

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 601 199**

51 Int. Cl.:

C05F 11/08 (2006.01)

A01C 1/06 (2006.01)

A01N 63/04 (2006.01)

A01P 15/00 (2006.01)

C05B 17/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.10.2009 PCT/CA2009/001390**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.04.2010 WO10037228**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.10.2009 E 09817148 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.08.2016 EP 2344610**

54 Título: **Métodos y composiciones para aumentar las cantidades de fósforo disponible para la absorción de la planta de los suelos**

30 Prioridad:

01.10.2008 EP 08165591

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

14.02.2017

73 Titular/es:

**NOVOZYMES BIOLOGICALS LIMITED (100.0%)
3935 Thatcher Ave
Saskatoon, Saskatchewan S7R 1A3, CA**

72 Inventor/es:

**HNATOWICH, GARRY LAWRENCE;
STECKLER, SHELAGH JEAN;
LEGGETT, MARY ELIZABETH y
PRIEST, KARI LYNN**

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 601 199 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Métodos y composiciones para aumentar las cantidades de fósforo disponible para la absorción de la planta de los suelos

5

Referencia a un depósito de material biológico

[0001] Esta solicitud contiene una referencia a depósitos de material biológico, estos depósitos son incorporados aquí por referencia.

10 Para información completa ver últimas 2 páginas de la descripción.

CAMPO DE LA INVENCION

[0002] La presente invención se refiere a un método para aumentar la disponibilidad de fósforo para la absorción de la planta del suelo, a una composición para la aplicación al suelo y a una semilla de planta.

15

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0003] Para mantener un crecimiento saludable, las plantas deben extraer una variedad de elementos del suelo donde éstas crecen.

20

Estos elementos incluyen fósforo y los denominados micro-nutrientes (por ejemplo cobre, hierro y zinc), pero muchos suelos son deficitarios de tales elementos o los contienen solo en formas que no se pueden absorber fácilmente por las plantas (se cree generalmente que elementos esenciales no se pueden absorber fácilmente por las plantas a menos que éstas estén presentes en la forma disuelta en el suelo).

25

[0004] Para contrarrestar tales deficiencias, fuentes de los elementos deficitarios son comúnmente aplicadas a los suelos para mejorar los índices de crecimiento y los productos obtenidos de las plantas de cultivo.

Por ejemplo, los fosfatos son frecuentemente añadidos al suelo para contrarrestar una falta del fósforo disponible.

El fosfato añadido al suelo como un fertilizante comercial (por ejemplo, fosfato de monoamonio o superfosfato triple) está fácilmente disponible para las plantas, pero es rápidamente convertido en suelo para formas relativamente indisponibles.

30

Se ha estimado que solo 10 a 30% de fosfato fertilizante es usado por la planta en el año que es aplicado, y de un tercio a una mitad del fosfato fertilizante aplicado puede no ser nunca recuperado por la planta.

35

[0005] Se ha intentado en el pasado usar microorganismos para mejorar la disponibilidad de elementos esenciales en sistemas de suelos.

En particular especies del hongo *Penicillium* han sido usadas para este propósito.

US 5,026,417 describe una cepa aislada de *P. bilaiae* que es capaz de mejorar la absorción de fósforo por las plantas cuando se aplica al suelo.

40

[0006] EP 0 284 236 A divulga un método y una composición para aumentar las cantidades de fósforo y/o micronutrientes disponibles para la absorción por las plantas del suelo que consisten en la introducción en el suelo de un inóculo de *Penicillium Bilaji*, en particular una cepa identificada como ATCC 20851 y una fuente de fósforo y/o micronutrientes originalmente presentes en el suelo y/o añadidos al suelo.

45

Los hongos se introducen en forma de un inóculo soportado en una fuente de carbono para el hongo.

La composición es útil también como recubrimiento de semilla.

[0007] Es conocido por ANITA PANDEY ET AL: "Phosphate solubilization by *Penicillium* spp. isolated from soil samples of Indian Himalayan region", *WORLD JOURNAL OF MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY*, KLUWER ACADEMIC PUBLISHERS, DO, vol. 24, nº 1,5 junio 2007 (2007-06-05), páginas 97-102 que *P. rugulosum*, *P. radicum*, *P. pinophilum* y *P. citrinum* son hongos conocidos usados para solubilización de fosfato.

50

[0008] Es también conocido por BARROSO C. B. ET AL: "The status of soil phosphate fractions and the ability of fungi to dissolve hardly soluble phosphates", *APPLIED SOIL ECOLOGY*, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 29, nº 1,1 Mayo 2005 (2005-05-01), páginas 73-83 que *P. simplicissimus*, *P. grisofulvum* y *P. radicum* poseen todas las actividades de solubilización de P.

55

Todavía hay, sin embargo, una necesidad de sistemas para mejorar las condiciones de crecimiento para plantas, particularmente mediante el aumento de los niveles de fósforo disponible en los sistemas de suelo.

RESUMEN DE LA INVENCION

60

[0009] La presente invención se basa en la constatación de que especies diferentes de *Penicillium*, que cuando se aplican solas pueden tener capacidad variable para mejorar la disponibilidad de fósforo tanto de fosfatos insolubles como de fertilizantes fabricados, pueden dar lugar cuando se combinan a un efecto sinérgico que traspasa lo que podría ser previsto a partir de los resultados individuales.

65

[0010] Esto se mantiene cierto para especies de *Penicillium* de *P. bilaiae*.

[0011] La invención proporciona en un primer aspecto un método para aumentar la disponibilidad de fósforo para la absorción por la planta del suelo, este método comprende la introducción el suelo de los inóculos de al menos dos cepas diferentes del hongo *Penicillium*, es decir las cepas NRRL 50169 y NRRL 50162.

[0012] En un segundo aspecto la invención se refiere a un método de mejora de las condiciones de crecimiento de las plantas, que incluye el crecimiento de las plantas en el suelo que contiene, cerca de las raíces de la planta, tanto una fuente de fósforo como las dos cepas identificadas por los números de depósito NRRL 50169 y NRRL 50162.

[0013] En un tercer aspecto la invención se refiere a una composición para aplicación a la tierra, que comprende: i) inóculos de las dos cepas del hongo *Penicillium*, *bilaiae* NRRL 50169 y NRRL 50162 e ii) un portador compatible con el suelo para el hongo.

[0014] En un siguiente aspecto la invención se refiere a una semilla de planta teniendo un recubrimiento que comprende inóculos de las dos cepas del hongo *Penicillium*, *bilaiae* NRRL 50169 y NRRL 50162 y por lo tanto un portador compatible con el suelo sólido.

BREVE DESCRIPCIÓN DE DIBUJOS

[0015]

La Fig. 1 muestra el efecto de inoculación con microorganismos de solubilización de fosfato en el rendimiento de maíz.

P. bilaiae (Novozymes P-201) corresponde a la cepa NRRL 50169, y *P. bilaiae* (Australia; P-208) corresponde a NRRL 50162.

LA Fig. 2 muestra la solubilización de apatita hidroxilo en el cultivo líquido por las cepas de *P. bilaiae* individualmente y en combinación.

Los números entre corchetes indican el índice de incubación (esporas por matraz).

La Fig. 3 muestra el efecto de la inoculación con microorganismos de solubilización de fosfato en el peso seco del brote de semilla de soja crecida bajo condiciones ambientes de crecimiento.

P. bilaiae (Novozymes) corresponde a la cepa NRRL 50169, *P. bilaiae* (Australia) corresponde a NRRL 50162, y la mezcla de *P. bilaiae* corresponde a una mezcla 1:1 de las dos cepas.

La Fig. 4 muestra el efecto de la inoculación con microorganismos de solubilización de fosfato en peso seco del brote de maíz crecido bajo condiciones ambientes de crecimiento.

P. bilaiae (Novozymes) corresponde a la cepa NRRL 50169, *P. bilaiae* (Australia) corresponde a NRRL 50162, y la mezcla de *P. bilaiae* corresponde a una mezcla 1:1 de las dos cepas.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0016] El hongo *Penicillium bilaiae* es un microorganismo conocido que ha sido depositado previamente en la Colección Americana de Cultivos Tipo en el Rockville, Md., EE.UU bajo el número de depósito ATCC 22348 (1974 edición del catálogo de ATCC).

En el catálogo de 1984, el mismo número de depósito se usa para *P. bilaii* y otra cepa se identifica por el número de depósito 18309.

[0017] Otros aislados de este hongo han sido descubiertos en el suelo de una ubicación (latitud 49.grados. 48' N, longitud 113.grados. 6' W) en Southern Alberta, Canada.

Esta cepa ha sido mostrada previamente a la actividad de solubilización de P mejorada en comparación con las cepas anteriores depositadas en el ATCC.

Un depósito de esta cepa mejorada fue hecho en el ATCC bajo el número de depósito 20851 conforme a los términos del tratado de Budapest.

En este depósito el hongo fue denominado *P. bilaji* y los detalles taxonómicos y su uso ha sido descrito en US 5,026,417.

Esta cepa ha sido ahora redepósitoada como NRRL 50169.

Para información completa del depósito ver última página de la descripción.

[0018] El nombre de esta especie ha sido nuevamente cambiado posteriormente y es ahora reconocido como *P. bilaiae*.

Este nombre se usará en consecuencia en toda la especificación.

[0019] Un nuevo aislado de *P. bilaiae* ha sido descubierto en Australia.

Fue originalmente aislado en 2002 de raíces de trigo y crecido en las muestras de suelo recogidas por Coonalpyn en Australia del Sur (Wakelin et al., 2004. Biol Fertil Soils 40:36-43).

Un depósito de esta cepa mejorada fue hecho como depósito número NRRL 50162.

Para información completa del depósito ver última página de la descripción y los detalles taxonómicos de este aislado y su uso propuesto está descrito en la solicitud provisional de EEUU presentada el 01.10.2008 en nombre de

CSIRO.

[0020] Según un aspecto la invención se refiere a un método de mejora de las condiciones de crecimiento de las plantas, que comprende crecer las plantas en suelo que contiene, cerca de las raíces de la planta, tanto una fuente de fósforo como dos cepas del hongo *Penicillium*. Depositado como NRRL 50169 y NRRL 50162.

[0021] El uso de una combinación de al menos dos cepas de *Penicillium* diferentes tiene las ventajas siguientes. Cuando se aplica al suelo que ya contiene fosfatos insolubles (o difícilmente solubles), el uso de las cepas fúngicas combinadas dará lugar a un aumento en la cantidad de fósforo disponible para absorción de la planta en comparación con el uso de solo una cepa de *Penicillium*.

Esto sucesivamente puede suponer un aumento en la absorción de fosfato y/o un aumento en el rendimiento de las plantas crecidas en el suelo en comparación con el uso de cepas individuales solo.

Si por ejemplo fósforo no es un factor de limitación un aumento del rendimiento puede no seguir necesariamente como resultado de la disponibilidad aumentada.

La combinación de cepas también permite usar fosfatos de rocas insolubles como un fertilizante eficaz para suelos que tienen cantidades inadecuadas de fósforo disponible.

[0022] Según un aspecto la invención por lo tanto se refiere a un método para aumentar la disponibilidad de fósforo para la absorción de la planta del suelo, este método comprende la introducción en el suelo de los inóculos de al menos dos cepas diferentes del hongo *Penicillium*.

La presencia de las dos cepas de *Penicillium* aumentará la disponibilidad de fósforo para la absorción de la planta.

[0023] Dicho fósforo se puede proporcionar de una fuente seleccionada del grupo consistente en fuentes originalmente presentes en el suelo, fuentes añadidas al suelo como modificaciones y combinaciones de las mismas.

[0024] El término "inóculo" como se usa en esta especificación se destina a significar cualquier forma de células fúngicas, micelio o esporas, que es capaz de propagarse sobre o en la tierra cuando las condiciones de temperatura, humedad, etc., son favorables para el crecimiento fúngico.

[0025] Por "fuente" de un elemento particular queremos decir un compuesto de este elemento que, al menos en las condiciones de suelo bajo consideración, no hace que el elemento esté completamente disponible para la absorción de la planta.

[0026] El hongo *Penicillium* según la invención y en particular las cepas específicas, NRRL 50169, y NRRL 50162 se pueden crecer usando la fermentación en estado sólido o líquido y una fuente de carbono adecuada.

Los aislados de *Penicillium* se pueden crecer utilizando cualquier método adecuado conocido por el experto en la técnica. Por ejemplo, el hongo se puede cultivar en un medio de crecimiento sólido tal como agar de dextrosa y patata o agar de extracto de malta, o en matraces que contienen medios líquidos adecuados tal como medio Czapek-Dox o caldo de dextrosa y patata.

Estos métodos de cultivo se pueden utilizar en la preparación de un inóculo de *Penicillium spp.* para revestimiento de semillas y/o aplicación al portador para aplicarse al suelo.

[0027] La producción de estado sólido de esporas de *Penicillium* se puede conseguir por la inoculación de un medio sólido tal como una turba o sustrato a base de vermiculita, o granos incluyendo, pero no limitados a, avena, trigo, cebada, o arroz.

El medio esterilizado (conseguido a través de autoclave o irradiación) se inocula con una suspensión de esporas (1×10^2 - 1×10^7 cfu / ml) del apropiado *Penicillium spp.* y la humedad ajustada a 20 a 50%, dependiendo del sustrato.

El material se incuba durante 2 a 8 semanas a temperatura ambiente.

Las esporas también se pueden producir por fermentación líquida (Cunningham et al., 1990. Can J Bot 68:2270-2274).

La producción líquida se puede conseguir por el cultivo del hongo en cualquier medio adecuado, tal como caldo de dextrosa y patata o medios de extracto de levadura de sacarosa, bajo pH apropiado y condiciones de temperatura (como podrían ser realizados por un experto en la técnica).

[0028] El material resultante se puede utilizar directamente como un tratamiento de semilla, o las esporas, se pueden cosechar, concentrar por centrifugación, formular, y luego secar usando secado de aire, liofilización, o técnicas de secado de lecho fluidizado (Friesen T., Hill G., Pugsley T., Holloway G., y Zimmerman D. 2005, Experimental determination of viability loss of *Penicillium bilaiae* conidia during convective air-drying Appl Microbiol Biotechnol 68: 397-404) para producir un polvo humedecible.

El polvo humedecible es luego suspendido en agua, aplicado a la superficie de semillas, y dejado secar antes de la siembra.

El polvo humedecible se puede utilizar conjuntamente con otros tratamientos de semilla, tal como, pero no limitado a, tratamientos de semilla química, portadores (por ejemplo, talco, arcilla, caolín, gel de sílice, caolinita) o polímeros (por ejemplo, metilcelulosa, polivinilpirrolidona).

Alternativamente, una suspensión de esporas de la *Penicillium spp.* apropiada se puede aplicar a un portador

compatible con el suelo adecuado (por ejemplo, polvo a base de turba o gránulo) hasta un contenido de humedad final apropiado.

El material se incuba a temperatura ambiente durante 2 a 8 semanas, y puede después ser aplicado al suelo en el surco junto con la semilla.

5 [0029] Como se ha descrito anteriormente, se ha descubierto que una combinación de al menos dos cepas de *Penicillium* aumentan la cantidad de fósforo disponible para la absorción de la planta de fertilizantes de fósforo comerciales en comparación con el uso de solo una cepa de modo que fertilizantes comerciales se pueden añadir al suelo en vez de (o incluso también como) fosfato de roca natural.

10 [0030] Según otras formas de realización de la invención la fuente de fósforo comprende una fuente de fósforo nativa al suelo o en otra forma de realización la fuente de fósforo se añade al suelo.

15 [0031] En una forma de realización dicha fuente es fosfato de roca.
En otra forma de realización dicha fuente es un fertilizante fabricado.

[0032] Fertilizantes de fosfato fabricados disponibles comercialmente son de muchos tipos. Algunos comunes son aquellos que contienen fosfato de monoamonio (MAP), fosfato super triple (TSP), fosfato de diamonio, superfosfato ordinario y polifosfato de amonio.

20 Todos estos fertilizantes se producen por la elaboración química de fosfatos de roca natural insolubles en las instalaciones de fabricación de abono a gran escala y el producto es costoso.

Mediante la presente invención es posible reducir la cantidad de estos fertilizantes aplicados al suelo mientras se sigue manteniendo la misma cantidad de absorción de fósforo del suelo.

25 [0033] En otra forma de realización particular la fuente o fósforo es orgánico. Un fertilizante orgánico se refiere a una modificación del suelo derivado de fuentes naturales que garantiza, al menos, los porcentajes mínimos de nitrógeno, fosfato, y potasa.

Ejemplos incluyen productos derivados de plantas y animales, polvos de roca, alga, inoculantes, y acondicionadores. Estas están disponibles frecuentemente en los centros de jardinería y a través de compañías de suministro hortícola.

30 En particular dicha fuente orgánica de fósforo es de harina de huesos, harina de carne, estiércol animal, compost, lodo residual, o guano.

[0034] Otros fertilizantes, tales como fuentes de nitrógeno, u otras modificaciones del suelo pueden por supuesto también ser añadidas al suelo aproximadamente al mismo tiempo que el hongo *Penicillium* o en momentos diferentes, ya que los otros materiales no son tóxicos para el hongo.

35 [0035] Ya que el hongo tiene el efecto de la solubilización de fosfatos que pueden ya estar presentes en el suelo (es decir, los que son nativos a la tierra) y también los que se agregan al suelo, el hongo se puede aplicar solo a suelos que contienen fuentes nativas de fósforo, o se pueden aplicar a cualquier suelo conjuntamente con fuentes añadidas de fósforo.

Los inóculos que comprenden las cepas fúngicas según la invención pueden como se ha descrito anteriormente ser proporcionados utilizando fermentación de estado sólido o líquido y una fuente de carbono adecuada.

40 [0036] La cantidad del inóculo que se debe aplicar al suelo no está limitada en ningún aspecto particular. Claramente, si se usa una cantidad insuficiente, un efecto perceptible no será obtenido.

Por otro lado, el uso de cantidades grandes del inóculo será excesivo debido a que las cantidades de fósforo y/o micronutrientes hechos disponibles en la tierra alcanzan un máximo a un cierto índice de aplicación y otras adiciones más allá de este índice no dan beneficios adicionales.

50 Los índices de aplicación adecuados varían según el tipo de suelo, el tipo de plantas de cultivo, las cantidades de la fuente de fósforo y/o los micronutrientes presentes en el suelo o añadidos al mismo, etc. y un índice adecuado puede ser encontrado sin dificultad por experimentos de tanteo simples para cada caso particular.

Normalmente, el índice de aplicación cae en la gama de 0.001-1.0 Kg esporas fúngicas y micelio (peso fresco) por hectárea, o 10^2 - 10^6 unidades formadoras de colonias (cfu) por semilla (cuando se usan semillas recubiertas), o en un portador granuloso aplicando entre 1×10^6 y 1×10^{11} unidades formadoras de colonias por hectárea.

55 Aunque los inóculos usados según la presente invención están compuestos de una mezcla/combinación de inóculos de al menos dos cepas diferentes de *Penicillium* es a la cantidad total de esporas o unidades formadoras de colonias en la mezcla combinada a la que se hace referencia en toda la especificación.

60 [0037] Las células fúngicas en forma de por ejemplo esporas y opcionalmente un portador se pueden añadir a una fila de semillas del suelo a nivel de la raíz o pueden utilizarse para revestir semillas antes de la siembra.

Cuando las esporas se agregan a la tierra una formulación granulosa será preferible.

Formulaciones como líquido, turba, o polvo humedecible serán adecuadas para el revestimiento de semillas.

Cuando se usa para revestir semillas, el material puede mezclarse con agua, aplicarse a las semillas y dejado secar.

65 [0038] Otros portadores para las esporas pueden utilizarse para revestir semillas. Por ejemplo, las esporas se pueden hacer crecer en salvado humedecido, secadas, tamizadas y aplicadas a

semillas previamente recubiertas con un adhesivo, por ejemplo goma arábica.

[0039] El portador debería preferiblemente ser un portador compatible con el suelo.

El término "compatible con el suelo" significa cualquier material que se puede añadir al suelo sin que tenga un efecto adverso en el crecimiento de planta, estructura del suelo, drenaje del suelo o similar.

Portadores adecuados comprenden, pero de forma no limitativa, paja de trigo, salvado, paja de trigo molida, polvos a base de turba o gránulos, gránulos a base de yeso, y arcillas (por ejemplo, caolín, bentonita, montmorillonita).

[0040] En otro aspecto la presente invención se refiere a una composición que comprende al menos dos cepas del hongo *Penicillium* según la invención, y un portador.

Portadores adecuados incluyen agua, soluciones acuosas, suspensiones acuosas, sólidos (por ejemplo turba, trigo, salvado, vermiculita, y tierra pasteurizada) o polvos secos.

[0041] La composición según la invención puede adecuadamente aplicarse en el método de la invención para aumentar la disponibilidad de fósforo para la absorción de la planta del suelo.

[0042] Las dos cepas de *Penicillium bilaiae* comprendidas en la composición son NRRL 50162 y NRRL 50170.

[0043] Particularmente el portador puede en una forma de realización comprender un líquido con un nutriente para el hongo.

[0044] En otra forma de realización la presente invención se refiere a una semilla de planta teniendo un recubrimiento que comprende inóculos de dos cepas del hongo *Penicillium*, NRRL 50169 y NRRL 50162.

[0045] La composición puede contener aditivos adicionales incluyendo agentes tampón, agentes humectantes, agentes de recubrimiento, y agentes de abrasión.

Los métodos según la invención son útiles potencialmente para mejorar las condiciones del crecimiento que resultan en un aumento de la absorción y/o rendimiento de fósforo para cualquier tipo de planta.

En una forma de realización particular la planta es seleccionada del grupo consistente en cereales, leguminosas, *Brassica* spp., frutas, verduras, frutos secos, flores, y turba.

Particularmente los cereales son trigo, maíz, arroz, avena, centeno, cebada.

Particularmente legumbres son lenteja, garbanzos, alubias, semillas de soja, guisantes, y alfalfa.

En otra forma de realización particular las plantas son seleccionadas del grupo consistente en alfalfa, arroz, trigo, cebada, centeno, avena, algodón, girasol, cacahuate, maíz, patata, batata, judía, guisante, garbanzos, lenteja, achicoria, lechuga, endibia, repollo, coles de Bruselas, remolacha, chirivía, nabo, coliflor, brécol, nabo, rábano, espinaca, cebolla, ajo, berenjena, pimiento, apio, zanahoria, calabacín, calabaza, zapallo, pepino, manzana, pera, melón, cítrico, fresa, uva, frambuesa, piña, semilla de soja, tabaco, tomate, sorgo, y caña de azúcar.

EJEMPLOS

Ejemplo 1. Caracterización de aislados

[0046] El análisis genético de la región D2 de 28S ADNr ha confirmado que las dos cepas ATCC 20851 (cepa P-201; igual que NRRL 50169) y NRRL 50162 (cepa P-208) son *P. bilaiae*, con trabajo adicional en CSIRO (Australia) que demuestra que son cepas diferentes.

Cepas de *P. bilaiae* fueron secuenciadas por MIDI Labs en Newark, DE usando cebadores universales a la región D2 del gen de ADNr 28S.

Cálculos de comparación filogenética fueron realizados utilizando el programa CLUSTAX para alinear la secuencia con otras especies cercanamente relacionadas indicadas por un análisis BLAST inicial de la secuencia.

Una vez fue creado el fichero de alineación múltiple, un árbol de Neighbor Joining fue construido, y una matriz de distancia fue calculada como la base para identificar el género y especie de la cepa.

Toda alineación y operaciones filogenéticas relacionadas fueron hechas en Mega 4.0. Las secuencias fueron importadas en Alignment Explorer en Mega, y luego alineadas usando ClustalW.

Un árbol filogenético fue construido usando bootstrapping para probar la robustez.

Identificaciones de las dos cepas fueron confirmadas como *Penicillium bilaiae* según la clasificación siguiente:

Reino	Hongos
Subreino	Dikarya
Filo	Ascomycota
Subfilo	Pezizomycotina
Clase	Eurotiomycetes
Subclase	Eurotiomycetidae
Orden	Eurotiales
Familia	Trichocomaceae
Subfamilia	Trichocomaceae mitosporico (anamórfico)
Género	<i>Penicillium</i>

Especie *bilaiae*

Ejemplo 2. Ensayos en campos del tratamiento de combinación

- 5 [0047] Ensayos en campos fueron establecidos en 2007 en cuatro lugares de EE.UU para filtrar el efecto de inoculación con cepas de solubilización de fosfato de *P. bilaiae* en el rendimiento cosechado de maíz. Los tratamientos incluyeron dos cepas de *P. bilaiae* individualmente y en combinación al igual que un control no inoculado.
- 10 [0048] Los ensayos fueron establecidos en cuatro lugares de EE.UU como bloques completos aleatorizados con 6 réplicas por ensayo. Los ensayos de EE.UU fueron conducidos por cuatro empresas de investigación independientes que cubrieron cuatro estados de EE.UU. Los proveedores y lugares de la investigación fueron Viger Ag Research (Fergus Falls, MN), Benson Research (York, NE), Northern Plains Ag (Gardner, ND), y South Dakota Ag Research (Centerville, SD).
- 15 [0049] El ensayo fue compuesto por cuatro tratamientos que incluyeron dos tratamientos de la única cepa de *Penicillium* NRRL 50169 (cepa P-201 de Novozymes) y NRRL 50162 (cepa P-208 de Australian), un tratamiento de cepa doble, y un control no inoculado.
- 20 Todas las cepas de *Penicillium* fueron formuladas como gránulos de turba.
- [0050] La producción de gránulos de turba fue conseguida por la inoculación del sustrato con una suspensión de esporas líquida. Los cultivos de *Penicillium* fueron tomados del almacenamiento a -80 °C y crecieron en el agar de dextrosa y patata. Las esporas fueron recogidas usando una varilla de vidrio para raspar la superficie de un cultivo de esporulación (obtenido después dos semanas de incubación a temperatura ambiente) en agua esterilizada modificada con 0.1 % v/v Tween 80.
- 25 La suspensión de esporas de la *Penicillium* spp. apropiada se añadió a gránulos de turba, que fueron luego mezclados íntegramente para conseguir una inoculación constante, almacenada en bolsas de papel revestidas de plástico, e incubadas durante 2 a 8 semanas a temperatura ambiente (aproximadamente 22 a 27 °C). Las bolsas fueron probadas y analizadas de forma aleatoria para aproximar las unidades formadoras de colonias fúngicas a cada grupo de gránulos inoculados. Brevemente, una serie de dilución fue hecha utilizando agua estéril modificada con 0.1% v/v Tween 80. Partes alícuotas de las diluciones fueron colocadas en placas en el agar de dextrosa y patata suplementado con Rosa de Bengala y clorotetraciclina.
- 30 Colonias fúngicas fueron contadas después de 3 a 5 días de incubación a aproximadamente 25 °C. Para tratamientos de combinación, gránulos inoculados fueron mezclados para conseguir una mezcla 1:1 de los aislados de *P. bilaiae* por título.
- 35 [0051] El establecimiento de una parcela de campo fue específico para cada sitio (ver tabla 1). El espaciado de fila de semilla fue 30 pulgadas, con 2 filas de maíz por parcela más dos filas de dispositivo de seguridad. La fertilización incluyó un programa de fertilidad de nitrógeno estándar (sitio específico), más 10 kg ha⁻¹ P₂O₅ aplicado con la semilla.
- 40 Cepas de *Penicillium* fueron formuladas como gránulos de turba y aplicadas en el surco a razón de 4.5 kg ha⁻¹ (2.07 a 2.17E+10 unidades formadoras de colonias ha⁻¹).
- 45

Tabla 1. Detalles de establecimiento de parcela de campo en cuatro lugares de EE.UU.

Sitio	Variedad de semilla	Tamaño de semilla (g 100 kernels ⁻¹)	Índice de siembra (semillas ac ⁻¹)	Tamaño de parcela
Fergus Falls, MN	DK 40-07	21.25	34,000	10 × 20 ft
York, NE	Cornhusker Hybrids 1	28.33	33,000	525 Ft ²
Gardner, ND	Mycogen 2K154	32.66	32,000	7.3 × 30 ft
Centerville, SD	NK 51-T8	29.46	28,000	10 × 30 ft

- 50 [0052] Análisis de ensayo combinado muestra rendimiento de maíz significativamente más alto en el tratamiento de combinación de *P. bilaiae* en comparación con el control no inoculado (figura 1). La combinación de *P. bilaiae* produjo en exceso cualquiera de las cepas de *P. bilaiae* cuando se usan como un tratamiento separado.
- 55 La combinación de cepas de *P. bilaiae* fue el tratamiento más impactante en el rendimiento de maíz en estos estudios.

Ejemplo 3. Solubilización de fosfatos insolubles

[0053] Cepas de solubilización de fosfato de *P. bilaiae* han sido incluidas en los experimentos de laboratorio que examinan la capacidad de estos organismos para solubilizar fosfatos de calcio insolubles.

El experimento consistió en dos cepas de *P. bilaiae* individualmente y en la combinación en dos concentraciones diferentes, al igual que un control no inoculado.

5 [0054] Hidroxiapatita fue pesada en matraces de Erlenmeyer de 300-mL a razón de 100 mg de P por matraz. Medios de sales mínimas fueron preparadas de la siguiente manera (g L⁻¹): 0.1 NaCl, 0.4 NH₄Cl, 0.78 KNO₃, 0.1 CaCl₂·2H₂O, 1.0 MgSO₄·7H₂O, 10.0 sacarosa. 100 mL de medio se añadió a cada matraz, y matraces fueron tapados con un tapón de espuma y sometidos a autoclave (121 °C y 1.2 atm durante 30 min).

10 Matraces triples fueron inoculados con caldos de espora líquidos a un índice de inoculación objetivo de 4.00E+06 esporas por matraz.

Para los tratamientos de combinación de *P. bilaiae*, los matraces fueron inoculados bien con 4.00E+06 esporas de cada cepa por matraz, o a una concentración de espora total de 4.00E+06 esporas por matraz (es decir, 2.00E+06 esporas por matraz de cada cepa).

15 Los matraces fueron incubados a temperatura ambiente en una coctelera giratoria ajustada a 175 r.p.m. Submuestras fueron recogidas asépticamente a 3, 5, 7, y 10 días después de la inoculación y analizadas para fosfato soluble utilizando un método verde de malaquita.

20 [0055] La combinación de cepas de *P. bilaiae* fue capaz de solubilizar significativamente más hidroxiapatita que cualquier cepa sola, como se indica por niveles de fosfato solubles aumentados, con índice de inoculación tienen poco a ningún efecto (figura 2).

Ejemplo 4. Ensayos en cámaras de crecimiento del tratamiento de combinación

25 [0056] Ensayos en cámaras de crecimiento fueron establecidos en 2009 para filtrar el efecto de inoculación con cepas de solubilización de fosfato de *P. bilaiae* en la acumulación de sustancia seca de semilla de soja y maíz. Los tratamientos incluyeron dos cepas de *P. bilaiae* individualmente y en combinación al igual que un control no inoculado.

30 [0057] Los ensayos fueron establecidos como factoriales aleatorizados con 8 réplicas por ensayo. Los dos factores fueron fertilizante de fosfato e inoculante. Niveles de fertilizante fueron equivalentes a 0, 20, 40, y 80 lb P₂O₅ ac⁻¹ para semilla de soja, y 0, 40, 80, y 160 lb P₂O₅ ac⁻¹ para maíz.

35 Tratamientos inoculantes fueron compuestos por un control no inoculado, dos tratamientos de la cepa única de *Penicillium* [NRRL 50169 (cepa P-201 de Novozymes) y NRRL 50162 (cepa P-208 de Australian)], y un tratamiento de cepa doble implicando cantidades iguales de ambas cepas de *Penicillium*.

40 [0058] Tarros de plástico fueron marcados según el tratamiento y un cuadrado estéril de tejido de paisaje negro fue colocado en el fondo de cada una para evitar que la mezcla de los tarros se filtraran a través de los agujeros de drenaje.

Los tarros fueron llenados con una mezcla 1:1 de arena de cuarzo industrial y vermiculita molida fina. Cada tarro fue tratado con el índice apropiado de suspensión de fosfato preparada usando hidroxiapatita, sellada dentro de una bolsa Ziploc, y se dejó equilibrar durante 7 días antes de su siembra.

45 [0059] Tratamientos inoculantes fueron aplicados como un tratamiento de semilla líquida. Cultivos de *Penicillium* fueron tomados de almacenamiento a -80 °C y crecidos en el agar de dextrosa y patata. Esporas fueron recogidas usando una varilla de vidrio para raspar la superficie de un cultivo de esporulación (obtenido después de dos semanas de incubación a temperatura ambiente) en agua esterilizada modificada con 0.1% v/v Tween 80.

50 Las suspensiones de esporas fueron tituladas, mezcladas íntegramente, y añadidas a grupos de semilla prepesados en bolsas de plástico a razón de 1.50E+05 unidades formadoras de colonias por semilla.

Para tratamientos de combinación, una mezcla 1:1 de aislados de *P. bilaiae* fue conseguida reduciendo a la mitad el volumen de suspensión de esporas requerido para alcanzar el índice de inoculación objetivo para cada cepa (es decir, el índice de inoculación final se mantuvo 1.50E+05). Los tratamientos de control no inoculados fueron tratados con agua esterilizada.

55 Las bolsas de plástico fueron selladas y agitadas enérgicamente durante 1 a 2 min para revestir uniformemente las semillas.

Las bolsas fueron reabiertas, y las semillas se dejaron secar durante 20 a 30 min antes de la siembra.

60 [0060] Semilla de soja y semillas de maíz fueron plantadas 5 por tarro. La solución de nutriente sin fosfato se añadió a los tarros en el momento de la siembra, y cada dos semanas para la duración del experimento.

Los tarros fueron colocados en la cámara de crecimiento con ajustes de día / noche de 16/8 h y 20/15 °C, y regadas según necesidad.

65 Los tarros fueron reducidos a tres semillas una a dos semanas después de la siembra. Las plantas fueron cosechadas aproximadamente 7 y 6 semanas después de la siembra para semilla de soja y maíz,

respectivamente.

Los brotes fueron quitados sobre la línea de tierra, se colocaron dentro de bolsas de papel prepesadas, y se secaron durante 10 d a 72 °C para determinar el peso del brote seco.

5 [0061] A través de todos los niveles fertilizantes, la semilla de soja mostró mayor acumulación de sustancia seca de brote en el tratamiento de la mezcla de *P. bilaiae* en comparación con el control no inoculado (figura 3). El tratamiento de la mezcla de *P. bilaiae* también se realizó mejor que cualquiera de las cepas de *P. bilaiae* solas.

10 [0062] El maíz mostró mayor acumulación de sustancia seca de brote en el tratamiento de la mezcla de *P. bilaiae* que el control no inoculado para todos los niveles fertilizantes (figura 4). El tratamiento de combinación de *P. bilaiae* también se realizó mejor que cualquiera de las cepas de *P. bilaiae* solas en los índices de fertilizante 40 y 80 lb P₂O₅ ac-1.

15 Depósito de Material biológico

[0063]

El siguiente material biológico ha sido depositado según las condiciones del tratado de Budapest con la Agricultural Research Service Patent Culture Collection, (NRRL) Northern Regional Research Center, 1815 N. University Street, Peoria, Illinois, 61604, USA, y se le dio el siguiente número de acceso:

20	<u>Depósito</u> <i>Penicillium bilaiae</i>	<u>Número de acceso</u> NRRL 50169	<u>Fecha de depósito</u> 28 de Agosto de 2008
----	-----------------------------------------------	---------------------------------------	--------------------------------------------------

El siguiente material biológico ha sido depositado según las condiciones del tratado de Budapest con la Agricultural Research Service Patent Culture Collection, (NRRL) Northern Regional Research Center, 1815 N. University Street, Peoria, Illinois, 61604, USA, y se le dio el número de acceso:

25	<u>Depósito</u> <i>Penicillium bilaiae</i>	<u>Número de acceso</u> NRRL 50162	<u>Fecha de depósito</u> 11 de Agosto de 2008
----	-----------------------------------------------	---------------------------------------	--------------------------------------------------

El siguiente material biológico ha sido depositado según las condiciones del tBudapest Treaty with Agricultural Research Service Patent Culture Collection (NRRL), Northern Regional Research Center, 1815 N. University Street, Peoria, Illinois, 61604, USA y se le dió el siguiente número de acceso:

25	<u>Depósito</u> <i>Penicillium gaestrivorus</i>	<u>Número de acceso</u> NRRL 50170	<u>Fecha de depósito</u> 28 de Agosto de 2008
----	----------------------------------------------------	---------------------------------------	--------------------------------------------------

30 [0064] Las cepas han sido depositadas bajo condiciones que aseguran que el acceso al cultivo estarán disponibles durante la pendencia de esta solicitud de patente a una determinada por las leyes de patente extranjeras a las que tendrá derecho.

El depósito representa un cultivo sustancialmente puro de la cepa depositada.

35 El depósito está disponible según sea necesario por las leyes de patente extranjeras en países donde duplicados de la solicitud en cuestión, o su descendiente son solicitados.

Sin embargo, se debe entender que la disponibilidad de un depósito no constituye una licencia para poner en práctica la presente invención en derogación del derecho resultante de las patentes concedidas por acción gubernamental.

ES 2 601 199 T3

PCT

Original (para presentación)

0-1	De PCT/RO/134 /SAFE) Indicaciones referentes a microorganismo(s) depositado(s) u otra materia biológica (regla PCT 13bis)	
0-1-1	preparado usando	PCT-SAFE [Modo EASY] Versión 3.51.041.217 MT/FOP 20090701/0.20.5.17
0-2	Solicitud internacional N°	
0-3	referencia del expediente del solicitante o agente	05015194-21P
1	Las indicaciones a continuación se refieren al(los) microorganismo(s) depositado(s) o su materia biológica a la que se hace referencia en la descripción en:	
1-1	página	13
1-2	línea	22-27
1-3	Identificación de depósito	
1-3-1	Nombre de institución depositaria	NRRL Agricultural Research Service Culture Collection
1-3-2	Dirección de Institución depositaria	1815 North University Street, Peoria, Illinois 61604, Estados Unidos
1-3-3	Fecha de depósito	28 de agosto de 2008 (28.08.2008)
1-3-4	Número de acceso	NRRL 50169
1-4	Indicaciones adicionales	El solicitante por la presente solicita que la Oficina Designada solo autorice la provisión de una muestra de la materia biológica depositada a un experto independiente, cuando sea aplicable.
1-5	Estados designados para los cuales se dan indicaciones	Todas las designaciones
2	Las indicaciones a continuación se refieren al(los) microorganismo(s) depositado(s) o su materia biológica a la que se hace referencia en la descripción en:	
2-1	página	13
2-2	línea	29-34
2-3	Identificación de depósito	
2-3-1	Nombre de institución depositaria	NRRL Agricultural Research Service Culture Collection
2-3-2	Dirección de Institución depositaria	1815 North University Street, Peoria, Illinois 61604, Estados Unidos
2-3-3	Fecha de depósito	28 de agosto de 2008 (28.08.2008)
2-3-4	Número de acceso	NRRL 50162
2-4	Indicaciones adicionales	El solicitante por la presente solicita que la Oficina Designada solo autorice la provisión de una muestra de la materia biológica depositada a un experto independiente, cuando sea aplicable.
2-5	Estados designados para los cuales se dan indicaciones	Todas las designaciones
3	Las indicaciones a continuación se refieren al(los) microorganismo(s) depositado(s) o su materia biológica a la que se hace referencia en la descripción en:	

ES 2 601 199 T3

3-1	página	14
3-2	línea	1-6
3-3	Identificación de depósito	
3-3-1	Nombre de institución depositaria	NRRL Agricultural Research Service Culture Collection
3-3-2	Dirección de Institución depositaria	1815 North University Street, Peoria, Illinois 61604, Estados Unidos
3-3-3	Fecha de depósito	28 de agosto de 2008 (28.08.2008)
3-3-4	Número de acceso	NRRL 50170
3-4	Indicaciones adicionales	El solicitante por la presente solicita que la Oficina Designada solo autorice la provisión de una muestra de la materia biológica depositada a un experto independiente, cuando sea aplicable.
3-5	Estados designados para los cuales se dan indicaciones	Todas las designaciones
PARA USO ÚNICO DE LA OFICINA RECEPTORA		
0-4	Este formulario fue recibido con la solicitud internacional (sí o no)	
0-4-1	Oficial autorizado	(firma ilegible)
PARA USO ÚNICO DE OFICINA INTERNACIONAL		
0-5	Este formulario fue recibido por la Oficina Internacional en:	
0-5-1	Oficial autorizado	

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método para aumentar la disponibilidad de fósforo para absorción de la planta del suelo, este método comprende la introducción en el suelo inóculos de las dos cepas del hongo *Penicillium* NRRL 50169 y NRRL 50162, para liberar la absorción de la planta dicho fósforo de una fuente del mismo seleccionado del grupo consistente en fuentes originalmente presentes en la tierra, fuentes añadidas al suelo como modificaciones y combinaciones de los mismos.
- 10 2. Método según la reivindicación 1, donde dicha fuente de fósforo comprende una fuente de fósforo nativa a dicho suelo.
3. Método según la reivindicación 1, donde una fuente de fósforo se añade a dicho suelo.
4. Método según la reivindicación 3, donde dicha fuente es fosfato de roca.
- 15 5. Método según la reivindicación 3, donde dicha fuente es un fertilizante fabricado.
6. Método según la reivindicación 5, donde dicho fertilizante fabricado es seleccionado del grupo consistente en fosfato de monoamonio, fosfato super triple, fosfato de diamonio, superfosfato ordinario y polifosfato de amonio.
- 20 7. Método según la reivindicación 3, donde dicha fuente de fósforo es orgánica.
8. Método según la reivindicación 7, donde dicha fuente orgánica de fósforo es de harina de huesos, harina de carne, estiércol animal, compost, lodo residual, o guano.
- 25 9. Método según la reivindicación 1, donde dichos inóculos se agregan al suelo en una cantidad de 10^6 a 10^{11} unidades formadoras de colonias por hectárea.
- 30 10. Método según la reivindicación 1, donde dicho recubrimiento comprende 10^2 - 10^6 unidades formadoras de colonias por semilla.
11. Método de mejora de las condiciones de crecimiento de plantas, que comprende crecimiento de las plantas en suelo que contiene, en la proximidad a las raíces de la planta, una fuente de fósforo y las dos cepas del hongo *Penicillium* NRRL 50169 y NRRL 50162.
- 35 12. Método según la reivindicación 11, donde las plantas son seleccionadas del grupo consistente en cereales, legumbres, *Brassica* spp., frutas, verduras, frutos secos, flores, y turba.
- 40 13. Composición para aplicación en el suelo, que comprende:
i) inóculos de las dos cepas del hongo *Penicillium* NRRL 50169 y NRRL 50162, y
ii) un portador compatible con el suelo para el hongo.
14. Composición según la reivindicación 13, donde dicho portador compatible con el suelo comprende un líquido con un nutriente para el hongo.
- 45 15. Composición según la reivindicación 13, en forma de un recubrimiento para semillas de planta.
16. Semilla de planta teniendo un recubrimiento que comprende inóculos de las dos cepas del hongo *Penicillium* NRRL 50169 y NRRL 50162, y por lo tanto un portador compatible con el suelo sólido.

50

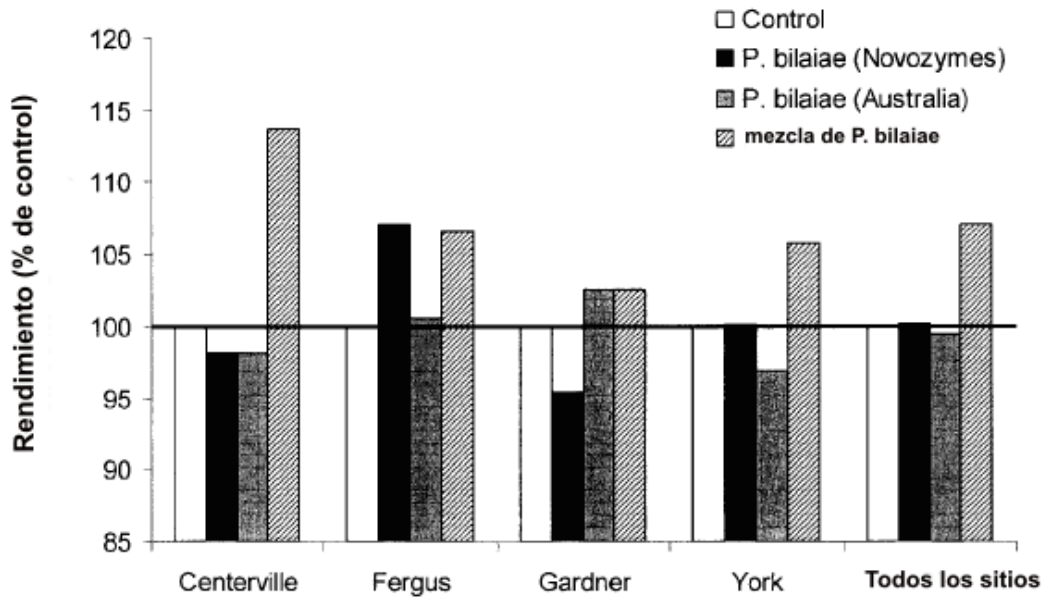


Figura 1

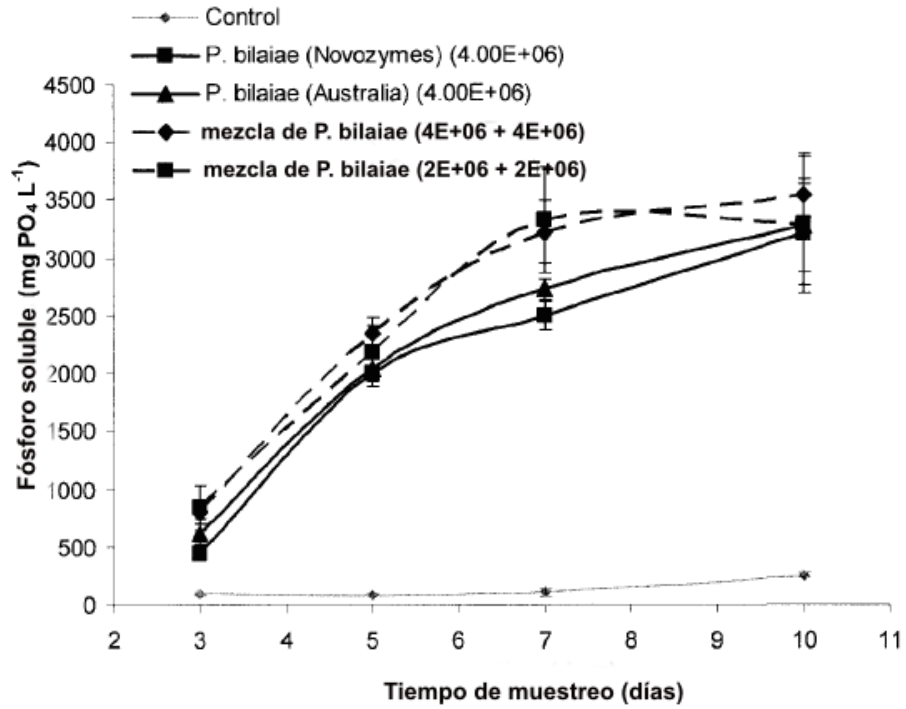


Figura 2

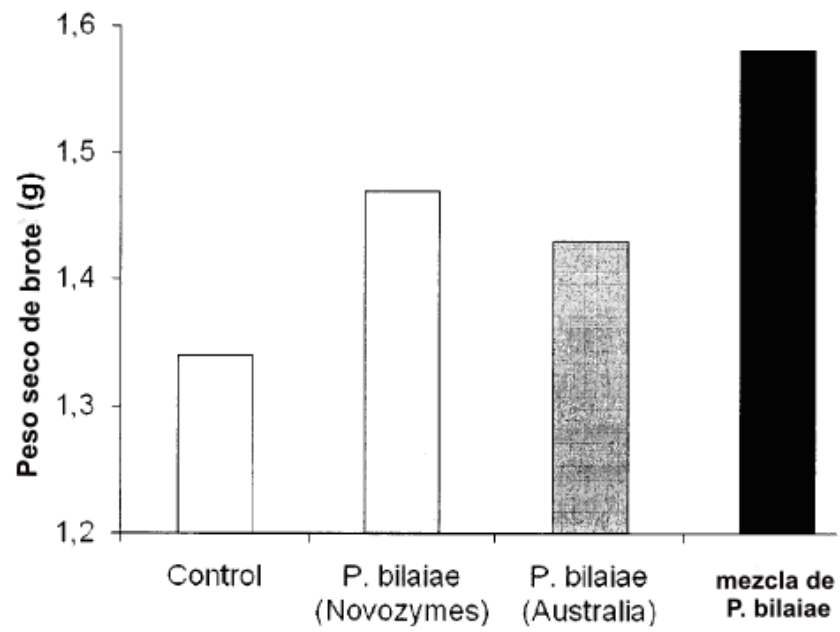


Figura 3

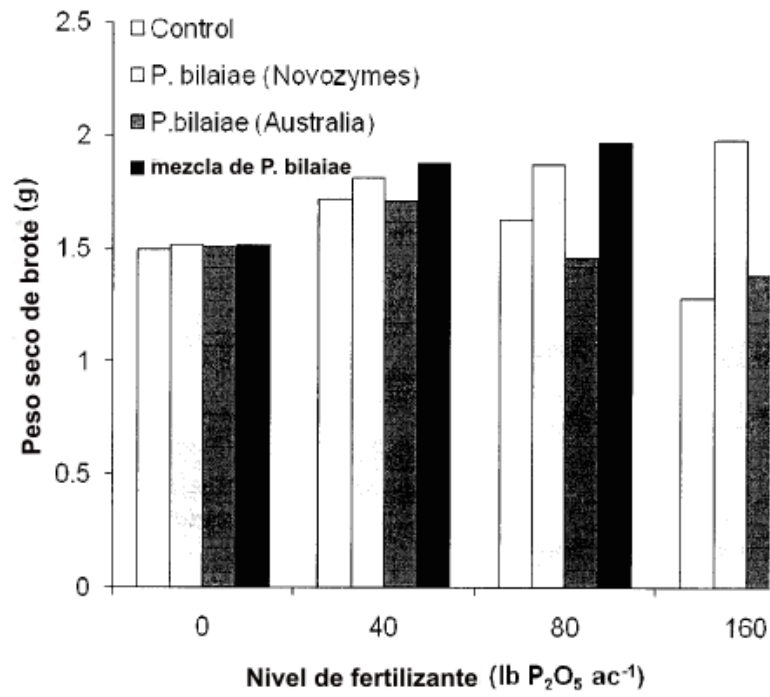


Figura 4