



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 336 758**

② Número de solicitud: 200902176

⑤ Int. Cl.:

C12N 1/20 (2006.01)

C07D 311/36 (2006.01)

A61K 36/48 (2006.01)

C12R 1/39 (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

② Fecha de presentación: **03.12.2009**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **15.04.2010**

Fecha de la concesión: **25.03.2011**

⑤ Fecha de anuncio de la concesión: **06.04.2011**

⑥ Fecha de publicación del folleto de la patente:
06.04.2011

⑦ Titular/es: **Fundación Universitaria San Pablo CEU
Isaac Peral, 58
28040 Madrid, ES**

⑧ Inventor/es: **Ramos Solano, Beatriz;
Algar Parejo, Elena y
Gutiérrez Mañero, Francisco Javier**

⑨ Agente: **Fuentes Palancar, José Julián**

⑩ Título: ***Pseudomonas fluorescens* N21.4 estimulante del metabolismo secundario de compuestos fenólicos.**

⑪ Resumen:

Pseudomonas fluorescens N21.4 estimulante del metabolismo secundario de compuestos fenólicos.

Cepa bacteriana *Pseudomonas fluorescens* N21.4, microorganismo del grupo de las bacterias Gram-, género *Pseudomonas*, estimulante del metabolismo secundario de compuestos fenólicos. Esta cepa ha sido aislada a partir de la rizosfera de *Nicotiana glauca*, en agar nutritivo (PCA), y ha sido caracterizada desde el punto de vista morfológico, bioquímico y genético mediante secuenciación parcial del gen 16s. Puede ser utilizada con objeto de incrementar el contenido en compuestos fenólicos en especies vegetales de interés farmacológico y alimentario, cuya aplicación sería obtener mayor cantidad de principios activos y/o nuevos alimentos con un contenido estandarizado en fenoles, como brotes de soja con mayor contenido en isoflavonas, o frutos del bosque con mayor contenido en antocianos, teniendo también aplicación como fitosanitario, fortaleciendo a las plantas frente al ataque de agentes biológicos patógenos.

ES 2 336 758 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Pseudomonas fluorescens N21.4 estimulante del metabolismo secundario de compuestos fenólicos.

5 La presente invención se refiere a una cepa de *Pseudomonas fluorescens* (N21.4, código interno del laboratorio) para su uso en el tratamiento de plantas con el objeto de inducir la síntesis de compuestos fenólicos. del metabolismo secundario con interés farmacológico y nutricional, además de fortalecer a las plantas frente a los agentes externos, por lo que también resulta de interés como fitosanitario.

10 Esta cepa ha sido depositada con fines de patente en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), con fecha 29 de octubre de 2009, donde se le ha asignado el número 7620. La CECT tiene su sede en el edificio de investigación de la Universidad de Valencia, sito en el campus de Burjassot (DP 46100 - Valencia, España).

15 La invención se encuadra dentro de los campos de la biotecnología, la farmacología y los nuevos alimentos- Esta cepa bacteriana puede servir de base para la preparación de diferentes tipos de productos estimulantes del metabolismo secundario de plantas. Estos productos mejorarán el contenido en bioactivos de naturaleza fenólica que puedan constituir principios activos de diversos medicamentos, mejorar la calidad de ciertos alimentos y mejorar la defensa de las plantas frente al ataque de agentes biológicos patógenos.

20 Estado de la técnica

Los mecanismos de acción de las bacterias promotoras del crecimiento vegetal, se pueden resumir en dos tipos: directos, cuando los metabolitos producidos alteran el metabolismo de la planta (actividad hormonal, estimulación de los mecanismos defensivos..), e indirectos, cuando sintetizan compuestos que facilitan la captación o movilización de nutrientes o evitan el crecimiento de microorganismos patógenos sobre la planta, sin alterar el metabolismo de la planta.

En este caso resulta de interés uno de los mecanismos directos, es decir que alteran el metabolismo de la planta. La planta posee un metabolismo secundario, altamente inducible, relacionado con la defensa de la planta y adaptaciones a situaciones adversas, a las que tiene que hacer frente. Dentro de este metabolismo secundario se encuentra el metabolismo de compuestos fenólicos., que además de estar relacionados con la defensa de la planta, son de interés para la salud humana, tanto cuando se consumen alimentos de origen vegetal que los contienen de forma natural, como los extractos vegetales dedicados a suplementos nutricionales. También son importantes como fuente de principios activos para la obtención de medicamentos.

35 *Pseudomonas fluorescens* pertenece al grupo de las bacterias Gram -. El género *Pseudomonas* es común entre bacterias del suelo, y pueden ser patógenos oportunistas en animales y patógenos de plantas. Siguiendo la taxonomía del Manual Bergeys, edición marzo de 2001, esta bacteria se encuadra dentro del Dominio Bacteria, Phylum Proteobacteria, Clase gamma proteobacteria, Orden Pseudomonadales, Familia Pseudomonaceae. El género *Pseudomonas* es muy común en el sistema edáfico, y se ha descrito en repetidas ocasiones como bacteria protectora frente a distintas enfermedades de plantas. Algunas bacterias de este grupo producen pigmentos fluorescentes de colores amarillo-verdosos fácilmente solubles en agua. Entre otras funciones, estos pigmentos actúan como sideróforos (moléculas capaces de capturar el hierro del medio para el metabolismo del microorganismo). Además, presentan una gran versatilidad metabólica debido a un gran número de plásmidos que contienen operones inducibles para la síntesis de enzimas específicas que permitan catabolizar los compuestos presentes en el medio. La presencia de *Pseudomonas sp.* en la rizosfera de distintas plantas afecta de forma beneficiosa a su fisiología indicando que es muy posible su selección por la planta a nivel rizosférico. Los efectos de esta cepa sobre la fisiología de distintas plantas indican que la planta las selecciona en su beneficio.

50 Si bien existen referencias en la literatura científica que citan *Pseudomonas fluorescens* por su interés como promotora del crecimiento vegetal y protector frente a patógenos, no se ha citado su capacidad para estimular el metabolismo de compuestos fenólicos. con fines terapéuticos, a través de la nutrición humana o como fuente de principios activos para suplementos nutricionales. (Evidence of disease resistance induced by rhizosphere pseudomonad against pseudomonas-syringae pv, phaseolicola Journal of general and applied microbiology Volume: 41 Issue: 4 Pages: 315-325 Published: AUG 1995. Alstrom, s.; Effect of plant growth-promoting rhizobacteria and culture filtrate of *Sclerotium rolfsii* on phenolic and salicylic acid contents in chickpea (*Cicer arietinum*) Singh UP, Sarma BK, Singh DP CURRENT MICROBIOLOGY Volume: 46 Issue: 2 Pages: 131-140 Published: FEB 2003; Differential methods of inoculation of plant growth-promoting rhizobacteria induce synthesis of phenylalanine ammonialyase and phenolic compounds differentially in chickpeabasha SA (Basha, S. A.), Sarma BK (Sarma, B. K.), Singh DP (Singh, D. P.), Annapurna K (Annapurna, K.), Singh UP (Singh, U. P.) FOLIA MICROBIOLOGICA Volume: 51 Issue: 5 Pages: 463-468 Published: 2006).

65 Realizando una búsqueda retrospectiva de patentes a nivel mundial en la base de datos de producción española Invenet (OEPM) y en la internacional Worlwide, a través del sistema Esp@cenet, se confirma dicha conclusión extraída de la consulta de literatura científica: la inexistencia de documentos de patente relativos a la especie bacteriana *Pseudomonas fluorescens* como inductora del metabolismo secundario de compuestos fenólicos. con interés farmacológico y nutricional, y también como fitosanitario, ya que tampoco se han encontrado patentes donde se reivindique el uso de *Pseudomonas fluorescens* como estimulante de compuestos fenólicos. en relación con la defensa de la planta.

Tras la referida búsqueda se ha constatado que existen 419 patentes relacionadas con la bacteria *Pseudomonas fluorescens* publicadas a nivel mundial (siete con efectos en España), de las cuales sólo cuatro (ninguna española) guardan relación con compuestos fenólicos., pero en ninguna de ellas *Pseudomonas fluorescens* se caracteriza por su capacidad estimulante del metabolismo secundario de compuestos fenólicos. en plantas, que es el objeto de la presente invención.

En efecto, en las cuatro patentes encontradas para *Pseudomonas fluorescens* tienen relación con la metabolización de compuestos fenólicos.; a saber: GB2431926A “Charred biological material carrying microbes”, KR2003008 6477A “Microbial agent sewage and wastewater treatment”, EP1537919A2 “Method for microbiologically decontaminating polluted materials resulting from road demolition” y US6406882B1 “Immobilized microbial consortium for the treatment of phenolic waste-water from petroleum refineries”. En todas ellas los compuestos fenólicos. tienen la condición de agentes contaminantes, y el microorganismo se utiliza con el fin de descomponerlos en tratamientos de descontaminación de suelos, aguas residuales, desechos biodegradables, etc., pero no por su capacidad estimulante del metabolismo secundario de compuestos fenólicos. en especies vegetales.

La invención

El objeto de la invención que aquí se describe y que, a la vista del estado de la técnica anterior, se entiende cumple con las condiciones de novedad y actividad inventiva necesarias para poder ser merecedora del derecho de patente, es el aislamiento y caracterización de la cepa bacteriana *Pseudomonas fluorescens* N21.4 (CECT 7620), que es un microorganismo del grupo de las bacterias Gram -, género *Pseudomonas*, con capacidad de inducir la síntesis de compuestos fenólicos. del metabolismo secundario en especies vegetales que, por la naturaleza de tales compuestos, resultan de interés farmacológico y/o nutricional, además de tener aplicación como fitosanitario frente al ataque de agentes biológicos patógenos.

Las características fisiológicas y el análisis genético de esta cepa permiten identificarla inequívocamente, diferenciándola de otras especies del género *Pseudomonas*.

Una vez aislada y caracterizada, se realizaron diversas pruebas para poner de manifiesto actividades bioquímicas indicadoras de su potencial capacidad de inducción de defensa sistémica y promoción del crecimiento vegetal. Estas fueron, producción de auxinas, degradación de 1-aminociclopropano-1-carboxilato, solubilización de fosfato y producción de sideróforos y quitinasas, resultando positiva para la producción de sideróforos y quitinasas y solubilización de fosfato.

Hasta el momento se han realizado experiencias consistentes en la inoculación de suspensiones bacterianas de *Pseudomonas fluorescens* sobre semillas de tomate, una Solanacea de gran interés agrícola. En estos experimentos se ha detectado una notable disminución de la biomasa de plantas de tomate de 5 semanas. Sin embargo, las plantas tratadas posteriormente con el patógeno *Xanthomonas campestris* pv tomate resultaron resistir mejor el ataque del patógeno alcanzando un 40% de disminución de la patología.

Asimismo se ha ensayado la inoculación directa de la cepa en planta modelo (*Arabidopsis thaliana*) donde ha inducido un efecto de resistencia sistémica frente a infecciones por el patógeno foliar *P.syringae* DC3000.

Estos dos experimentos realizados en distintas especies vegetales demuestran que la bacteria es capaz de estimular el metabolismo defensivo, y sin embargo, no existe un análisis de los compuestos responsables de dicha respuesta defensiva.

Por otro lado, se han realizado experimentos de elicitación con *Pseudomonas fluorescens* N21.4 en plantas de la familia Leguminosae, en particular, en plántulas de soja (*Glycine max*. Osumi), observándose un incremento en la producción de isoflavonas, que son compuestos tanto de interés farmacológico, al constituir principios activos de diversos medicamentos, como nutricional, al disponerse de alimentos enriquecidos en dicho compuesto fenólico. Cuando se aplica N21.4 en semillas de plantas de soja (*Glycine max*. Osumi), se consigue modificar el perfil de isoflavonas, con una mayor concentración de agliconas, formas activas tanto para la defensa de la planta como para la salud humana. Estos experimentos se han realizado tanto mediante la inoculación directa de *Pseudomonas fluorescens* en el material biológico como mediante elicitación con fragmentos de naturaleza polisacárida procedentes de su pared celular. Asimismo se han realizado experimentos de elicitación con los fragmentos de pared celular sobre cultivos celulares de soja. En todos los casos los resultados han sido semejantes.

Se han realizado asimismo experimentos de elicitación con *Pseudomonas fluorescens* N21.4 en plántulas de *Hypericum perforatum*, familia Hypericaceae, dando como resultado un incremento del contenido de compuestos fenólicos de interés farmacológico. En concreto, su aplicación en plántulas de *Hypericum perforatum* supone un incremento del contenido en hipericina y pseudohipericina. Estos experimentos se han realizado mediante la inoculación directa de *Pseudomonas fluorescens* en el material biológico aplicando varias dosis durante 14 semanas.

Pseudomonas fluorescens N21.4 puede también aplicarse a cualquier especie de plantas de las que constituyen los frutos rojos o frutos del bosque, como fresa, frambuesa, mora, arándano, o mirtillo, con el objeto de incrementar su contenido en compuestos fenólicos de interés farmacológico, nutricional y/o fitosanitario. En particular, se está ensayando la aplicación de la referida cepa bacteriana en mora (*Rubus fruticosus*).

ES 2 336 758 B1

Los referidos experimentos sobre el uso *Pseudomonas fluorescens* N21.4 como elicitador del metabolismo secundario de compuestos fenólicos se exponen al final de la presente memoria, dentro del apartado forma de realización.

5 La finalidad que se persigue, en definitiva, con esta invención y que constituye la ventaja técnica aportada con la misma, es disponer de una bacteria que mejore el contenido en metabolitos secundarios de naturaleza fenólica en plantas de interés farmacológico y nutricional, y que a la vez tenga un efecto como fitosanitario, haciendo entrar en contacto por cualquier medio disponible a dicha bacteria o alguna de sus partes con la planta.

10 En consecuencia, con la presente solicitud de patente se reivindica el uso de la cepa *Pseudomonas fluorescens* N21.4, o cualquier fracción de la misma, para su aplicación en cualquier tipo de especie vegetal, formando parte de cualquier preparado, ya sea individualmente o en combinación con otros organismos, con el fin de incrementar los niveles de metabolitos secundarios de naturaleza fenólica que: 1) mejoren la calidad del producto natural, bien para consumo directo o para la preparación de suplementos nutricionales o de extractos vegetales; 2) sirvan como principios activos para la preparación de diversos medicamentos; y 3) refuercen en cualquier caso la resistencia de las plantas frente a los agentes patógenos externos.

El uso de esta bacteria en plantas, o en cultivos celulares vegetales, permite estimular la síntesis de productos del metabolismo secundario de naturaleza fenólica con interés farmacológico, nutricional y/o fitosanitario.

20 Forma de realización

La cepa del genero *Pseudomonas* que aquí se reseña se aisló estudiando la rizosfera de poblaciones naturales de *Nicotiana glauca* en un transecto de la costa mediterránea de Almería. Esta especie vegetal (*Nicotiana glauca*) se seleccionó por ser de la familia Solanaceae y por tener un metabolismo secundario activo.

25 Los muestreos de rizosfera para el aislamiento de la cepa bacteriana se realizaron en poblaciones naturales de *Nicotiana glauca* en tres suelos distintos en la costa de Almería, en las épocas fría y cálida, durante los años 1999 y 2000. Como resultado de dicho muestreo se coleccionaron 960 cepas entre las que se encontró *Pseudomonas fluorescens* (N21.4, código interno del laboratorio). El aislamiento de dicha cepa se realizó en agar nutritivo (PCA).

30 En el laboratorio este microorganismo se mantiene con una elevada tasa de supervivencia en glicerol al 20% en caldo nutritivo (Pronadisa) a -80°C o en glicerol al 15% en agua a -20°C y se recuperan con facilidad en el medio de cultivo utilizado para el aislamiento tanto en fase sólida como en fase líquida a 28°C.

35 Para la caracterización de las cepas se consideraron diferentes caracteres fenotípicos que se pormenorizan en esta memoria: (i) morfología de las colonias (ii) morfología de las células, (iii) secuenciación parcial del gen del ADN ribosomal correspondiente a la subunidad 16S.

40 Características morfológicas, bioquímicas y genéticas de *Pseudomonas fluorescens* N21.4

La caracterización taxonómica de *Pseudomonas fluorescens* se realizó identificando la cepa mediante secuenciación parcial del ADN ribosomal 16S, su comparación con las secuencias existentes en las bases de datos reveló una homología del 98% con una cepa de *Pseudomonas fluorescens*.

45 A continuación se especifica la morfología de las colonias a las 24 h de incubación a 28° en agar para métodos estándar (PCA).

50 TABLA 1

	N21.4
55 Tamaño de la colonia	< 1 mmØ
Forma	circular
60 Borde	Liso
Transparencia	No
Consistencia	Cremosa
65 Color	Amarillo pálido

ES 2 336 758 B1

Creciendo en medio líquido (Caldo nutritivo Pronadisa) el color del medio cambia a amarillo desde la fase exponencial de crecimiento a la fase estacionaria de crecimiento.

5 Los caracteres morfológicos de *Pseudomonas fluorescens* N21.4 a las 24 h de incubación a 28° en agar para métodos estándar (PCA) corresponden a un bacilo Gram negativo.

A continuación, se procedió al análisis genético de la cepa para su identificación, para ellos se siguieron los siguientes pasos:

10 *Extracción del ADN*

Para la extracción del ADN, las colonias crecieron durante 24 horas en caldo nutritivo (Pronadisa) a 28°C en agitación. Transcurrido este tiempo, Se extrajo el ADN genómico de cada bacteria con el kit Ultraclean™ Microbial DNA isolation (MoBio, CA, EE.UU.), según las indicaciones del fabricante.

15 *Amplificación del ADNr 16S*

Se amplificaron mediante PCR los 1500 pb correspondientes a esta región con los siguientes cebadores: directo 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3' y reverso 5'-AAG GAG GTG ATC CAG CCG CA-3' (Ulrike, 1989), en una reacción de 25 µL con 1X de tampón 10X, 2.5 µM MgCl₂, 250 µM de cada DNTP, 2.5 µM cebador forward, 2.5 µM cebador reverse 1,25 unidades de ADN polimerasa (AmpliTaq Applied) y 100 ng del ADN bacteriano. La amplificación se realizó en un termociclador GeneAmp 2700 (Applied Biosystems) con las siguientes condiciones: 95°C 5 minutos, seguido de 25 ciclos de 94°C 30 segundos, 65,5°C 30 segundos y 72°C 30 segundos, finalizando con 7 minutos a 72°C.

25 *Visualización de los geles*

El producto de PCR se resolvió en gel de agarosa al 1% (p/v) en tampón Tris-Acetato-EDTA (TAE 1%) con bromuro de etidio (0,5 mg/mL) y se visualizaron en un analizador de imagen GelDoc2000TM 170-8126 (Biorad, CA, EE.UU).

Secuenciación de ADN

Una vez comprobada la amplificación, el producto de PCR, se purificó con el kit UltraClean™ PCR Clean-up DNA purification (MoBio, CA, EE.UU.), se secuenció UNIDAD DE GENÓMICA PARQUE CIENTÍFICO DE MADRID-U.C.M. en un secuenciador ABI PRIMS® 377 ADN Sequencer (Applied Biosystems, CA, USA).

Análisis informático de la secuencia

40 Las secuencias se alinearon con el programa Bioedit Sequence Aligment editor 5.0.3.®, se revisaron manualmente se corrigieron y se analizaron por BLASTN 2.2.6.(Altschul *et al.*, 1997) en el GeneBank EMBL y DDBJ (página Web del NCBI BLAST: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), resultando la mayor homología: *Pseudomonas* sp. DK4 EU158318, y quedando depositada la secuencia en el GeneBank con el número de acceso AY748893.

45 *Pseudomonas fluorescens* como elicitador del metabolismo secundario de compuestos fenólicos

1°. Experimento de elicitación en plantas de *Hypericum perforatum* aplicando la bacteria en la raíz.- Se inoculó una suspensión bacteriana de la cepa N21.4 en la raíz de plántulas de *Hypericum perforatum* dos semanas después de la germinación y posteriormente, se inocularon cada dos semanas, durante 12 semanas. Se observó una inducción de la síntesis de los principios activos hipericina y pseudohipericina, logrando un incremento en la concentración de estos principios activos.

2°. Experimento de elicitación en plántulas de soja (*Glycine max* var. Osumi) inoculando la bacteria a nivel radical. Se pregerminaron semillas de soja y se transplantaron a macetas rellenas con vermiculita estéril. Se inoculó la cepa y a los 8 días de la inoculación se cosecharon las plántulas y se determinó la concentración de isoflavonas totales, analizando pormenorizadamente las distintas familias de isoflavonas presentes en la soja, así como las distintas especies químicas y su distribución en la planta. Se encontró que esta cepa era capaz de incrementar el contenido en isoflavonas totales, concretamente aumentando la concentración de isoflavonas pertenecientes a las de las familias de la Daizeina y de la Genisteina, especialmente en las hojas y cotiledones. Además, aumentaban de forma notable las formas glicosiladas y los malonilderivados, que son las formas de transporte, lo que indica que hay síntesis de novo y que hay transporte hacia los órganos en desarrollo.

3°. Experimento de elicitación en semillas de soja (*Glycine max* var. Osumi) aplicando la bacteria y polisacáridos de esta bacteria. Este experimento se realizó haciendo un corte en la zona del embrión de semillas de soja y aplicando la bacteria y sus dos fracciones polisacáridicas solubles en agua (mayor de 10 kd y menor de 10 kd), en una concentración de 0.01 mg/mL. Se determinó la concentración de isoflavonas a los 4 días del tratamiento. Si bien en ese corto periodo de tiempo no se incrementaba el contenido total en isoflavonas, sí se alteraba la concentración relativa de éstas, es

ES 2 336 758 B1

5 decir, aumentaban las formas agliconas (formas activas tanto para la defensa de la planta como para la salud humana) en detrimento de las formas glicosiladas y malonilderivados - Los resultados fueron semejantes tanto en el caso de inoculación de la bacteria como cuando se aplican las fracciones polisacaridicas sobre la familia de la daizenia; sin embargo, sólo la fracción de mayor peso molecular era capaz de aumentar significativamente el contenido en isoflavonas de la familia de la genisteina.

10 4°. Experimento de elicitación en cultivos celulares de soja (*Glycine max* var. Osumi) aplicando polisacáridos de superficie de esta bacteria. Este experimento se realizó aplicando las dos fracciones polisacaridicas solubles en agua (mayor de 10 kd y menor de 10 kd), en una concentración de 0.01 mg/mL en el medio de cultivo de las células (callos celulares). Se determinó la concentración de isoflavonas a los 15 días del tratamiento. Se detectó un incremento en el contenido total en isoflavonas, debidas fundamentalmente al incremento en la familia de la Daidzeina aumentando especialmente las formas glicosiladas y malonilderivados en detrimento de las formas agliconas; sólo la fracción de mayor peso molecular era capaz de aumentar el contenido en isoflavonas de la familia de la genisteina.

15 **Aplicación industrial**

20 Dadas las propiedades arriba apuntadas de *Pseudomonas fluorescens* N21.4 como estimulador del metabolismo secundario de compuestos fenólicos, esta cepa bacteriana tiene una aplicación específica en la industria agroalimentaria, química y farmacéutica, al poder ser utilizada formando parte de cualquier preparado (de forma individual o en combinación con otros microorganismos) y haciéndolas entrar en contacto (a la cepa o cualquier parte de ella) con la semilla, el sistema radical o aéreo de las plantas por cualquier medio disponible, en cualquier especie vegetal, o en cualquier forma de cultivo *in vitro*, para incrementar la concentración de metabolitos secundarios de naturaleza fenólica con interés farmacológico y/o nutricional, o para fortalecer a las plantas frente a los agentes patógenos externos.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 336 758 B1

REIVINDICACIONES

5 1. *Pseudomonas fluorescens* N21.4 (CECT 7620), microorganismo del grupo de las bacterias Gram género Pseudomonas, **caracterizado** por su capacidad estimulante del metabolismo secundario de compuestos fenólicos en especies vegetales, actuando de forma directa en plantas de interés farmacológico y nutricional, y protegiéndolas frente al ataque de agentes biológicos patógenos, resultando también de interés fitosanitario.

10 2. Uso de *Pseudomonas fluorescens* N21.4 (CECT 7620), o cualquier molécula derivada de ella, según reivindicación 1, para su aplicación en cualquier tipo de cultivo agrario o forestal, a fin de incrementar la producción de compuestos fenólicos del metabolismo secundario de interés farmacológico, nutricional y/o fitosanitario.

15 3. Uso de *Pseudomonas fluorescens* N21.4 (CECT 7620), o cualquier molécula derivada de ella, según reivindicación 2, para su aplicación en cualquier especie de plantas de la familia Leguminosae con el objeto de incrementar su capacidad de producción de compuestos fenólicos de interés farmacológico, nutricional y/o fitosanitario.

20 4. Uso de *Pseudomonas fluorescens* N21.4 (CECT 7620), o cualquier molécula derivada de ella, según reivindicación 3, para su aplicación en plántulas de soja (*Glycine max.* Osumi), con el objeto de incrementar su capacidad de producción de isoflavonas.

25 5. Uso de *Pseudomonas fluorescens* N21.4 (CECT 7620), o cualquier molécula derivada de ella, según reivindicación 3, para su aplicación en semillas de plantas de soja (*Glycine max.* Osumi), con el objeto de modificar el perfil de isoflavonas, incrementando la concentración de agliconas.

30 6. Uso de *Pseudomonas fluorescens* N21.4 (CECT 7620), o cualquier molécula derivada de ella, según reivindicación 2, para su aplicación en cualquier especie vegetal de las que constituyen los frutos rojos o frutos del bosque, como (fresa, frambuesa, mora, arándano, o mirtillo, con el objeto de incrementar su contenido en compuestos fenólicos de interés farmacológico, nutricional y/o fitosanitario.

35 7. Uso de *Pseudomonas fluorescens* N21.4 (CECT 7620), o cualquier molécula derivada de ella, según reivindicación 6, para su aplicación en mora (*Rubus fruticosus*), con el objeto de incrementar el contenido en antocianos y taninos.

40 8. Uso de *Pseudomonas fluorescens* N21.4 (CECT 7620), o cualquiera de sus partes, según reivindicación 2, para su aplicación en cualquier especie de plantas de la familia Hypericaceae, con el objeto de incrementar el contenido de compuestos fenólicos de interés farmacológico.

45 9. Uso de *Pseudomonas fluorescens* N21.4 (CECT 7620), según reivindicación 8, para su aplicación en *Hypericum perforatum*, con el objeto de incrementar el contenido en hipericina y pseudohipericina.

50 10. Uso de *Pseudomonas fluorescens* N21.4 (CECT 7620), o cualquier molécula derivada de ella, según reivindicaciones 1 a 9, bien la cepa individual o en combinación con otros organismos, formando parte de cualquier preparado, ya sea individualmente o en combinación con otros organismos, y por cualquier medio disponible que ponga la bacteria en contacto con la semilla, el sistema radical o aéreo de las plantas.

55 11. Uso de *Pseudomonas fluorescens* N21.4 (CECT 7620), o cualquier molécula derivada de ella, según reivindicaciones 1 a 9, bien la cepa individual o en combinación con otros organismos, o formando parte de cualquier preparado, ya sea individualmente o en combinación con otros organismos, y por cualquier medio disponible que ponga la bacteria en contacto con células procedentes de cualquier forma de cultivo *in vitro*.



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 336 758

② Nº de solicitud: 200902176

③ Fecha de presentación de la solicitud: 03.12.2009

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ **Int. Cl.:** Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	DOMENECH J., RAMOS S. B., PROBANZA A., LUCAS G. J. A., GUTIERREZ M. F. J. "Elicitation of systemic resistance and growth promotion of Arabidopsis Thaliana by PGPRs from Nicotiana glauca: a study of the putative induction pathway." Plant Soil (2007) Vol. 290 páginas 43-50. Páginas 44-46 y figuras 2 y 3.	1-11
A	BASHA S. A., SARMA B. K., SINGH D. P., ANNAPURNA K., SINGH U. P. "Differential methods of inoculation of plant growth-promoting rhizobacteria induce synthesis of phenylalanine ammonia-lyase and phenolic compounds differentially in chickpea." Folia Microbiology (2006) Vol. 51, páginas 463-468. Páginas 463, 465 y 467.	1-11
A	RAMOS SOLANO B., BARRIUSO MAICAS J., PEREYRA DE LA IGLESIA M.T., DOMENECH J., GUTIÉRREZ MAÑERO F.J. "Systemic disease protection elicited by plant growth promoting rhizobacteria strains: Relationship between metabolic responses, systemic disease protection, and biotic elicitors." Phytopathology (2008) Vol. 98, páginas 451-457. Páginas 451-452.	1-11

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

29.03.2010

Examinador

M. Jesús García Bueno

Página

1/5

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C12N 1/20 (2006.01)

C07D 311/36 (2006.01)

A61K 36/48 (2006.01)

C12R 1/39 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12N, C07D, A61K

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, TXTE, NPL, EMBASE, EMBL ALL.

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 29.03.2010

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-11	SÍ
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-11	SÍ
	Reivindicaciones	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de **aplicación industrial**. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión:

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como ha sido publicada.

1. Documentos considerados:

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	DOMENECH J., RAMOS S. B., PROBENZA A., LUCAS G. J. A., GUTIERREZ M. F. J. "Elicitation of systemic resistance and growth promotion of Arabidopsis Thaliana by PGPRs from Nicotiana glauca: a study of the putative induction pathway." Plant Soil (2007) Vol. 290 páginas 43-50.	2007
D02	BASHA S. A., SARMA B. K., SINGH D. P., ANNAPURNA K., SINGH U. P. "Differential methods of inoculation of plant growth-promoting rhizobacteria induce synthesis of phenylalanine ammonia-lyase and phenolic compounds differentially in chickpea." Folia Microbiology (2006) Vol, 51, páginas 463-468.	2006
D03	RAMOS SOLANO B., BARRIUSO MAICAS J., PEREYRA DE LA IGLESIA M. T., DOMENECH J., GUTIÉRREZ MAÑERO F. J. "Systemic disease protection elicited by plant growth promoting rhizobacteria strains: Relationship between metabolic responses, systemic disease protection, and biotic elicitors." Phytopathology (2008) Vol. 98, páginas 451-457.	2008

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La solicitud de invención consiste en *Pseudomonas fluorescens* N21.4 (CECT 7620) y su uso para su aplicación en cultivos agrarios o forestales, preferentemente de la familia Leguminosae, como semillas de soja (*Glycine max.* Osumi) y frutos rojos, como la mora (*Rubus fruticosus*), de la familia Hypericaceae, como *Hypericum perforatum*, con el objeto de incrementar el contenido en compuestos fenólicos de interés farmacológico, nutricional y/o fitosanitario (reivindicaciones 1-9).

Este uso del microorganismo se realiza por cualquier medio disponible que ponga la bacteria en contacto con la semilla, el sistema radical o aéreo de las plantas, o en contacto con células procedentes de cualquier forma de cultivo *in vitro* (reivindicaciones 10-11).

El documento D01 divulga la habilidad de seis rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas, aisladas de la rizosfera de *Nicotiana glauca* L., entre las que se encuentra la cepa *Pseudomonas fluorescens* N21.4, para estimular el crecimiento e inducir la resistencia sistémica contra *Xanthomonas campestris* CECT 95 en *Arabidopsis thaliana* L (ver páginas 44-46 y figuras 2 y 3).

El documento D02 divulga que la microinyección y tratamiento foliar con cepas de rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas causan gran acumulación de compuestos fenólicos, comparando los estudios con un control no tratado. Muchos estudios indican que la mayor acumulación de compuestos fenólicos debidos al aumento de la actividad fenilalanina amonioliasa (PAL), ofrecen una protección contra enfermedades (ver páginas 463, 465 y 467).

El documento D03 divulga que ciertas cepas de rizobacterias, denominadas rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas (PGPR), estimulan el crecimiento de las plantas y su salud. Muchos PGPR estimulan crecimiento vegetal mejorando la nutrición de la planta, lanzando reguladores del crecimiento vegetal, o suprimiendo organismos patógenos. Cepas de *Pseudomonas* spp. son capaces de producir una respuesta cuando están inoculadas en raíces, entre ellas *Pseudomonas fluorescens* Aur 6 (ver páginas 451-452).

Se considera que los documentos D01, D02, y D03 constituyen el estado de la técnica. Ninguno de estos documentos muestra las características de la cepa y usos de ésta reivindicados en las reivindicaciones 1-11. Así la invención es nueva y se considera que implica actividad inventiva.

Hoja adicional

1.- NOVEDAD (Art. 6 Ley 11/1986) Y ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 8 Ley 11/1986).

Las reivindicaciones 1-11 parecen ser nuevas e implican actividad inventiva en el sentido de los artículos 6 y 8 de la Ley 11/1986.