obtener el número de posiciones coincidentes, (iii) dividir el número de posiciones coincidentes por el número total de posiciones en la ventana de comparación, y luego (iv) multiplicar este cociente por 100 por ciento para obtener el porcentaje de  
25 identidad. Si el "porcentaje de identidad" se calcula en

relación con una secuencia de referencia sin especificar una ventana de comparación concreta, el porcentaje de identidad se determina dividiendo el número de posiciones coincidentes en la región de alineación por la longitud total de la secuencia de referencia. Por consiguiente, a los efectos de la presente invención, cuando dos secuencias (la de consulta y la del sujeto) se alinean de forma óptima (teniendo en cuenta las lagunas en su alineación), el "porcentaje de identidad" de la secuencia de consulta es igual al número de posiciones idénticas entre las dos secuencias dividido por el número total de posiciones de la secuencia de consulta a lo largo de su longitud (o una ventana de comparación), que se multiplica por 100 por ciento. El porcentaje de identidad suele calcularse sobre toda la longitud de la secuencia de nucleótidos o aminoácidos.

La presente invención también se refiere a una composición que comprende el compuesto de polieno de la presente invención y un microorganismo como se define en el presente documento. El microorganismo es capaz de producir el compuesto polieno. La composición divulgada en el presente documento es una composición no natural.

Preferiblemente, el compuesto y/o composición de acuerdo con la presente invención tiene o presenta actividad fungicida. En consecuencia, el compuesto y/o composición de

acuerdo con la presente invención es preferiblemente un fungicida o compuesto fungicida o composición fungicida.

El término «compuesto o composición que tiene actividad fungicida» o «fungicida», tal como se utiliza en el presente documento, significa un compuesto o composición que controla, modifica o evita el crecimiento de hongos. El término "cantidad fungicidamente eficaz" significa la cantidad de un compuesto o composición o combinación de compuestos capaces de producir un efecto sobre el crecimiento de los hongos. Los efectos de control o modificación incluyen todas las desviaciones del desarrollo natural, tales como la muerte, el retraso y similares, y la prevención incluye la formación de barreras u otras defensas en o sobre una planta para evitar la infección fúngica.

El compuesto y/o la composición de acuerdo con la presente invención puede producirse de cualquier manera adecuada, preferiblemente el compuesto y/o la composición de la invención se produce cultivando el microorganismo como se define en el presente documento en un medio de fermentación adecuado que permita producir el compuesto y/o la composición de la presente invención. Una composición que comprende un compuesto de acuerdo con la presente invención puede ser un caldo de fermentación, preferiblemente un caldo de fermentación producido por un procedimiento de acuerdo con la presente invención.

El compuesto de la presente invención, o una composición que comprende el compuesto de la presente invención puede usarse en el sector agrícola y campos de uso relacionados, por ejemplo, como principios activos para el control de microorganismos fitopatógenos. El compuesto de acuerdo con la presente invención se distingue por una excelente actividad a tasas bajas de aplicación tales como de 2 a 250 ppm, por ejemplo desde 10 a 200 ppm, por ejemplo de 20 a 100 ppm, por ser bien tolerado por las plantas y por ser seguro al medioambiente. Tiene propiedades preventivas muy útiles y puede usarse para proteger numerosas plantas. El compuesto de la presente invención puede usarse para inhibir o destruir microorganismos fitopatógenos que se encuentran en plantas o partes de plantas (frutos, flores, hojas, tallos, tubérculos, raíces) o diferentes cultivos de plantas. El compuesto también puede proteger aquellas partes de las plantas que crecen más tarde.

El compuesto de acuerdo con la presente invención y/o una composición que comprende el compuesto de acuerdo con la presente invención puede usarse como tal o formularse con un auxiliar, preferiblemente un auxiliar agrícolamente aceptable. Las formulaciones conocidas en la técnica son, por ejemplo, concentradores emulsionables, pastas revestibles, disoluciones o suspensiones pulverizables o diluibles, polvos, polvos, granulados y encapsulaciones.

Por consiguiente, en una realización, una composición que comprende un compuesto de acuerdo con la presente invención tal como se divulga en el presente documento comprende además un auxiliar. Preferiblemente, el auxiliar es  
5 un auxiliar aceptable desde el punto de vista agrícola.

Auxiliares adecuados son conocidos en la técnica, e incluyen, por ejemplo, disolventes, portadores líquidos, portadores sólidos o cargas, tensioactivos, dispersantes, emulsionantes, humectantes, adyuvantes, solubilizantes,  
10 potenciadores de la penetración, coloides protectores, agentes de adhesión, espesantes, humectantes, repelentes, atrayentes, estimulantes de la alimentación, compatibilizantes, bactericidas, agentes anticongelantes, agentes antiespumantes, colorantes, adhesivos y  
15 aglutinantes..

Los disolventes y portadores líquidos adecuados incluyen, por ejemplo, agua, disolventes orgánicos, aceites de origen vegetal o animal, hidrocarburos cíclicos y aromáticos, alcoholes, ésteres, ácidos grasos, un glicol o  
20 cualquier otro vehículo líquido adecuado conocido en la técnica. El disolvente o portador líquido puede ser agua o DMSO (dimetilsulfóxido).

Los portadores sólidos adecuados incluyen, por ejemplo, talco, dióxido de titanio, arcilla pirofilítica, sílice,  
25 arcilla atapulgítica, kieselguhr, tiza, tierra de diatomeas,

cal, carbonato de calcio, arcilla bentonítica, tierra de batán, cáscaras de semillas de algodón, harina de trigo, harina de soja, pumita, harina de madera, harina de cáscara de nuez y lignina.

5           Un adyuvante puede ser un agente tensioactivo, un inhibidor de la cristalización, un modificador de la viscosidad, agentes de suspensión, modificadores de las gotitas de pulverización, pigmentos, antioxidantes, agentes espumantes, agentes antiespumantes, agentes fotobloqueantes,  
10           agentes compatibilizantes, agentes secuestrantes, agentes neutralizantes y amortiguadores, inhibidores de corrosión, colorantes, odorantes, agentes esparcidores, coadyuvantes de penetración, micronutrientes, emolientes, lubricantes y agentes adherentes.

15           Una composición tal como se divulga en el presente documento es preferiblemente una composición agrícolamente aceptable.

          Una composición que comprende un compuesto de acuerdo con la presente invención tal como se divulga en el presente  
20           documento normalmente comprende del 0.5 al 95 % p/p de principio activo tal como del 1 % al 90 % p/p, tal como del 2 al 80 % p/p, tal como del 5 al 60 % p/p. El compuesto de acuerdo con la presente invención puede ser el único principio activo en una composición tal como se divulga en el  
25           presente documento. En una realización, una composición que

comprende un compuesto de la presente invención comprende además al menos un principio activo adicional. Un principio activo tal como se define en el presente documento tiene actividad fungicida y/o insecticida y/o herbicida o tiene  
5 actividad como regulador del crecimiento de las plantas. Un compuesto o una composición de la presente invención puede mezclarse con uno o más ingredientes adicionales que tengan actividad pesticida tales como fungicidas, insecticidas, herbicidas, bactericidas, acaricidas, nematocidas y/o el  
10 ingrediente adicional comprende reguladores del crecimiento de las plantas cuando sea apropiado. Los agentes pesticidas se mencionan en el presente documento usando su nombre común y se describen, por ejemplo, en "The Pesticide Manual", 19.<sup>a</sup> Ed., British Crop Protection Council, 2021.

15 Un ingrediente adicional que tiene actividad pesticida, por ejemplo fungicida, puede dar lugar a una actividad sinérgica inesperada. Los ingredientes adicionales que tiene actividad pesticida y / o que es un regulador del crecimiento de las plantas se pueden combinar con una composición de la  
20 invención y se utiliza en un método de la invención y se aplica simultáneamente o secuencialmente con una composición de la invención. Cuando se aplican simultáneamente, estos ingredientes adicionales pueden formularse junto con las composiciones de la invención o mezclarse, por ejemplo, en un  
25 tanque de pulverización. Como alternativa a la mezcla directa

de estos ingredientes adicionales que tiene actividad  
pesticida, los componentes pueden usarse en aplicaciones  
fungicidas, insecticidas o herbicidas separadas como parte de  
un programa de control de hongos, insectos o hierbas  
5 extendido a lo largo de una parte o la totalidad de una  
temporada de cultivo.

Al menos un ingrediente adicional que tiene actividad  
pesticida y/o que es un regulador del crecimiento vegetal  
puede ser cualquier fungicida, insecticida, herbicida y/o  
10 regulador del crecimiento vegetal conocido. Al menos un  
ingrediente adicional que tiene actividad pesticida y/o  
reguladora del crecimiento vegetal puede ser de origen  
químico o biológico, por ejemplo de origen vegetal o  
microbiano. Al menos un ingrediente adicional que tiene  
15 actividad pesticida en una composición como la divulgada en  
el presente documento puede ser producido por el  
microorganismo divulgado en el presente documento que es  
capaz de producir el compuesto de polieno de acuerdo con la  
presente invención como se divulga en el presente documento.

20 Además, las composiciones de la invención también pueden  
aplicarse con uno o más inductores de resistencia adquirida  
sistémicamente (inductor «SAR»). Los inductores de SAR se  
conocen y describen, por ejemplo, en la patente  
estadounidense n.º US 6,919,298 e incluyen, por ejemplo,

salicilatos y el inductor comercial de SAR acibenzolar-S-metilo.

El compuesto y/o composición de acuerdo con la presente invención puede inducir resistencia de una planta mediante un  
5 mecanismo de cebado. El preacondicionamiento que conduce a un estado fisiológico que permite a las plantas responder más rápidamente y/o de forma más robusta tras la exposición a estrés biótico o abiótico, como se describe, por ejemplo, en el artículo de revisión: P. Aranega-Bou et. al. Priming of  
10 plant resistance by natural compounds. Hexanoic acid as a model. Front. Plant. Sci. 1 de octubre de 2014.

En una realización, la composición de acuerdo con la presente invención comprende además ciclotiazomicina C, estreptimidona y/o malonomicina. La estructura de la  
15 ciclotiazomicina C se divulga en la p. 3 de WO2015191789 y se puede producir como se divulga en el Ejemplo 4 de WO2015/191789. La malonomicina se puede producir como se divulga en el Ejemplo I del documento WO2006/078939. La malonomicina también está indicada como antibiótico K16, o  
20 malomicina. La estreptimidona puede sintetizarse siguiendo el método divulgado en Kondo, H., Oritani, T., y Kiyota, H. Synthesis and antifungal activity of the four stereoisomers of streptimidone, a glutarimide antibiotic from Streptomyces rimosus forma paromomycinus. Eur. J. Org. Chem. (20), 3459-  
25 3462 (2000). La estreptimidona también puede adquirirse a un

proveedor comercial (CAS:738-72-7). En una realización, los principios activos ciclotiazomicina C, estreptimidona y/o malonomicina son producidos por el microorganismo que puede producir el compuesto de acuerdo con la Fórmula (I) de  
5 acuerdo con la presente invención tal como se define en el presente documento anteriormente.

Una composición que comprende una mezcla del compuesto de la invención y al menos un principio activo adicional es preferiblemente en una relación de mezcla de desde 100:1  
10 hasta 1:6000, especialmente de 50:1 a 1:50, más especialmente, en una relación de mezcla de 20:1 a 1:20, aún más especialmente, en una relación de mezcla de 10:1 a 1:10, muy especialmente, de 5:1 y 1:5, haciéndose especial referencia a una relación de 2:1 a 1:2 y prefiriéndose  
15 igualmente una relación de 4:1 a 2:1, por encima de todo, en una relación de 1:1, o 5:1, o 5:2, o 5:3, o 5:4, o 4:1, o 4:2, o 4:3, o 3:1, o 3:2, o 2:1, o 1:5, o 2:5, o 3:5, o 4:5, o 1:4, o 2:4, o 3:4, o 1:3, o 2:3, o 1:2, o 1:600, o 1:300, o 1:150, o 1:35, o 2:35, o 4:35, o 1:75, o 2:75, o 4:75, o  
20 1:6000, o 1:3000, o 1:1500, o 1:350, o 2:350, o 4:350, o 1:750, o 2:750, o 4:750. Esas relaciones de mezcla son en peso. Las mezclas descritas anteriormente pueden usarse en un método de control de plagas, que comprende la aplicación de una composición que comprende una mezcla como la descrita  
25 anteriormente a las plagas o a su entorno, con excepción de

un método para el tratamiento del cuerpo humano o animal mediante cirugía o terapia y métodos de diagnóstico practicados en el cuerpo humano o animal.

Una composición que comprende una mezcla del compuesto de  
5 la invención y uno o más principios activos como se describió  
anteriormente se puede aplicar, por ejemplo, en una forma  
única de "mezcla preparada", en una mezcla de pulverización  
combinada compuesta por formulaciones separadas de los  
componentes de principio activo individuales, tal como una  
10 "mezcla en tanque", y en un uso combinado de los principios  
activos individuales cuando se aplica de manera secuencial,  
es decir, uno después del otro con un período razonablemente  
corto, tal como unas pocas horas o días.

En un aspecto, la presente invención se refiere a un  
15 procedimiento para producir el compuesto de acuerdo con la  
presente invención que comprende cultivar el microorganismo  
como se divulga en el presente documento en un medio de  
fermentación adecuado en condiciones que permitan la  
producción del compuesto. El microorganismo que se cultiva en  
20 un procedimiento como el divulgado en el presente documento  
es un microorganismo capaz de producir el compuesto de  
acuerdo con la presente invención y se describe con más  
detalle en el presente documento. Las expresiones "cultivar o  
cultivo" y "fermentar o fermentación" se utilizan  
25 indistintamente en el presente documento.

Un experto en la técnica conoce el cultivo de un microorganismo para producir el compuesto de acuerdo con la presente invención en un medio de fermentación adecuado. El microorganismo puede fermentarse en condiciones aeróbicas o  
5 anaeróbicas. Un microorganismo perteneciente a *Streptomyces* *sp.* habitualmente se cultiva en condiciones aeróbicas. Un medio de fermentación adecuado comprende nutrientes, tal como una fuente de carbono adecuada tal como glucosa, y una fuente de nitrógeno adecuada, por ejemplo péptidos, aminoácidos o  
10 amoníaco.

En una realización, el procedimiento comprende además producir una composición que comprende el compuesto de acuerdo con la presente invención como se define en el presente documento y un microorganismo capaz de producir el  
15 compuesto de acuerdo con la presente invención. Un microorganismo capaz de producir el compuesto de acuerdo con la presente invención se define anteriormente en el presente documento. Un microorganismo capaz de producir el compuesto de acuerdo con la presente invención puede ser capaz de  
20 producir otros principios activos según se definen en el presente documento, por ejemplo ciclotiazomicina C, estreptimidona y/o malonomicina.

El procedimiento de acuerdo con la presente invención puede comprender además un paso de recuperación del compuesto  
25 de acuerdo con la presente invención o una sal del mismo. El

compuesto de acuerdo con la presente invención puede recuperarse mediante métodos adecuados conocidos en la técnica, por ejemplo mediante cristalización o cromatografía, por ejemplo HPLC. La recuperación del compuesto de acuerdo  
5 con la presente invención puede comprender además un paso de purificación del compuesto.

El procedimiento para producir un compuesto de acuerdo con la presente invención puede comprender además un paso de formular el compuesto en una formulación o composición  
10 adecuada como se define anteriormente en el presente documento.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un método para controlar o evitar la infestación de una planta, material de propagación de plantas y/o cultivos  
15 alimentarios cosechados por un microorganismo fitopatógeno, mediante el tratamiento de la planta, material de propagación de plantas y/o cultivos alimentarios cosechados, en el que una cantidad eficaz del compuesto o una composición de acuerdo con la presente invención se aplica a la planta, a  
20 una parte de la misma o a un emplazamiento de la misma, al material de propagación de plantas y/o a cultivos alimentarios cosechados.

Aplicar una cantidad eficaz del compuesto o composición de la invención en un método para controlar o evitar la  
25 inversión de una planta comprende aplicar de desde 0.01 g

hasta 5 kg del compuesto de la invención (principio activo (a.i.) por hectárea (ha), preferiblemente desde 0.015 g hasta 500 g de a.i./ha, preferiblemente desde 0.020 g hasta 100 g de a.i./ha, preferiblemente desde 0.025 g hasta 50 g de a.i./ha, preferiblemente desde 0.030 g hasta 5 g de a.i./ha, 5 , preferiblemente desde 0.035 g hasta 500 mg de a.i./ha.

Cuando el compuesto de la invención o la composición de la presente invención se utiliza para tratar semillas, generalmente son suficientes tasas de 0.0001 a 10 g del 10 compuesto de la invención por kg de semilla, tal como de 0.0002 a 0.1 g por kg de semilla, tal como de 0.0005 a 0.001 g por kg de semilla.

De manera adecuada, un compuesto o una composición de la invención se aplica de forma preventiva, es decir, antes del 15 desarrollo de la enfermedad, o curativa, es decir, después del desarrollo de la enfermedad.

Los microorganismos fitopatógenos que se ven afectados por el compuesto de la invención son hongos y vectores fúngicos de enfermedades, así como bacterias y virus 20 fitopatógenos. Los microorganismos fitopatógenos en un método de acuerdo con la presente invención incluyen los siguientes hongos y vectores fúngicos de enfermedades y bacterias fitopatógenas:

*Absidia corymbifera*, *Albugo candida*, *Alternaria spp.* 25 incluyendo *A. solani*, *Aphanomyces spp*, *Ascochyta spp*,

*Aspergillus* spp. incluyendo *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. nidulans*, *A. niger*, *A. terreus*, *Aureobasidium* spp. incluyendo *A. pullulans*, *Bacillus subtilis*, *Blastomyces dermatitidis*, *Blumeria graminis*, *Blumeriella jaapii*, *Botryosphaeria* spp.  
 5 incluyendo *B. dothidea*, *B. obtusa*, *Botrytis* spp. incluyendo *B. cinerea*, *Bremia lactucae*, *Cadophora gregata*, *Candida* spp. incluyendo *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. lusitaniae*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *Cephaloascus fragrans*, *Ceratocystis* spp, *Cercospora* spp. incluyendo *C.*  
 10 *arachidicola*, *C. beticola*, *C. kikuchii*, *C. sojae*, *Cercosporidium personatum*, *Cladosporium* spp, *Clariireedia homoeocarpa*, *Clavibacter* spp, *Claviceps purpurea*, *Coccidioides immitis*, *Cochliobolus* spp, *Colletotrichum* spp. incluyendo *C. dematium*, *C. lindemuthianum*, *C. musae*, *C.*  
 15 *orbiculare*, *C. truncatum*, *Corynespora cassiicola*, *Cryptococcus neoformans*, *Diaporthe* spp, *Dickeya zeae*, *Didymella* spp, *Drechslera* spp, *Elsinoe* spp, *Epidermophyton* spp, *Eremothecium gossypii*, *Erwinia* spp. incluyendo *E. amylovora*, *E. carotovora*, *Erysiphe* spp. incluyendo *E. cichoracearum*, *E.*  
 20 *necator*, *Eutypa lata*, *Fusarium* spp. incluyendo *F. culmorum*, *F. graminearum*, *F. langsethiae*, *F. moniliforme*, *F. oxysporum*, *F. poae*, *F. proliferatum*, *F. pseudograminearum*, *F. sacchari*, *F. sambucinum*, *F. subglutinans*, *F. solani*, *F. sporotrichioides*, *F. tricinctum*, *F. virguliforme*,  
 25 *Gaeumannomyces graminis*, *Gibberella* spp. incluyendo *G.*

avenacea, *G. fujikuroi*, *G. intricans*, *G. moniliiformis*, *G. zeae*, *Gloeodes pomigena*, *Gloeosporium musarum*, *Glomerella cingulate*, *Golovinomyces cichoracearum*, *Gymnosporangium juniperi-virginianae*, *Guignardia bidwellii*, *Gymnosporangium*  
 5 *juniperi-virginianae*, *Helminthosporium spp*, *Hemileia spp*, *Histoplasma spp.* incluyendo *H. capsulatum*, *Hyaloperonospora parasitica*, *Kabatiella zeae*, *Laetisaria fuciformis*, *Leptographium lundbergii*, *Leveillula taurica*, *Lophodermium seditiosum*, *Microdochium majus*, *Microdochium nivale*,  
 10 *Microsporum spp*, *Monilinia spp.* incluyendo *M. fructicola*, *Monographella spp* incluyendo *M. nivalis*, *Mucor spp*, *Mycosphaerella spp.* incluyendo *M. arachidis*, *M. fijiensis*, *M. graminicola*, *M. pomi*, *Nakataea oryzae*, *Neopseudocercospora spp*, *Oculimacula spp*, *Oncobasidium theobromaeon*, *Ophiostoma*  
 15 *spp*, *Pantoea stewartia*, *Paracoccidioides spp*, *Parastagonospora nodorum*, *Pectobacterium spp*, *Penicillium spp.* incluyendo *P. digitatum*, *P. italicum*, *Petriellidium spp*, *Peronosclerospora spp.* incluyendo *P. maydis*, *P. philippinensis* y *P. sorghi*, *Peronospora spp* incluyendo *P.*  
 20 *destructor*, *Phaeosphaeria nodorum*, *Phakopsora pachyrhizi*, *Phellinus igniarius*, *Phialophora spp*, *Phlyctema vagabunda*, *Phoma spp*, *Phomopsis viticola*, *Phyllachora pomigena*, *Phyllosticta spp*, *Physoderma maydis*, *Phytophthora spp.* incluyendo *P. capsica*, *P. infestans*, *Plasmodiophora*  
 25 *brassicae*, *Plasmopara spp.* incluyendo *P. halstedii*, *P.*

*viticola*, *Plenodomus* spp, *Pleospora* spp., *Podosphaera* spp.  
 incluyendo *P. leucotricha*, *Polymyxa graminis*, *Polymyxa betae*,  
*Pseudocercospora fijiensis*, *Pseudocercosporella*  
*herpotrichoides*, *Pseudomonas* spp. incluyendo *P. syringae*,  
 5 *Pseudoperonospora* spp. incluyendo *P. cubensis*, *P. humuli*,  
*Pseudopeziza tracheiphila*, *Pseudopyrenochaeta lycopersici*,  
*Puccinia* spp. incluyendo *P. hordei*, *P. recondita*, *P.*  
*striiformis*, *P. triticina*, *Pyrenopeziza* spp, *Pyrenophora* spp,  
*Pyricularia* spp. incluyendo *P. oryzae*, *Pythium* spp.  
 10 incluyendo *P. ultimum*, *Ralstonia solanacearum*, *Ramularia* spp,  
*Rathayibacter* spp, *Remotididymella destructiva*, *Rhizoctonia*  
*spp*, *Rhizomucor pusillus*, *Rhizopus arrhizus*, *Rhynchosporium*  
*spp*, *Robbsia andropogonis*, *Sarocladium oryzae*, *Scedosporium*  
*spp.* incluyendo *S. apiospermum* y *S. prolificans*,  
 15 *Schizothyrium pomi*, *Sclerophthora macrospora*, *Sclerotinia*  
*spp.* incluyendo *S. sclerotiorum*, *Sclerotium* spp, *Septoria*  
*spp*, incluyendo *S. nodorum*, *S. tritici*, *Setosphaeria turcica*,  
*Sphaerotheca macularis*, *Sphaerotheca fusca* (*Sphaerotheca*  
*fuliginea*), *Spiroplasma kunkelii*, *Sporothrix* spp,  
 20 *Stagonospora nodorum*, *Stagonosporopsis cucurbitacearum*,  
*Stemphylium* spp, *Stenocarpella macrospora*, *Stereum hirsutum*,  
*Streptomyces* spp, *Thanatephorus cucumeris*, *Thielaviopsis*  
*basicola*, *Tilletia* spp, *Tranzschelia discolor*, *Trichoderma*  
*spp.* incluyendo *T. harzianum*, *T. pseudokoningii*, *T. viride*,  
 25 *Trichophyton* spp, *Typhula* spp, *Uncinula necator*, *Urocystis*

*spp*, *Uromyces spp*, *Ustilago spp*, *Venturia spp*. incluyendo *V. inaequalis*, *Verticillium spp*, *Wilsonomyces carpophilus*, o *Xanthomonas spp*, incluyendo *X. oryzae* y *X. campestris*, *Xylella spp*, *Zymoseptoria tritici*.

5        Los microorganismos fitopatógenos que resultan sorprendentemente afectados por el compuesto de acuerdo con la presente invención son hongos, preferiblemente hongos pertenecientes a *Botrytis sp.*, *Colletotrichum sp.* *Fusarium sp.*, *Microdochium sp.*, *Mycosphaerella sp.*, *Pythium sp.*,  
10 *Rhizoctonia sp.*, o *Sclerotinia sp.*, *Zymoseptoria*, preferiblemente hongos pertenecientes a *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*), *Colletotrichum orbiculare* (*Colletotrichum lagenarium*), *Fusarium culmorum*, *Microdochium nivale*, *Mycosphaerella arachidis* (*Cercospora arachidicola*),  
15 *Pythium ultimum*, *Rhizoctonia solani*, o *Sclerotinia sclerotiorum*, *Zymospetoria tritici*.

Controlar o evitar significa reducir la infestación por microorganismos fitopatógenos, especialmente hongos, a un nivel tal que se demuestre una mejora.

20        Un método preferente para controlar o evitar una infestación de plantas de cultivo por microorganismos fitopatógenos, especialmente hongos o insectos, comprende la aplicación foliar del compuesto o composición de acuerdo con la presente invención. La frecuencia de aplicación y la tasa  
25 de aplicación dependerán del riesgo de infestación por parte

del patógeno o insecto correspondiente. Sin embargo, el compuesto o composición de acuerdo con la presente invención también puede penetrar en la planta a través de las raíces mediante la tierra (acción sistémica) empapando el emplazamiento de la planta con una formulación líquida o aplicando los compuestos en forma sólida a la tierra, por ejemplo, en forma granular (aplicación en la tierra). En los cultivos de arroz de agua, tales granulados pueden aplicarse al campo de arroz inundado. El compuesto o composición de acuerdo con la presente invención también se puede aplicar a las semillas (recubrimiento) impregnando las semillas o los tubérculos con una formulación líquida del fungicida o recubriéndolos con una formulación sólida.

También es posible usar el compuesto o composición de acuerdo con la presente invención como agente de revestimiento para el tratamiento de material de propagación vegetal, por ejemplo, semillas, tales como frutos, tubérculos o granos, o esquejes vegetales, para protegerlo contra infecciones fúngicas, así como también contra hongos fitopatógenos presentes en el suelo. El material de propagación puede tratarse con un compuesto y/o una composición de acuerdo con la presente invención antes de plantar: las semillas, por ejemplo, se pueden recubrir antes de sembrarlas. El compuesto y/o composición de acuerdo con la presente invención también se puede aplicar a granos

(revestimiento), ya sea impregnando las semillas en una formulación líquida o revistiéndolas con una formulación sólida. La composición también puede aplicarse al sitio de siembra cuando se está plantando el material de propagación, por ejemplo, al surco de la semilla durante la siembra. Se divulgan en el presente documento tales métodos de tratamiento del material de propagación vegetal y al material de propagación vegetal tratado de esta manera.

El término "emplazamiento", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a campos en o sobre los cuales crecen las plantas, o donde se siembran semillas de plantas cultivadas o donde se colocarán semillas en el suelo. Incluye la tierra, las semillas y las plántulas, así como la vegetación establecida.

El término "plantas" se refiere a todas las partes físicas de una planta, incluyendo las semillas, plántulas, árboles jóvenes, raíces, tubérculos, tallos, espigas, follaje y frutos. También pueden mencionarse las plantas germinadas y las plantas jóvenes que vayan a trasplantarse tras la germinación o tras emerger del suelo. Estas plantas jóvenes pueden protegerse antes de trasplantarlas mediante un tratamiento total o parcial por inmersión.

Se entiende que la expresión "material de propagación vegetal" denota partes generativas de la planta, tales como semillas, que se pueden utilizar para la multiplicación de

estas últimas, y material vegetativo, tal como esquejes o tubérculos (por ejemplo, papas), raíces, frutos, bulbos, rizomas o partes de plantas.

El término plantas implica "plantas útiles" o  
5 "cultivos". La expresión "plantas útiles" y "cultivos" se usan de manera intercambiable en el presente documento. Las "Plantas útiles" y "cultivos" comprenden cultivos perennes y anuales, tales como plantas de bayas, por ejemplo, moras, arándanos, arándanos rojos, frambuesas y fresas; cereales,  
10 por ejemplo, cebada, maíz (mazorca), mijo, avena, arroz, centeno, sorgo, triticale y trigo; plantas de fibra, por ejemplo, algodón, lino, cáñamo, yute y sisal; cultivos de campo, por ejemplo, azúcar y remolacha forrajera, café, lúpulo, mostaza, colza oleaginosa (canola), amapola, caña de  
15 azúcar, girasol, té y tabaco; árboles frutales, por ejemplo, manzana, albaricoque, aguacate, plátano, cereza, cítricos, nectarina, melocotón, pera y ciruela; hierbas, por ejemplo, pasto Bermuda, pasto azul, agrostis, hierba ciempiés, festuca, raigrás, hierba de San Agustín y hierba de Zoysia;  
20 hierbas como albahaca, borraja, cebollino, cilantro, lavanda, levístico, menta, orégano, perejil, romero, salvia y tomillo; legumbres, por ejemplo, frijoles, lentejas, chicharos y soya; nueces, por ejemplo, almendra, anacardo, cacahuete, avellana, maní, pacana, pistacho y nuez; palmas, por ejemplo,  
25 palma aceitera; ornamentales, por ejemplo, flores, arbustos y

árboles; otros árboles, por ejemplo, cacao, coco, oliva y  
caucho; verduras, por ejemplo, espárragos, berenjena,  
brócoli, repollo, zanahoria, pepino, ajo, lechuga, médula,  
melón, quimbombó, cebolla, pimiento, papa, calabaza,  
5 ruibarbo, espinacas y tomate; y vides, por ejemplo, uvas. El  
término "plantas" también incluye los cultivos leñosos, tales  
como pinos o las plantas leñosas.

Debe entenderse que la expresión "'plantas útiles'"  
incluye también plantas útiles que se han hecho tolerantes a  
10 herbicidas como el bromoxinil o clases de herbicidas (tales  
como, por ejemplo, inhibidores de HPPD, inhibidores de ALS,  
por ejemplo, primisulfurón, prosulfurón y trifloxisulfurón,  
EPSPS (inhibidores de la 5-enol-pirovil-shikimato-3-fosfato-  
sintetasa), inhibidores de la GS (glutamina sintetasa) o  
15 inhibidores de la PPO (protoporfirinógeno-oxidasa)) como  
resultado de métodos convencionales de fitomejoramiento o  
ingeniería genética.

Debe entenderse que el término "plantas útiles" incluye  
también a las plantas útiles que han sido transformadas  
20 mediante el uso de técnicas de ADN recombinante de tal manera  
que son capaces de sintetizar una o más toxinas de acción  
selectiva, tal como se conoce, por ejemplo, a partir de  
bacterias productoras de toxinas, especialmente las del  
género Bacillus.

Cualquier planta, material de propagación de plantas o cultivo alimentario adecuado puede tratarse con un método de acuerdo con la presente invención tal como se define en el presente documento. Preferiblemente, la planta, el material  
5 de reproducción vegetal o el cultivo alimentario comprende o es patata, tomate, uva, colza, cucurbitáceas, cacahuete, trigo o cebada, preferiblemente trigo, cebada, maíz, arroz, soja y plátano.

En otro aspecto la invención se refiere al uso de un  
10 compuesto o una composición de acuerdo con la presente invención como pesticida, preferiblemente como fungicida, inductor de SAR y/o como agente de imprimación. Las características relacionadas con el compuesto y la composición de acuerdo con la presente invención son tal como  
15 se divulgan anteriormente en el presente documento. Por consiguiente, la presente invención se refiere a un método para usar un compuesto y/o composición de acuerdo con la presente invención como un fungicida.

#### FIGURAS

20 **Figura 1.** Espectro de absorción de luz (UV-VIS) 200-500 nm de compuesto de polieno

**Figura 2:** Representación gráfica del grupo de genes biosintéticos para el compuesto de polieno de la presente invención

## EJEMPLOS

### 1. Fuente, fermentación y aislamiento del compuesto polieno

#### 1.1 Fermentación de *Streptomyces* sp.

Las especies de *Streptomyces* se ordenaron a partir de  
5 las colecciones de cultivos divulgadas en la Tabla 2.

*Streptomyces* sp. Saigon413 estuvo aislado en Vietnam  
antes de 1961. *Streptomyces* sp. Saigon413 se depositó en el  
instituto Westerdijk con el número de registro CBS149411. Se  
realizó el depósito por Syngenta Ltd., Jealott's Hill  
10 Research International Centre, Bracknell, Berkshire, RG42  
6EY, Reino Unido, según los términos del Tratado de Budapest  
sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de  
Microorganismos a los fines del Procedimiento en materia de  
Patentes.

15 Las especies de *Streptomyces* se cultivaron en matraces  
Erlenmeyer con un medio líquido que consiste en (g / l)  
hidrolizado de caseína 10, glucosa 40, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.25, soytone  
2, triptona, 8 y se incubaron a 28 °C en una incubadora  
agitando 150 rpm durante 25 mm durante 4 días.

#### 20 1.2 Aislamiento del ADNr 16S, secuenciación del genoma completo e identificación de especies

El ADN genómico se aisló de *Streptomyces* sp. Saigon413.  
usando el método descrito en Kutchma et al. (1998)  
Biotechniques 24(3):452-457. El gen 16S ARNr se amplificó  
25 usando cebadores universales 16S y se secuenció usando

secuenciación Sanger. El ARNr 16S de *Streptomyces* sp. Saigon413 se muestra en SEQ ID NO: 1.

La especie de cepa *Streptomyces* sp. Saigon413 se identificó comparando la secuencia de ARNr 16S de acuerdo con  
5 SEQ ID NO:1 con secuencias de ARNr 16S disponibles públicamente que se extrajeron utilizando el ensamblaje de secuencias de genomas completos de genomas de especies de *Streptomyces* (de acuerdo con The Genome Taxonomy Database GTDB (Parks, D.H., et al. (2021). GTDB: Nucleic Acids  
10 Research, 50: D785-D794) usando barrnap v0.9. Con base en este análisis comparativo *Streptomyces* sp. Saigon413 se identificó como una especie de *Streptomyces chrestomyceticus*. La identidad de secuencia entre la secuencia de ARNr 16S de *Streptomyces* sp. Saigon413 y el *S. chrestomyceticus* NRRL-3672  
15 disponible públicamente fue del 99.87 %, que se determinó utilizando Muscle v3.8.31 y el paquete R Seqinr v4.2-16.

La secuenciación de genoma completo, usando el ADN genómico de *Streptomyces* sp. Saigon413, se completó usando las tecnologías de secuenciación Pacific Biosciences e  
20 Illumina. Se ensambló el genoma usando HFAP4 y se pulió con Pilon usando las lecturas de Illumina. También se extrajo ADN genómico de *Streptomyces rimosus* CBS 492.64, *Streptomyces rimosus* CBS 570.66, *Streptomyces rimosus* CBS 569.66, *Streptomyces chrestomyceticus* DSM 41224, *Streptomyces rimosus*  
25 subsp. *rimosus* DSM 40673, y *Streptomyces rimosus* subsp.

*rimosus* DSM 41057 usando un método descrito en Kieser *et. al.*, (2000) Practical *Streptomyces* Genetics. La secuenciación del genoma completo de estas cepas se completó usando la tecnología Nanopore Sequencing y los genomas se ensamblaron con Flye (Kolmogorov, M., *et. al.*, (2019), Nature Biotechnology, 37, 540).

Tras el ensamblaje del genoma a partir de *Streptomyces* sp. Saigon 413 y genomas disponibles públicamente, se calculó la identidad nucleotídica media (ANI) entre *Streptomyces* sp. Saigon413 y cepas de *Streptomyces* estrechamente relacionadas usando fastANI (Jain, C., *et. al.* (2018), Nature Communications, 9, 5114) (Tabla 1). El mayor porcentaje de identidad (ANI) del genoma de *Streptomyces* sp. Saigon413 fue 96.9 % con el genoma de la cepa disponible públicamente *S. chrestomyceticus* NRRL B-3672.

Usando la identidad de secuencia de ARN S16 y la puntuación ANI (%), también se encontró que las cepas CBS 596.66, CBS570.66 y DSM 41429 eran cepas de *Streptomyces chrestomyceticus* y no una cepa de *Streptomyces rimosus* o *Streptomyces paromomycinus* como lo indica el instituto depositario.

En la Tabla 2, se muestra el porcentaje de identidad del genoma completo y de la secuencia 16SARN de varias especies de *Streptomyces* con la de *Streptomyces* sp. Saigon 413 y *S. chrestomyceticus* NRRL-B-3672.

### **1.3. Identificación del grupo de genes biosintéticos para la producción de compuestos de polieno en *Streptomyces* sp. Saigon413**

Se extrajo ADN genómico de *Streptomyces* sp. Saigon413.

5 La secuenciación del genoma completo se realizó con las tecnologías de secuenciación de Pacific Biosciences e Illumina. Para identificar los genes implicados en la producción del compuesto polieno de la presente invención, el genoma ensamblado se ejecutó AntiSMASH (versión 5.1.1, Blin  
10 et. al., "antiSMASH 5.0: actualizaciones del procedimiento de extracción de genomas de metabolitos secundarios" *Nucleic Acids Res* (2019) doi: 10.1093/nar/gkz310), una herramienta comúnmente usada para ayudar con la identificación de grupos de genes biosintéticos responsables de la producción de  
15 metabolitos secundarios.

Con la identificación de que el compuesto de la presente invención es un compuesto polieno (véase el [ Ejemplo 2]), y el resultado de AntiSMASH, pudimos deducir que el compuesto polieno es producido por un clúster génico modular de sintasa  
20 de policétido tipo I (PKS). La identificación de un clúster génico modular PKS de tipo I como responsable de la biosíntesis del compuesto polieno se basó en el análisis de clústeres génicos biosintéticos que se han relacionado con la producción de polienos caracterizados, tales como la filipina  
25 de *Streptomyces filipinensis*, anfotericina por *Streptomyces*

*nodosus* y *thailandins* A y B por *Actinokineospora bangkokensis* 44EHW. Within *Streptomyces* sp. Saigon413, se identificó un gran grupo de genes biosintéticos modulares de sintasa de policétidos de tipo I (véase la Figura 2) y, por tanto, se  
5 asoció con la producción de compuestos de polieno.

El conjunto de genes biosintéticos modulares tipo I PKS contiene 14 secuencias codificantes que incluyen ocho genes modulares tipo I PKS, un gen regulador y genes responsables de la biosíntesis de un precursor incorporado al compuesto  
10 polieno (Figure 2 y Table 1).

15

20

25

**Tabla 1:** Secuencias codificantes presentes en el grupo de genes biosintéticos PKS de tipo I responsables de la producción del compuesto de polieno de acuerdo con la presente invención. Las anotaciones proporcionadas se basan en una búsqueda pBLAST utilizando las secuencias de proteínas no redundantes de la base de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica.

| ID del gen           | ADN          | SEQ ID        |                     | Nota |
|----------------------|--------------|---------------|---------------------|------|
|                      |              | Proteína      | traducida           |      |
| CDS_11<br>(ctg1_921) | SEQ ID NO: 2 | SEQ ID NO: 26 | Transportador ABC   |      |
| CDS_12<br>(ctg1_922) | SEQ ID NO: 3 | SEQ ID NO: 27 | Función desconocida |      |
| CDS_13<br>(ctg1_923) | SEQ ID NO: 4 | SEQ ID NO: 28 | Función desconocida |      |
| CDS_14<br>(ctg1_924) | SEQ ID NO: 5 | SEQ ID NO: 29 | Tioesterasa         |      |
| CDS_15<br>(ctg1_925) | SEQ ID NO: 6 | SEQ ID NO: 30 | Función desconocida |      |
| CDS_16<br>(ctg1_926) | SEQ ID NO: 7 | SEQ ID NO: 31 | Histidina cinasa    |      |
| CDS_17<br>(ctg1_927) | SEQ ID NO: 8 | SEQ ID NO: 32 | Regulador tipo LuxR |      |

|    |                      |     |    |        |     |    |        |                                         |
|----|----------------------|-----|----|--------|-----|----|--------|-----------------------------------------|
|    | CDS_18<br>(ctg1_928) | SEQ | ID | NO: 9  | SEQ | ID | NO: 33 | Péptido sintetasa<br>no ribosomal       |
|    | CDS_19<br>(ctg1_929) | SEQ | ID | NO: 10 | SEQ | ID | NO: 34 | Poliquétido<br>sintasa                  |
| 5  | CDS_20<br>(ctg1_930) | SEQ | ID | NO: 11 | SEQ | ID | NO: 35 | Poliquétido<br>sintasa                  |
|    | CDS_21<br>(ctg1_931) | SEQ | ID | NO: 12 | SEQ | ID | NO: 36 | Proteína tipo FkbH                      |
|    | CDS_22<br>(ctg1_932) | SEQ | ID | NO: 13 | SEQ | ID | NO: 37 | Acil-CoA<br>deshidrogenasa              |
| 10 | CDS_23<br>(ctg1_933) | SEQ | ID | NO: 14 | SEQ | ID | NO: 38 | Proteína portadora<br>de acilo          |
|    | CDS_24<br>(ctg1_934) | SEQ | ID | NO: 15 | SEQ | ID | NO: 39 | 3-hidroxibutiril-<br>CoA deshidrogenasa |
| 15 | CDS_25<br>(ctg1_935) | SEQ | ID | NO: 16 | SEQ | ID | NO: 40 | Péptido sintetasa<br>no ribosomal       |
|    | CDS_26<br>(ctg1_936) | SEQ | ID | NO: 17 | SEQ | ID | NO: 41 | Función<br>desconocida                  |
|    | CDS_27<br>(ctg1_937) | SEQ | ID | NO: 18 | SEQ | ID | NO: 42 | Poliquétido<br>sintasa                  |
| 20 | CDS_28<br>(ctg1_938) | SEQ | ID | NO: 19 | SEQ | ID | NO: 43 | Poliquétido<br>sintasa                  |
|    | CDS_29<br>(ctg1_939) | SEQ | ID | NO: 20 | SEQ | ID | NO: 44 | Poliquétido<br>sintasa                  |
| 25 | CDS_30               | SEQ | ID | NO: 20 | SEQ | ID | NO: 45 | Poliquétido                             |

|   |            |     |    |         |    |     |                       |
|---|------------|-----|----|---------|----|-----|-----------------------|
|   | (ctg1_940) | 21  |    |         |    |     | sintasa               |
|   | CDS_31     | SEQ | ID | NO:SEQ  | ID | NO: | 46 Poliquétido        |
|   | (ctg1_941) | 22  |    |         |    |     | sintasa               |
|   | CDS_32     | SEQ | ID | NO:SEQ  | ID | NO: | 47 Poliquétido        |
| 5 | (ctg1_942) | 23  |    |         |    |     | sintasa               |
|   | CDS_33     | SEQ | ID | NO:SEQ  | ID | NO: | 48 Función            |
|   | (ctg1_943) | 24  |    |         |    |     | desconocida           |
|   | CDS_43     | SEQ | ID | NO: SEQ | ID | NO: | 49 O-metiltransferasa |
|   | (ctg1_944) | 25  |    |         |    |     |                       |

10

#### **1.4. Delección de región genómica que incluye CDS\_31 (SEQ ID NO: 22) y CDS\_32 (SEQ ID NO: 23) de *Streptomyces* sp. Saigon413 y análisis fenotípico**

Para confirmar que el conjunto de genes biosintéticos  
 15 identificado estaba asociado con la producción del compuesto  
 de polieno de la presente invención, se identificó una región  
 que contenía dos genes de sintasa de policétido codificados  
 por CDS\_31 y CDS\_32 (SEQ ID NO: 22 y SEQ ID NO: 23) se  
 eliminó de *Streptomyces* sp. Saigon413. Para generar  
 20 *Streptomyces* sp. Saigon413 $\Delta$ 941-942, se utilizó el plásmido  
 p073-031. El plásmido p073-031 se preparó a partir de pRAR017  
 y contenía regiones de homología a cada lado de la región que  
 se va a eliminar de la cepa (lo que facilita los cruces  
 primarios y secundarios).

25

El plásmido p073-031 se utilizó para transformar *E. coli* ET12567/pUZ8002 utilizando un método de electroporación estándar, y luego se introdujo en *Streptomyces* sp. Saigon413 por conjugación micelial (T. Kieser et. al., Practical  
5 *Streptomyces* Genetics, 2000, John Innes Foundation, Norwich). Las colonias resistentes a tioestreptona se parchearon en medio de agar ISP-4 suplementado con 40 µg/ml de tioestreptona y 25 µg/ml de ácido nalidíxico. Estos parches se incubaron inicialmente durante 6 días a 28 °C permitiendo  
10 la replicación de plásmido. Después de 6 días a 28 °C, las cepas se volvieron a parchar en medio de agar ISP-4 suplementado con 40 µg/ml de tioestreptona y se incubaron a 37 °C durante 6 días adicionales para forzar la integración primaria. Después de 6 días a 37 °C, las cepas obtenidas se  
15 transfirieron a medio de agar sólido ISP-4 sin selección y se incubaron durante 15 días a 28 °C para permitir un segundo cruce.

Después de 15 días de crecimiento, las cepas se recolectaron en glicerol al 20 %. Se usaron 100 µl de la  
20 suspensión celular para inocular placas frescas, así como para hacer diluciones en serie de hasta  $10^{-10}$ . Luego se colocaron 100 µl de  $10^{-8}$  a  $10^{-10}$  en placas de agar ISP-4. Las placas se incubaron a 28 °C hasta que se observaron colonias individuales.

Las colonias individuales se parchearon doblemente en medios de agar ISP-4 no selectivos y selectivos de tioestreptona. Los parches sensibles (que representan la recombinación secundaria) se examinaron entonces a través de  
5 PCR utilizando ADN<sub>g</sub> aislado con el kit FastSpin para suelo (MP Biomedicals).

Para confirmar la región que contiene ambas SEQ ID NO: 22 y SEQ ID NO: 23 se ha eliminado de la cepa, se usó un par de cebadores que se unen al exterior de la región eliminada.  
10 La secuenciación Sanger del producto PCR y el alineamiento con el genoma del *Streptomyces* sp. Saigon413, confirmaron la delección de la región genómica que contiene SEQ ID NO: 22 y SEQ ID NO: 23. Además, el análisis del genoma completo utilizando secuenciación libre de Illumina-PCR confirmó que  
15 no se habían realizado otras alteraciones en el genoma.

Cultivo de *Streptomyces* sp. Saigon413Δ941-942 y el análisis de extractos de la cepa confirmaron que el compuesto de polieno ya no se producía por la cepa. Confirmación de SEQ ID NO: 22 y SEQ ID NO: 23 son esenciales para la producción  
20 del compuesto polieno.

## **2. Caracterización del compuesto de polieno de conformidad con la presente invención**

### **2.1. Purificación del compuesto polieno**

Una muestra secada por pulverización de un cultivo de  
25 *Streptomyces* sp. Saigon 413 se lavó con agua. El residuo

sólido se extrajo dos veces con isopropanol y se removió el isopropanol. El sólido resultante se purificó mediante HPLC preparativa de fase inversa (C18) usando un gradiente de acetonitrilo: agua. Se llevó a cabo una purificación  
5 adicional mediante HPLC preparativa de fase inversa usando una columna Zorbax C8 y eluyendo con un gradiente de acetonitrilo: agua.

El compuesto de polieno se detectó por UV-VIS en la solución de acetonitrilo: agua (Figura 1).

## 10 **2.2. Otros compuestos de tipo polieno**

Complejo filipino aislado de *Streptomyces filipinensis* (CAS: 11078-21-0) se compró a un vendedor comercial. Es un antibiótico macrólido y se utiliza como colorante en microscopía. La muestra es una mezcla de 8 isómeros, con  
15 Filipina III como componente principal. La Filipina III tiene una masa de 654.83 y una composición molecular de C<sub>35</sub>H<sub>58</sub>O<sub>11</sub>

La Anfotericina B es un antibiótico macrólido aislado del *Streptomyces nodosum* (CAS1397-89-3) se compró a un vendedor comercial. Tiene una masa de 924.08 y una  
20 composición molecular de C<sub>47</sub>H<sub>73</sub>N<sub>17</sub>.

## **2.3 Cromatografía Líquida y Espectrometría de Masas de Alta Resolución**

Se registraron los espectros en un espectrómetro de masas Tribrid Orbitrap ID-X de Thermo Scientific equipado con  
25 una fuente de electropulverización calentada OptaMax NG

(voltaje de pulverización: Estático, Ion de polaridad (V): 3400 (modo de iones positivos) y 2400 (modo de iones negativos), gas envolvente (Arb): 40, Gas aux. (Arb): 5, Gas de barrido (Arb): 1, Temperatura del tubo de transferencia de iones: 350 °C, Temperatura del vaporizador: 350 °C). Los parámetros de exploración fueron los siguientes;

Experimento 1: MS OT (Resolución de Orbitrap: 50,000, Intervalo de exploración (m/z): 200 a 2000, lente RF (%): 60, objetivo AGC: Convencional, Modo de tiempo máximo de inyección: Auto, Microbarridos: 1, Tipo de datos: Perfil, Polaridad: Ambas),

Experimento 2: tMS2 OT CID (Nivel MSn (n): 2, Ventana de aislamiento (m/z): 1.0, Tipo de activación: CID, Energía de colisión CID (%): 30, Tipo de detector: Orbitrap, Resolución de Orbitrap: 30,000, lente RF (%): 60, Polaridad: Positiva),

Experimento 3: tMS2 OT HCD (Nivel MSn (n): 2, Ventana de aislamiento (m/z): 1.0, Tipo de activación: HCD, energía de colisión HCD (%): 30, Tipo de detector: Orbitrap, Resolución de Orbitrap: 30,000, lente RF (%): 60, Polaridad: Positivo),

Experimento 4: tMS3 OT HCD (Nivel MSn (n): 3, Ventana de aislamiento (m/z): 1.6, Tipo de activación: HCD, energía de colisión HCD (%): 30, Ventana de aislamiento MS2 (m/z): 2, Tipo de activación MS2: HCD, energía de colisión MS2 HCD (%): 30, Tipo de detector: Orbitrap, Resolución de Orbitrap: 30,000, lente RF (%): 60, Polaridad: Positiva).

El espectrómetro de masas se conectó a un Vanquish Flex UHPLC de Thermo Scientific usando un Vanquish Split Sampler FT, Vanquish Binary Pump F, Vanquish Column Compartment H, Vanquish Diode Array Detector FG y Vanquish Charged Aerosol  
 5 Detector.

Las condiciones de cromatografía líquida incluyeron: Columna Waters ACQUITY UPLC C18 1.7  $\mu$ m 3.0  $\times$  50 mm, P.N. 186004660. Temp.: 40 °C, intervalo de longitud de onda de DAD: de 250 a 260 nm, gradiente de disolvente: Disolvente A: H<sub>2</sub>O con ácido fórmico al 0.1 %, Disolvente B: CH<sub>3</sub>CN con ácido  
 10 fórmico al 0.1 %, gradiente: 0 min B al 10 %, A al 90 %; 4.00 min B al 90 %, A al 10 %; 4.25 min B al 90 %, A al 10 %; 4.50 min B al 10 %, A al 90 %; 5.00 min B al 10 %, A 90 %, Caudal: 1.0 ml/min, Volumen de inyección: 2  $\mu$ l, Tiempo total  
 15 de ejecución: 5.0 min.

Se inyectó un caldo de fermentación purificado como se describe en la sección 1.3.

Los picos clave del espectro de masas observados fueron:  
 Ion negativo: C<sub>67</sub>H<sub>114</sub>NO<sub>25</sub> [M-H]<sup>-</sup> Esperada: 1332.7685, Observada:  
 20 1332.7679  
 Ion positivo: C<sub>67</sub>H<sub>114</sub>NO<sub>24</sub> [M-H<sub>2</sub>O+H]<sup>+</sup> Esperada: 1316.7725, Observada: 1316.7709  
 Ion positivo: C<sub>67</sub>H<sub>115</sub>NO<sub>24</sub> [M-H<sub>2</sub>O+2H]<sup>2+</sup> Esperada: 658.8899, Observada: 658.8895

Ion positivo:  $C_{67}H_{113}NO_{23} [M-2(H_2O)+2H]^{2+}$  Esperada: 649.8846,  
Observada: 649.8843

Ion positivo:  $C_{67}H_{111}NO_{22} [M-3(H_2O)+2H]^{2+}$  Esperada: 640.8793,  
Observada: 640.8790

5        En un segundo experimento, se incluyeron condiciones de  
cromatografía líquida: Columna Kinetex Polar C18 100A 4.6x100  
mm, P.N. H17-055453. Temp: 40 °C, intervalo de longitud de  
onda de DAD: de 250 a 260 nm, gradiente de disolvente:  
Disolvente A: H<sub>2</sub>O con ácido fórmico al 0.1 %, Disolvente B:  
10 CH<sub>3</sub>CN con ácido fórmico al 0.1 %, gradiente: 0 min B al 10 %,  
A al 90 %; 1 min B al 10 %, A al 90 %; 6.50 min B al 95 %, A  
al 5 %; 8.00 min B al 95 %, A al 5 %; 9.00 min B al 10 %, A  
al 90 %; 10.00 min B al 10 %, A al 90 %, Caudal: 1.0 ml/min,  
Volumen de inyección: 5 µl, Tiempo total de ejecución:  
15 10.0 min.

En estas condiciones, el compuesto de polieno tenía un  
tiempo de retención de 5.55-5.57 minutos.

La masa observada del compuesto polieno fue la misma que  
en la cromatografía líquida anterior (resultados no  
20 mostrados).

## 2.4 Composición molecular y masa

La composición molecular y la masa del compuesto de  
polieno se determinaron utilizando los resultados de la  
cromatografía líquida y la espectrometría de masas de alta  
25

resolución, tal como se divulga en 2.3. El compuesto de polieno tiene la siguiente composición.

Composición molecular  $C_{67}H_{115}NO_{25}$  y masa exacta de 1333.7758.

## 5 2.5 Solubilidad

La solubilidad de un compuesto se determinó en DMSO:

|    | <u>Compuesto</u>      | <u>disolvente (pH)</u> | <u>solubilidad (ppm)</u> |
|----|-----------------------|------------------------|--------------------------|
|    | Polieno del compuesto | DMSO                   | >10'000                  |
|    | Complejo de Faloidina | DMSO                   | >10'000                  |
| 10 | Anfotericina B        | DMSO                   | >10'000                  |

La presencia del compuesto de polieno con una masa de 1333.7758 g en el caldo de fermentación de varias especies de *Streptomyces*, se determinó aislando y purificando de acuerdo con el método descrito en la sección 2. Los resultados de la

15 Tabla 2 muestran que el compuesto de polieno con una fórmula molecular de  $C_{67}H_{115}NO_{25}$  fue producido por la especie *Streptomyces chrestomyceticus*.

**Tabla 2.** Identificación del compuesto polieno C<sub>67</sub>H<sub>115</sub>NO<sub>25</sub> en el caldo de fermentación de *Streptomyces* sp. Saigon 413 y varias otras cepas de *Streptomyces* y 16SARN y % de identidad de todo el genoma en relación con *Streptomyces* sp. Saigon 413

|    |                      |                                                  |                                              |                                    |                                   |                                                             |
|----|----------------------|--------------------------------------------------|----------------------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------------------------------|
| 5  | <b>ID de la cepa</b> | <b>Especie</b>                                   | <b>Identidad de secuencia de ARN 16S (%)</b> | <b>ANI (%) frente a NRRL B3672</b> | <b>ANI (%) frente a CBS149411</b> | <b>Polieno C<sub>67</sub>H<sub>115</sub>NO<sub>25</sub></b> |
| 10 | CBS 149411           | <i>Streptomyces</i> sp. Saigon 413               | 100                                          | 96.90                              | 100                               | sí                                                          |
|    | CBS 492.64           | <i>Streptomyces</i> sp.                          | 99.48                                        | 90.02                              | 90.04                             | No                                                          |
| 15 | CBS 569.66           | <i>S. chrestomyceticus</i> ( <i>S. rimosus</i> ) | 99.94                                        | 96.63                              | 99.74                             | Sí                                                          |
| 20 | CBS 570.66           | <i>S. chrestomyceticus</i> ( <i>S. rimosus</i> ) | 99.94                                        | 96.65                              | 99.74                             | Sí                                                          |
|    | CBS 612.68           | <i>S. albofaciens</i>                            | 98.82                                        | 89.91                              | 89.92                             | No                                                          |
| 25 | CBS 938.68           | <i>S. rimosus</i>                                | 98.89                                        | 89.88                              | 89.81                             | No                                                          |

|    |                |                                                                     |       |       |       |    |
|----|----------------|---------------------------------------------------------------------|-------|-------|-------|----|
| 5  | DSM<br>40673   | <i>S. rimosus</i>                                                   | 99.02 | 89.86 | 89.78 | No |
|    | DSM<br>41057   | <i>S. rimosus</i>                                                   | 98.89 | 90.00 | 89.96 | No |
|    | DSM<br>41224   | <i>S.<br/>chrestomyceti<br/>cus</i>                                 | 99.87 | 99.97 | 96.96 | Sí |
|    | DSM<br>41429   | <i>S.<br/>chrestomyceti<br/>cus<br/>(S.<br/>paromomycinus<br/>)</i> | 99.87 | 95.88 | 95.95 | Sí |
| 15 | DSM-<br>41561  | <i>S. rimosus</i>                                                   | 99.02 | 89.79 | 89.84 | No |
|    | NRRL<br>B-2626 | <i>S. rimosus</i>                                                   | 98.89 | 89.82 | 89.75 | No |
| 20 | NRRL<br>B-3672 | <i>S.<br/>chrestomyceti<br/>cus</i>                                 | 99.87 | 100   | 96.9  | Sí |

### **3. Actividad de un compuesto de polieno en el control de enfermedades fúngicas**

#### **3.1 Actividad fungicida en ensayos de cultivo líquido**

Los fragmentos de micelio o las suspensiones de conidios  
5 de un hongo, preparados frescos a partir de cultivos líquidos del hongo o procedentes de almacenamiento criogénico, se mezclaron directamente en caldo nutritivo.

Se produjo una solución madre del compuesto de polieno de acuerdo con la presente invención, complejo de Filipina o  
10 Anfotericina B en DMSO (máx. 10 mg/ml), que se diluyó con agua más 0.025 % de Tween20 para producir una muestra 10x concentrada y se pipetearon 10 µl de esta solución en una placa de microtitulación (formato de 96 pocillos). A continuación, se añadió el caldo nutritivo que contenía las  
15 esporas fúngicas/los fragmentos de micelio para obtener una concentración final del compuesto sometido a prueba. Las placas de prueba se incubaron en la oscuridad a 24 °C y 96 % rh. La inhibición del crecimiento fúngico se determinó de manera fotométrica después de 2-7 días, dependiendo del  
20 patosistema, y se calculó el porcentaje de actividad antifúngica con relación a la muestra de referencia no tratada.

El efecto del compuesto de polieno de la presente invención, el complejo Filipina o la Anfotericina B se probó

contra los siguientes hongos en las condiciones descritas anteriormente y específicamente en el presente documento:

***Botryotinia fuckeliana*** (*Botrytis cinerea*) (BOTRCI)/ cultivo líquido (moho gris)

5 Los conidios del hongo procedentes del almacenamiento criogénico se mezclaron directamente en caldo nutritivo (caldo Vogels). Se determina la inhibición del crecimiento fotométricamente 3-4 días tras la aplicación.

***Colletotrichum orbiculare*** (*Colletotrichum lagenarium*)  
10 (COLLLA) / cultivo líquido (Antracnosis)

Los conidios del hongo procedentes del almacenamiento criogénico se mezclaron directamente en caldo nutritivo caldo de dextrosa de patata PDB). Se midió la inhibición del crecimiento fotométricamente 3-4 días tras la aplicación.

15 ***Fusarium culmorum*** FUSACU / cultivo líquido (Pudrición de la raíz/pudrición del pie/pudrición del tallo/tizón de la espiga de los cereales)

Los conidios del hongo procedentes del almacenamiento criogénico se mezclaron directamente en caldo nutritivo  
20 (PDB). Se midió la inhibición del crecimiento fotométricamente 3-4 días tras la aplicación.

***Microdochium nivale*** (MONGNI) cultivo de líquidos (podredumbre del pie/moho de la cabeza/moho de la nieve de los cereales)

Los conidios del hongo procedentes del almacenamiento  
25 criogénico se mezclaron directamente en caldo nutritivo

(PDB). Se midió la inhibición del crecimiento fotométricamente 4-5 días tras la aplicación.

***Mycosphaerella arachidis*** (*Cercospora arachidicola*) MYCOAR / cultivo líquido (mancha foliar temprana del cacahuete)

5 Los conidios del hongo procedentes del almacenamiento criogénico se mezclaron directamente en caldo nutritivo (PDB). Se determinó la inhibición del crecimiento fotométricamente 4-5 días tras la aplicación.

***Pythium ultimum*** PYTHUL / cultivo líquido (damping-off de  
10 plántulas)

Los fragmentos de micelio y las oosporas de un cultivo líquido recién hecho del hongo se mezclan directamente en caldo nutritivo (PDB). Se midió la inhibición del crecimiento fotométricamente 2-3 días tras la aplicación.

15 ***Rhizoctonia solani*** RHIZSO / cultivo líquido (tizón de la vaina del arroz)

Los fragmentos de micelio de un cultivo líquido del hongo recién crecido se mezclan directamente en caldo nutritivo (PDB). Se determinó la inhibición del crecimiento  
20 fotométricamente 3-4 días tras la aplicación.

***Sclerotinia sclerotiorum*** SCLESC / cultivo líquido (moho blanco)

Los fragmentos de micelio de un cultivo líquido del hongo recién crecido se mezclan directamente en caldo

nutritivo (PDB). Se determinó la inhibición del crecimiento fotométricamente 3-4 días tras la aplicación.

Los resultados de la Tabla 3 muestran que el compuesto de acuerdo con la presente invención tiene actividad  
5 fungicida.

***Zymoseptoria tritici* (Mycosphaerella graminicola, Septoria tritici), SEPTTR**

Los conidios del hongo procedentes del almacenamiento criogénico se mezclaron directamente en caldo nutritivo  
10 (caldo de dextrosa de patata PDB). Se colocó una disolución en DMSO de los compuestos de prueba en una placa de microvaloración (formato de 96 pocillos) y se le añadió el caldo nutritivo que contenían las esporas fúngicas. Las  
15 placas de ensayo se incubaron a 24 °C y la inhibición del crecimiento se determinó fotométricamente después de 72 h.

20

25

**Tabla 3.** Control del desarrollo fúngico mediante el compuesto polieno de la presente invención, el complejo filipina y la anfotericina en cultivo líquido.

|    |              | concentración | Patógeno fúngico diana |       |        |        |        |        |        |        |        |     |
|----|--------------|---------------|------------------------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|-----|
|    |              |               | BOTRCI                 | COLLA | FUSACU | MONGNI | MYCOAR | PYTHUL | RHIZSO | SCLESC | SEPTTR | (R) |
| 5  | compuesto    | en ppm        |                        |       |        |        |        |        |        |        |        |     |
| 10 | Compuesto de | 100           |                        |       |        |        |        |        |        |        |        |     |
|    | polieno con  |               |                        |       |        |        |        |        |        |        |        |     |
|    | MW=1333.7758 |               | 100                    | 100   | 100    | 100    | 100    | 70     | 100    | 100    | 100    | 100 |
| 15 |              | 33.3          | 100                    | 100   | 100    | 100    | 100    | 20     | 100    | 100    | 100    | 100 |
|    |              | 11.1          | 100                    | 100   | 100    | 100    | 100    | 0      | 100    | 100    | 100    | 100 |
|    |              | 3.7           | 100                    | 100   | 100    | 100    | 100    | 0      | 100    | 70     | 100    | 100 |
|    |              | 1.2           | 100                    | 100   | 100    | 100    | 100    | 0      | 70     | 50     | 100    | 100 |
|    |              | 0.4           | 90                     | 100   | 100    | 100    | 90     | 0      | 20     | 20     | 100    | 100 |
|    |              |               |                        |       |        |        |        |        |        |        |        |     |
|    |              |               |                        |       |        |        |        |        |        |        |        |     |
| 20 | Complejo de  | 100           |                        |       |        |        |        |        |        |        |        |     |
|    | Filipina     |               | 100                    | 100   | 100    | 100    | 100    | 100    | 100    | 100    | 100    | 100 |
|    | 33.3         |               | 100                    | 100   | 100    | 100    | 100    | 100    | 100    | 100    | 100    | 100 |
|    | 11.1         |               | 100                    | 100   | 100    | 100    | 100    | 70     | 100    | 100    | 100    | 100 |
|    | 3.7          |               | 100                    | 100   | 100    | 100    | 100    | 0      | 0      | 70     | 100    | 100 |
|    | 1.2          |               | 100                    | 100   | 20     | 100    | 0      | 0      | 0      | 0      | 100    | 100 |
|    | 0.4          |               | 0                      | 0     | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      | 0   |
| 25 | Anfotericina | 100           |                        |       |        |        |        |        |        |        |        |     |
|    | B            |               | 100                    | 100   | 100    | 100    | 0      | 100    | 100    | 100    | 100    | 100 |
|    |              |               | 33.3                   | 100   | 100    | 100    | 100    | 0      | 100    | 100    | 100    | 100 |

|  |      |     |     |     |     |   |     |     |     |     |     |
|--|------|-----|-----|-----|-----|---|-----|-----|-----|-----|-----|
|  | 11.1 | 100 | 100 | 100 | 100 | 0 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
|  | 3.7  | 100 | 100 | 90  | 100 | 0 | 70  | 50  | 100 | 100 | 100 |
|  | 1.2  | 100 | 100 | 70  | 100 | 0 | 0   | 0   | 100 | 100 | 100 |
|  | 0.4  | 100 | 90  | 20  | 70  | 0 | 0   | 0   | 100 | 100 | 100 |

5

Se hace constar que con relación a esta fecha, el mejor método conocido por la solicitante para llevar a la práctica la citada invención, es el que resulta claro de la presente descripción de la invención.

10

15

20

25