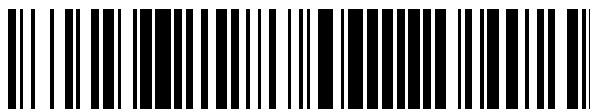


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 707 807**

51 Int. Cl.:

A01G 29/00 (2006.01)

A01N 63/02 (2006.01)

C12N 1/20 (2006.01)

C12R 1/38 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.12.2010** **PCT/SE2010/051468**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.06.2011** **WO11078783**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.12.2010** **E 10839904 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.11.2018** **EP 2525648**

54 Título: **Nueva pseudomona fluorescente de la especie Pseudomonas azotoformans para la estimulación de la emergencia y el crecimiento de las plantas**

30 Prioridad:

22.12.2009 US 289058 P

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

05.04.2019

73 Titular/es:

KOPPERT B.V. (100.0%)
Veilingweg 14
2651 BE Berkel en Rodenrijs, NL

72 Inventor/es:

LEVENFORS, JOLANTA;
FOLKESON WELCH, CHRISTOPHER;
FATEHI, JAMSHID;
WIKSTRÖM, MARIANN;
RASMUSSEN, SARA y
HÖKEBERG, MARGARETA

74 Agente/Representante:

CONTRERAS PÉREZ, Yahel

ES 2 707 807 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

Nueva pseudomona fluorescente de la especie *Pseudomonas azotoformans* para la estimulación de la emergencia y el crecimiento de las plantas

5

Campo de la invención

La presente invención se refiere al campo de la promoción de la emergencia y el crecimiento de las plantas. Más específicamente, la invención se refiere a una nueva cepa de *Pseudomonas azotoformans*, denominada F30A, que se ha depositado en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH y a la que se le ha asignado el número de acceso DSM 22077, su uso como agente promotor de la emergencia y el crecimiento de las plantas, y las composiciones y métodos para tal uso.

10

Antecedentes de la invención

15

Las bacterias de la rizosfera (rizobacterias) con efectos beneficiosos sobre el crecimiento de las plantas a menudo se denominan PGPR (Rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas) y benefician a la planta de cultivo durante varias etapas de su crecimiento desde la siembra/plantación hasta la cosecha. En numerosos estudios, se ha demostrado que las pseudomonas fluorescentes del suelo y la rizosfera ejercen efectos promotores del crecimiento de las plantas en varios cultivos agrícolas (Kloepper *et al.*, 1980 a, b; Brisbane *et al.*, 1989; DeFreitas y Germida 1991) y también inhiben el desarrollo de enfermedades de plantas (Hemning, 1990, O'Sullivan y O'Gara, 1992, Weller, 1988, Hökeberg *et al.*, 1997).

20

En condiciones experimentales, se han verificado que varias pseudomonas fluorescentes son agentes potenciales para aumentar la emergencia y el rendimiento de cultivos agrícolas, como el trigo (Kropp *et al.*, 1996), la mostaza (Deshwal *et al.*, 2006), la remolacha azucarera (Suslow y Schroth 1982), la patata (Kloepper *et al.*, 1980; Howie y Echandi, 1983), rábano (Kloepper y Schroth 1978; Davies and Whitbread 1989) y las espinacas (Urashima *et al.*, 2006). Varios mecanismos relacionados con su actividad de promoción del crecimiento de las plantas están bien estudiados y descritos. Estos, entre otros, incluyen la capacidad de colonización de las raíces (Benizri *et al.*, 2001), la capacidad de producir una amplia gama de enzimas y hormonas (Vivekananthan *et al.*, 2004; Lucy *et al.*, 2004, Patten y Glick 1996; Garcia de Salamone *et al.*, 2001), así como otros metabolitos con actividad a menudo antimicrobiana (Loper y Buyer 1991; Dowling y O'Gara 1994). También existen ejemplos de patentes/solicitudes de patentes que cubren diferentes áreas de su actividad e implican principalmente cepas/aislados con propiedades de control biológico. Las patentes/solicitudes de patente de pseudomonas fluorescentes con propiedades promotoras del crecimiento de las plantas contemplan con mayor frecuencia un componente activo (cepa bacteriana) de la invención en combinación con la descripción de los métodos de detección y prueba necesarios para seleccionar el o los aislados deseados. Las siguientes solicitudes de patente proporcionan algunos ejemplos de las invenciones que cubren pseudomonas fluorescentes con propiedades promotoras del crecimiento de las plantas y/o control biológico: WO/1987/000194, US1996/5503652, WO0051435, US1996/5503651, US2002/6447770 y US2002/6495362. Además, la patente US-6.048.713 divulga una cepa de *Pseudomonas fluorescens* que tiene propiedades antagónicas contra hongos patógenos de diferentes géneros y cepas específicas que también pueden promover el crecimiento de las plantas. El documento US2003/0054959 divulga un agente de control biológico y composiciones que comprenden al menos una cepa de *Pseudomonas* que exhibe actividad supresora de malezas. El documento WO 03/016241 divulga microorganismos para el tratamiento del suelo, tales como cepas de *Pseudomonas fluorescens*. La patente US-4.849.008 se refiere a las bacterias promotoras del crecimiento de los cultivos de raíces del género *Pseudomonas*.

35

40

45

A pesar de la bibliografía y las patentes/solicitudes de patentes enumeradas anteriormente, hasta el momento no hay otro aislado que pertenezca a la especie de *Pseudomonas azotoformans* que se haya visto y haya demostrado que puede mejorar continuamente la emergencia, el crecimiento y el rendimiento de muchos cultivos agrícolas importantes durante varios años de experimentos de campo. Por el contrario, un aislado originario del suelo previamente estudiado de *Pseudomonas azotoformans* no mostró ningún efecto promotor del crecimiento significativo en experimentos con arroz (Piao *et al.*, 2005). La única información breve sobre las propiedades promotoras del crecimiento de plantas de aislados de *Pseudomonas azotoformans*, que concierne a las comunidades bacterianas asociadas a los rizomas de rodales sanos en el lago Velencei, Hungría (Micsinai *et al.*, 2003), no se basa en ningún dato experimental que confirme sus propiedades promotoras del crecimiento de las plantas.

55

Sumario de la invención

60

El objeto de la presente invención es proporcionar una nueva cepa de una pseudomona fluorescente, que expresa la emergencia de la planta y/o la promoción del crecimiento de la planta en varios cultivos de importancia agrícola. Este objeto se obtiene por el excepcional aislado de pseudomonas fluorescentes de la especie *Pseudomonas azotoformans*, denominada cepa F30A. Nunca se había descrito en las cepas de *Pseudomonas azotoformans* propiedades promotoras del crecimiento de las plantas. Este aislado proporciona una importante emergencia de la

65

planta y la promoción del crecimiento después de que se aplica a diferentes cultivos, que se cultivan, tanto en condiciones de invernadero como de campo. Además, según los datos disponibles en la bibliografía, su efecto es sistemáticamente más estable y repetible que cualquier otro agente microbiano promotor del crecimiento vegetal previamente documentado. Una cepa biológicamente pura de *Pseudomonas azotoformans*, la cepa F30A, se ha depositado en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH y a la que se le ha asignado el número de acceso DSM 22077.

Por lo tanto, la invención se refiere a una cepa biológicamente pura de *Pseudomonas azotoformans*, cepa F30A, que se ha depositado en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH y a la que se le ha asignado el número de acceso DSM 22077. La invención también se refiere al uso de un cultivo de una cepa biológicamente pura de *Pseudomonas azotoformans*, cepa F30A, que se ha depositado en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH y a la que se le ha asignado el número de acceso DSM 22077, para producir un sobrenadante de cultivo.

La invención también se refiere al uso de la cepa biológicamente pura de *Pseudomonas azotoformans*, cepa F30A para estimular la germinación de las semillas, la emergencia de las plantas y/o el crecimiento de las plantas. Dicha semilla y/o planta puede ser, por ejemplo, dicotiledónea o monocotiledónea.

Con la cepa biológicamente pura de *Pseudomonas azotoformans*, cepa F30A, también se puede producir un producto de fermentación.

La invención también se refiere a una composición agrícola que comprende una cepa biológicamente pura de *Pseudomonas azotoformans*, cepa F30A, opcionalmente en combinación con uno o más vehículos líquidos y/o sólidos. La composición agrícola puede comprender además uno o más microorganismos promotores del crecimiento vegetal adicionales, microorganismos de biocontrol, fertilizantes orgánicos y/o agroquímicos.

La invención se refiere además a un método para mejorar la germinación de semillas, la emergencia de plantas y/o el crecimiento de plantas que comprende la etapa de aplicar un producto de fermentación o una composición agrícola como se define aquí a una semilla, una planta y/o el entorno que rodea dicha semilla o planta. La aplicación puede hacerse, por ejemplo, en las raíces de una planta. La aplicación puede realizarse antes y/o después de la emergencia de las raíces de las plantas. El producto de fermentación o la composición agrícola pueden aplicarse de otra forma alternativa a unidades de propagación vegetativa de plantas. El producto de fermentación o la composición agrícola también pueden aplicarse a unidades de propagación vegetativa de plantas o a medios de cultivo de plantas que rodean semillas y/o plantas. La planta puede ser, o la semilla puede desarrollarse para dar lugar a una planta monocotiledónea o una planta dicotiledónea.

La invención también se refiere a un método para preparar una composición agrícola como se define en la presente memoria, que comprende la etapa de mezclar dicha *Pseudomonas azotoformans*, cepa F30A, o dicho sobrenadante con uno o más vehículos líquidos o sólidos y, opcionalmente, uno o más microorganismos promotores del crecimiento vegetal adicionales, microorganismos de control biológico, fertilizantes orgánicos y/o productos agroquímicos.

Breve descripción de los dibujos

Fig. 1. Posición taxonómica del aislado F30A en comparación con las cepas que representan 25 especies diferentes de *Pseudomonas* y con una cepa de referencia de *E. coli* (Gene Bank número de acceso J01695) basada en la alineación de 1390 nucleótidos del ADNr 16S.

Fig. 2. Emergencia (A) y peso seco (B) de trigo de primavera (lote de semillas no infectadas) después de la aplicación en las semillas del producto de fermentación F30A y su sobrenadante en diferentes concentraciones. Experimento de invernadero. Los cuadrados indican UFC por ml. Las barras de error representan el error estándar de la media (n = 4).

Fig. 3. Emergencia (A) y peso seco (B) del trigo de primavera (lote de semillas no infectadas) después de la aplicación en las semillas del producto de fermentación F30A en diferentes concentraciones y de las células F30A suspendidas en solución salina fisiológica. Experimento de invernadero. Los cuadrados indican UFC por ml. Las barras de error representan el error estándar de la media (n = 4).

Fig. 4. Emergencia de espinacas después de la aplicación en las semillas del producto de fermentación F30A a diferentes concentraciones, las células F30A suspendidas en agua del grifo y el sobrenadante aislado. Resultados de dos lotes de productos de fermentación diferentes: lote FOM115 (A) y lote FOM139 (B). Experimento de invernadero. Los cuadrados indican UFC por ml. Las barras de error representan el error estándar de la media (n = 4).

Fig. 5. Rendimiento de masa verde de lechuga iceberg después de la aplicación a la raíz/suelo del producto de fermentación F30A en diferentes concentraciones y después de la aplicación de su sobrenadante. Se utilizaron dos lotes de productos de fermentación diferentes: lote FOM173 (A) y lote FOM176 (B). (A) y (B) representan dos experimentos de invernadero independientes. Los cuadrados indican UFC por ml. Las barras de error representan el error estándar de la media (n = 12).

Fig. 6. Rendimiento de masa verde de lechuga iceberg después de la aplicación a la raíz/suelo de lotes de productos de fermentación almacenados de F30A. El lote FOM203 se almacenó a 4 °C durante 2 semanas, el lote FOM196 durante 6 semanas y el lote FOM192 durante 14 semanas. Experimento de invernadero. Los cuadrados indican UFC por ml. Las barras de error representan el error estándar de la media (n = 12).

Fig. 7. Rendimiento de fruto de pimiento después de la aplicación a la raíz/suelo del producto de fermentación F30A (lote FOM076) en diferentes concentraciones. Experimento de invernadero. Los cuadrados indican UFC por ml. Las barras de error representan el error estándar de la media (n = 8).

Fig. 8. Tratamiento de suelo/raíz de lechuga iceberg. Maceta izquierda: control de agua; maceta derecha: F30A producto de fermentación.

Fig. 9. Emergencia de espinacas en un experimento de campo después de la aplicación a semillas del producto de fermentación F30A (lote FOM233). La emergencia se registró en tres ocasiones diferentes. El porcentaje de aumento/disminución de la emergencia, en comparación con el control no tratado, se indica en la figura. Las barras de error representan el error estándar de la media (n = 4).

Fig. 10. Rendimiento de espinacas en un experimento de campo después de la aplicación a semillas del producto de fermentación F30A (lote FOM233). El rendimiento se midió en dos puntos de tiempo diferentes. Las barras de error representan el error estándar de la media (n = 4).

Fig. 11. Rendimiento de rúcula (barras) en dos ocasiones y emergencia (cuadrados) después de la aplicación a semillas del producto de fermentación F30A (lote FOM154) en el experimento de campo. Las barras de error representan el error estándar de la media (n = 12).

Fig. 12. Rendimiento de guisantes después de la aplicación a semillas del producto de fermentación F30A (lote FOM150) en el experimento de campo. Las barras de error representan el error estándar de la media (n = 4).

Fig. 13. Rendimiento de zanahoria después de la aplicación a semillas del producto de fermentación F30A (lote FOM076) en el experimento de campo. Las barras de error representan el error estándar de la media (no tratado: n = 9; agua: n = 12; F30A: n = 6).

Fig. 14. Rendimiento de lechuga iceberg después de la aplicación a la raíz/suelo del producto de fermentación F30A (lote FOM233) en el experimento de campo. Las barras de error representan el error estándar de la media (n = 5).

Fig. 15. Número de flores de fresa después de la aplicación a la raíz/suelo del producto de fermentación F30A (lotes FOM095 y FOM147) en el experimento de campo. Barras oscuras: F30A; Barras claras: control tratado con agua. Las barras de error representan el error estándar de la media (n = 4).

Fig. 16. Rendimiento de fresas después de la aplicación a la raíz/suelo del producto de fermentación F30A (lotes FOM095 y FOM147) en el experimento de campo. Barras oscuras: F30A; Barras claras: control tratado con agua. Las barras de error representan el error estándar de la media (n = 4).

Fig. 17. Rendimiento de brócoli después de la aplicación a la raíz/suelo del producto de fermentación F30A (lote FOM076) en el experimento de campo. Barras oscuras: F30A; Barras claras: control tratado con agua. Las barras de error representan el error estándar de la media (n = 5).

Fig. 18. Rendimiento de col de verano después de la aplicación a la raíz/suelo del producto de fermentación F30A en el experimento de campo. Barras oscuras: F30A; Barras claras: control tratado con agua; cuadrados: porcentaje de rendimiento comercializable (> 350 gramos). Las barras de error representan el error estándar de la media (n = 50).

Fig. 19. Desarrollo de la planta y rendimiento de tubérculos de patata nueva después de la aplicación al tubérculo del producto de fermentación F30A en un experimento de campo. Los medios con letras diferentes son significativamente diferentes, de acuerdo con la prueba de rango múltiple de Duncan (p = 0,05).

Fig. 20. Rendimiento relativo de tubérculos en una variedad de patata nueva y en uno de patata tardía, después de la aplicación al tubérculo del producto de fermentación F30A y una formulación húmeda del aislado. Datos de

experimentos de campo. Los medios con letras diferentes son significativamente diferentes, de acuerdo con la prueba de rango múltiple de Duncan ($p = 0,05$).

- Fig. 21. Estimulación del crecimiento de la raíz y brotes de plántulas de 10 semanas de edad de pino silvestre, después del tratamiento con el producto de fermentación del aislado F30A (a la derecha) en comparación con la plántula no tratada (a la izquierda).

Descripción detallada de la invención:

10 Agente promotor del crecimiento de plantas de la invención

La presente invención se refiere a una nueva cepa de *Pseudomonas azotoformans*, cepa F30A, que se depositó el 3 de diciembre de 2008 en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Inhoffenstraße 7B; D-38124 Braunschweig; Alemania) y a la que se le ha asignado el número de acceso DSM 22077. El depositante es
 15 Lantmännen BioAgri AB (PO Box 914; 751 09 Uppsala; Suecia). La cepa F30A de la invención es una cepa biológicamente pura.

La nueva cepa de *Pseudomonas azotoformans*, cepa F30A, se indica a continuación como el “aislado”, el “agente” o *Pseudomonas azotoformans* F30A. *Pseudomonas azotoformans* puede abreviarse en lo sucesivo como *P.*
 20 *azotoformans*. *Pseudomonas azotoformans*, cepa F30A, puede indicarse simplemente como “F30A”.

El crecimiento de la planta que promueve *Pseudomonas azotoformans* F30A de la invención comprende una cepa biológicamente pura de una *Pseudomonas* fluorescente, que tiene las siguientes características identificativas específicas: (i) el aislado es una bacteria gramnegativa asociada a la raíz, un miembro del linaje de *P. fluorescens* y
 25 tiene un perfil de utilización específico de Biolog GM distinto al de los parientes más cercanos; los caracteres de selección e identificación se presentarán más adelante; (ii) el aislado tiene otros caracteres morfológicos, bioquímicos y metabólicos únicos que se describen más adelante, así como una capacidad de fijación de nitrógeno, solubilización de fósforo y solubilización/oxidación de azufre; (iii) el aislado estimula la germinación de las semillas, el crecimiento de la planta y/o el rendimiento de al menos los cultivos agrícolas pertenecientes a las siguientes familias
 30 de plantas: *Amaranthaceae*, *Brassicaceae*, *Solanaceae*, *Astraceae*, *Apiaceae*, *Fabaceae*, *Rosaceae*, *Cucurbitaceae*, *Lamiaceae*, *Aliaceae*, además de estimular la formación de raíces y el crecimiento de las plántulas de árboles en viveros. Los ejemplos detallados de tales efectos se darán a continuación.

El aislado de la invención tiene las siguientes características identificativas adicionales: en presencia del aislado de
 35 crecimiento activo, el o los pigmentos de color verde oscuro a casi negro se acumulan en medios de cultivo orgánico (agar PF, medio líquido con peptona de soja, peptona de trigo y otras peptonas de plantas como sustratos base) y/o el o los pigmentos azul verdoso se acumulan en medios de cultivo mineral suplementados con glicerol (por ejemplo, medio Lemna (Maeng y Khudairi, 1973). Esta acumulación de pigmento no se ha descrito en ninguna otra *pseudomonas*. Además, el aislado tiene un carácter bioquímico único con un perfil de utilización de carbohidratos
 40 específico probado por el sistema Biolog GN, que difiere del tipo de la cepa *Pseudomonas azotoformans* y de otras *pseudomonas* fluorescentes relacionadas más cercanas.

La selección del aislado de la invención comenzó con la recolección de muestras de plantas completas, incluidas las raíces. Las diluciones de la muestra se obtuvieron de trozos de raíz y se sembraron en placas en medios adecuados
 45 para el aislamiento de bacterias. Se recolectaron las colonias bacterianas con diferentes caracteres morfológicos y se mantuvieron como reserva a -80°C . Los cultivos líquidos en sustratos microbiológicos adecuados se obtuvieron de las reservas y se seleccionaron las propiedades promotoras del crecimiento de las plantas mediante bioensayo(s) de invernadero con semillas de trigo y remolacha azucarera inoculadas con aislados individuales. Se seleccionaron los aislados que estimulaban la germinación y el crecimiento de las plantas, se identificaron y se realizó una
 50 evaluación primaria de la seguridad para confirmar su factibilidad para experimentos de invernadero y de campo a gran escala.

Basado en el conjunto de caracteres morfológicos, bioquímicos y genéticos, el aislado seleccionado de la invención es una bacteria flagelada gramnegativa y un miembro del linaje de *P. fluorescens*, identificado como una especie de
 55 *Pseudomonas azotoformans* (Figura 1). Sin embargo, tiene un perfil de utilización único del sistema Biolog GN en comparación con el tipo de cepa de *Pseudomonas azotoformans* IAM1603 y otras especies de *Pseudomonas* estrechamente relacionadas (Tabla 1). En combinación con los rasgos enumerados en la Tabla 1, las siguientes características son muy específicas de la cepa de la invención: utiliza sacarosa y ácido sebácico, mientras que los miembros de las tres especies relacionadas más cercanas no, y no utiliza xilitol ni putrescina, que son utilizados por
 60 los miembros de las tres especies relacionadas más cercanas.

Tabla 1

Caracteres bioquímicos cruciales que diferencian el aislado F30A de las cepas de tipo estrechamente relacionadas de <i>Pseudomonas azotoformans</i> , <i>P. libanensis</i> y <i>P. synxantha</i> .				
Carácter	F30A	<i>P. azotoformans</i> IAM1603	<i>P. libanensis</i> CCM4841	<i>P. synxantha</i> LMG2190
Reducción de nitrato	-	nt	+ ^a	+ ^a
Lecitinasa	+	nt	+ ^a	d ^a
Formación de levano a partir de sacarosa	+	nt	+ ^a	- ^a
Utilización de i-eritritol	+	+	+	-
Sacarosa	+	-	-	-
Xilitol	-	+	+	+
Ácido acético	+	+	+	-
Ácido cis-acetónico	+	+	+	-
Ácido fórmico	+	-	+	+
Lactona del ácido D-galactónico	+	+	+	-
Ácido α-hidroxibutírico	-	+	+	+
Ácido γ-hidroxibutírico	-	+	-	-
Ácido α-cetobutírico	-	+	-	-
Ácido α-cetovalérico	-	-	-	+
Ácido sebácico	+	-	-	-
Ácido succinámico	-	-	+	+
Glucuronamida	+	-	-	-
Ácido glicil-L-aspartico	-	-	-	+
L-histidina	+	+	+	-
D-serina	-	-	-	+
L-treonina	+	+	-	+
Ácido urocánico	+	+	+	-
Putrescina	-	+	+	+
a Los datos tomados de Dabboussi et al. (1999) se basan en caracteres de varias cepas y no solo en la cepa LMG2190, que se usó como referencia para la prueba Biolog realizada en los laboratorios MASE; (-) negativo, (+) positivo, (d) divergente, nt (no probado)				

- Otros caracteres útiles que permiten la identificación del aislado de la invención son la morfología específica de las colonias en medios de cultivo bacteriológicos comunes, tales como: VPA - Agar de peptona vegetal (10 g de caldo de peptona vegetal (Oxoid Ltd.), 15 g de agar granulado (Difco Ltd) en 1000 ml de agua destilada/desionizada); Agar PF (Difco Ltd, 38 g de medio de mezcla listo PF, 10 g de glicerol en 1000 ml de agua destilada/desionizada), acumulación de los pigmentos únicos descritos anteriormente.
- 10 El aspecto característico de la colonia del aislado de la invención es el mejor pronunciado después de 24 h de incubación a la temperatura de 30 °C, seguido de una incubación adicional de 24-48 h a temperatura ambiente (alrededor de 20-22 °C). Cuando se cultivan con VPA, los bordes de las colonias generalmente son desiguales y la colonia es ligeramente más alta y más densa en el medio. Las colonias son compactas, transparentes, no viscosas, más densas y de color marrón en el centro, con un color azulado más claro en los bordes y tienen una forma típica
- 15 que se asemeja a una estructura similar a una concha.

También se observan caracteres de la colonia únicos que diferencian el aislado de la invención de otros aislados de pseudomonas fluorescentes en agar PF después de 5 a 8 días de incubación a temperatura ambiente. Las colonias son de color blanco grisáceo con una pequeña punta muy clara de color marrón amarillento en el medio y bordes

20 bastante regulares.

Durante el cultivo del aislado de la invención en agar PF, el o los pigmentos de color verde intenso a casi negro se acumulan en el agar.

- En ensayos de laboratorio, el aislado de la invención crece en un medio mineral líquido modificado para *Pseudomonas* (Stanier *et al.*, 1966) sin nitrógeno disponible pero suplementado con 2 % de la fuente de carbono adecuada (por ejemplo, glicerol), lo que indica su capacidad de fijación del nitrógeno atmosférico. El medio líquido se inocula con un asa de las células bacterianas cultivadas durante la noche del aislado de la invención o las células se suspenden en sulfato de magnesio 0,01 M y se añade al medio mineral la suspensión de células (0,1 ml por 5 ml de medio líquido). El crecimiento se controla mediante mediciones de la densidad óptica (600 nm) hasta 5 días después de la inoculación. La densidad óptica después de 5 días es respectivamente 0,108 (inoculación con asa) en comparación con 0,069 al inicio del cultivo y 0,087 (suspensión celular) en comparación con 0,046 al inicio del cultivo. Las mediciones indican la capacidad de proliferación lenta del aislado en ausencia de nitrógeno, lo que a su vez indica que el aislado de la invención tiene la capacidad de fijación del nitrógeno.
- Además, el aislado de la invención solubiliza el fósforo y oxida el tiosulfato y solubiliza el azufre elemental. Los ensayos se realizan inoculando el aislado de la invención en placas de agar suplementadas con fósforo insoluble ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) o con tiosulfato/azufre elemental. Como efecto de la solubilización/oxidación de elementos insolubles, se forman áreas claras alrededor de las colonias del aislado de la invención.
- Una ventaja de aplicar el aislado de PGPR de la invención perteneciente a la especie de *Pseudomonas azotoformans*, en lugar de utilizar aislados de la especie *Pseudomonas fluorescens*, es que los miembros de la especie *P. azotoformans* nunca han sido descritos como posibles patógenos humanos. Por el contrario, existen informes de patogenicidad de *P. fluorescens* para los seres humanos (véase, por ejemplo, Franzetti *et al.*, 1992, Hsueh *et al.*, 1998; Wei *et al.*, 2002).

25

Crecimiento y mantenimiento del aislado de invención

- El aislado fluorescente de pseudomona de la invención (*Pseudomonas azotoformans* F30A) se puede cultivar en cualquier medio bacteriológico adecuado común (tanto sólido como líquido). Algunos ejemplos de medios solidificados adecuados son Agar de peptona vegetal (VPA) y Agar de *Pseudomonas* F (Agar PF). Ejemplos de medios líquidos son el caldo de peptona vegetal y todos los medios con peptona de soja como una fuente importante de carbono orgánico. En condiciones de laboratorio, el aislado de la invención crece bien a cualquier temperatura adecuada para pseudomonas fluorescentes ambientales típicas, es decir, de 15 °C a 30 °C; preferiblemente en el rango de temperatura de 23 a 27 °C. Su crecimiento se retarda en más del 90 % a la temperatura de 37 °C. El pH del medio nutriente es preferiblemente neutro y oscila entre pH 7,0 y 7,5.

- Varios sustratos orgánicos como, por ejemplo, el caldo de soja tríptico, el caldo de peptona vegetal, así como la peptona vegetal, la peptona de trigo y el caldo de peptona de soja respaldan la excelente eficacia, así como una alta producción de biomasa del aislado de la invención. Los ensayos en invernadero realizados con dos sistemas de bioensayos; aplicación a la raíz/suelo (lechuga iceberg) y aplicación a las semillas (espinaca) permitió la selección del sustrato MPSO (Levenfors *et al.*, 2008), que era el más flexible para la aplicación en estos diversos sistemas agrícolas. Sin embargo, para el aislado de la invención, el tiempo de fermentación debe ser de 40 a 48 h y no más corto. Para detectar la actividad biológica del aislado de la invención, otros sustratos orgánicos también son apropiados para su fermentación y el aislado de la invención también se puede cultivar en el agitador rotatorio (120 rpm, 40-48 h, temperatura ambiente). Sin embargo, para obtener una eficacia satisfactoria, se recomienda que la fermentación del producto biológicamente activo del aislado de la invención se realice a los rangos de pH de 7,0 a 7,5 y rangos de temperatura de aproximadamente 15-30 °C, como 20-28 °C, lo más preferiblemente aproximadamente 23-27 °C.

- Para los ensayos de eficacia, un producto de fermentación del aislado de la invención se fermentó generalmente de acuerdo con el protocolo de fermentación estándar (pH 7,0; 20 °C) o de acuerdo con el protocolo de fermentación optimizado (pH 7.25 y 25 °C) durante todo el proceso de fermentación (ver sección experimental para los protocolos respectivos). Además, las células bacterianas obtenidas mediante centrifugación del estándar o el producto de fermentación optimizado del aislado de la invención (8000 rpm, 15 min) y, posteriormente, formuladas en vehículos apropiados inorgánicos u orgánicos compatibles desde el punto de vista agrícola también se probaron en ensayos seleccionados. Todos estos tipos de preparaciones de un producto de fermentación son adecuados para el uso para germinación de semillas o estimulación del crecimiento de las plantas y en los métodos de la invención.

- Para garantizar que permanezca estable, el aislado de la invención se puede mantener como cultivo de reserva liofilizado o como producto de congelación a 80 °C en una mezcla de 20 % de VPB y 30 % de glicerol. Para la fermentación, y para comenzar los cultivos líquidos, generalmente se transfieren aproximadamente 100 µl del cultivo de reserva congelado a 100 ml de cualquier medio líquido orgánico al 50 % adecuado para el crecimiento bacteriano, es decir, TSB al 50 %, y se cultivan en el agitador rotatorio (120 rpm; 22-25 °C; a lo sumo 24 h). Para otros fines experimentales, también se puede sembrar en placas una pequeña cantidad del cultivo de reserva

congelado del aislado F30A sobre cualquier medio de sustrato orgánico sólido adecuado para el crecimiento bacteriano y almacenarse durante un período no superior a dos semanas a +4 °C.

Actividad promotora del crecimiento vegetal

5

El aislado de *Pseudomonas azotoformans* F30A biológicamente puro de la invención tiene la capacidad de estimular la germinación de las semillas, la emergencia y el establecimiento de las plantas, promover el establecimiento y la formación de flores y/o estimular el crecimiento de las plantas, aumentando así los rendimientos de los cultivos de plantas. Por lo tanto, un aspecto de la invención se refiere al uso del aislado de la invención para estimular la germinación de las semillas, la emergencia de las plantas y/o el crecimiento de las plantas. Las plantas pueden ser plantas monocotiledóneas o dicotiledóneas o la semilla puede desarrollarse en cualquiera de estos dos tipos de plantas.

10

El aislado de la invención estimula la germinación, la emergencia, la floración y/o mejora el crecimiento y el rendimiento en los cultivos agrícolas mencionados anteriormente en un rango de aproximadamente 4 a más del 50 %.

15

Los ejemplos que se presentan a continuación demuestran la actividad promotora del crecimiento de las plantas de la *Pseudomonas azotoformans* F30A de la invención. La Tabla 2 muestra los datos de los ensayos de campo sobre el aumento del rendimiento promedio resumido después de la aplicación del aislado de la invención como tratamiento de semillas, raíces/suelo (trasplante) o tubérculos en cultivos de interés en un rango de ensayos de invernadero de campo o comerciales, realizados en Suecia, durante cuatro temporadas consecutivas de cultivo. Los ejemplos 1 a 18 muestran claramente un potencial excepcional para promover el crecimiento de plantas del aislado de la invención en ensayos de campo/invernadero comerciales o en experimentos en cámara de crecimiento (trigo, *Poaceae*) cuando se aplican como tratamiento de semillas, tubérculos, raíces y suelos/empapado en sistemas de plantas no infectadas. Además, el efecto promotor del crecimiento de las plantas del aislado de la invención se observa después de la aplicación a semillas infestadas con patógenos transmitidos por semillas, por ejemplo, *Fusarium* spp. en trigo (ejemplo 1). Tal efecto puede ser el resultado del escape de la infección al estimular la germinación de las semillas y el crecimiento de la plántula recién emergida. De este modo, la fase susceptible para la planta se supera más rápidamente y se podría evitar la infección. Además, el amplio rango de la actividad promotora del crecimiento de las plantas del aislado de la invención no se ve afectado por el tipo de suelo (todos los ensayos de campo e invernadero se realizaron en varios tipos de suelos y sustratos de invernadero) y tampoco por las condiciones ambientales tales como clima (se confirmó que el aislado de la invención era eficaz para promover el crecimiento de las plantas en una amplia gama de cultivos durante varias temporadas de crecimiento con diferentes patrones de temperatura y precipitación).

25

30

35

Tabla 2

Aumento del rendimiento después de la aplicación de la <i>Pseudomonas azotoformans</i> F30A en una serie de cultivos de hortalizas en comparación con el rendimiento obtenido en las parcelas de control sin tratar. Se utilizaron diferentes métodos de tratamiento ajustados a los requisitos comerciales para aplicar el aislado F30A. Los experimentos se realizaron como ensayos de campo o de invernadero comerciales durante cuatro temporadas de crecimiento consecutivas. Los datos del aumento del rendimiento medio son el promedio del número de ensayos de campo realizados.				
Cultivo	Aplicación	Aumento del rendimiento medio	N.º de ensayos de campo	Observación
Espinacas	Semilla	19 %	17	
Guisantes	Semilla	6 %	9	
Rúcula	Semilla	13 %	3	
Brócoli	Trasplante	52 %	6	
Lechuga iceberg	Trasplante	23 %	6	
Lechuga	Trasplante	16 %	1	
Lechuga en maceta	Trasplante	15 %	5	Prueba de invernadero comercial
Nabo sueco	Trasplante	14 %	3	
Repollo	Trasplante	17 %	4	<i>Brassica oleracea</i> var. capitata
Fresa	Trasplante	46 %	1	

Aumento del rendimiento después de la aplicación de la *Pseudomonas azotoformans* F30A en una serie de cultivos de hortalizas en comparación con el rendimiento obtenido en las parcelas de control sin tratar. Se utilizaron diferentes métodos de tratamiento ajustados a los requisitos comerciales para aplicar el aislado F30A. Los experimentos se realizaron como ensayos de campo o de invernadero comerciales durante cuatro temporadas de crecimiento consecutivas. Los datos del aumento del rendimiento medio son el promedio del número de ensayos de campo realizados.

Cultivo	Aplicación	Aumento del rendimiento medio	N.º de ensayos de campo	Observación
Pimiento	Trasplante	16 %	1	Ensayo de invernadero
Patata nueva	Tubérculo	9 %	5	
Patata tardía	Tubérculo	4 %	8	

Además, el sobrenadante del aislado de la invención (el producto de fermentación sin células de la *P. azotoformans* F30A obtenido después de la centrifugación (8000 rpm o más, 20 min o más) y la esterilización con filtro adicional (0,2 µm) estimula la germinación, el crecimiento de la planta en emergencia y/o el rendimiento.

5

Los ejemplos 1, 2 y 4 muestran el potencial del sobrenadante del aislado de la invención para mejorar significativamente la emergencia del trigo de primavera y la espinaca, así como el rendimiento del trigo de primavera y la lechuga iceberg.

10 Aplicación y especificaciones de aplicación del aislado de la invención

Además, es un objeto de esta invención proporcionar preparaciones/formulaciones eficaces que comprenden la *Pseudomonas azotoformans* F30A de la invención y/o su sobrenadante que son efectivos para estimular la germinación de semillas y/o para mejorar el crecimiento de las plantas y/o el rendimiento de cultivos de importancia agrícola cuando se aplican como tratamiento de semillas, unidades de propagación vegetativa, raíces, suelo y/u otros. medio de cultivo de plantas y/o como empapado. Por lo tanto, la presente invención proporciona también composiciones agrícolas, que comprenden la *Pseudomonas azotoformans* F30A de la invención promotora del crecimiento de las plantas. opcionalmente en combinación con uno o más vehículos compatibles desde el punto de vista agrícola que permiten la formulación líquida del aislado de la invención, o vehículos compatibles desde el punto de vista agrícola que permiten la obtención de preparaciones/formulaciones sólidas o secas del aislado de la presente invención.

El aislado de la invención es útil para estimular la germinación de las semillas y la emergencia de las plantas, mejorar la densidad de los rodales de cultivos, promover la floración de las plantas y el crecimiento de las plantas y mejorar los rendimientos de cultivos agrícolas de dicotiledóneas y monocotiledóneas de invernadero y de campo, por ejemplo, de las siguientes familias de plantas: *Amaranthaceae* (es decir, remolacha azucarera, espinaca, remolacha forrajera), *Solanaceae* (es decir, patata, pimiento), *Fabaceae* (es decir, guisante), *Brassicaceae* (es decir, rúcula, brócoli, varias variedades de repollo, nabo sueco, colza oleaginosa), *Astraceae* (es decir, varias variedades de lechuga), *Apiaceae* (es decir, zanahoria), *Rosaceae* (es decir, fresas) y *Poaceae* (es decir, trigo), *Cucurbitaceae* (es decir, pepino) *Lamiaceae* (es decir, orégano), *Aliaceae* (es decir, cebollino). El aislado de la invención también es útil para mejorar la formación de raíces y/o el crecimiento de plantas de las plántulas de árboles en varios viveros de plantas (es decir, pinos escoceses de la familia *Pinaceae*).

Con el fin de estimular la germinación de las semillas y/o la emergencia de las plantas, mejorar la densidad de los rodales de cultivos, promover la floración y/o el crecimiento de las plantas y/o en última instancia mejorar los rendimientos, los cultivos se cultivan en presencia de una cantidad definida del aislado promotor del crecimiento de las plantas de la invención, es decir, *Pseudomonas azotoformans* F30A, donde la cantidad definida del aislado que promueve el crecimiento de las plantas se describe como una cantidad del aislado que estimula significativamente la germinación de las semillas, mejora la densidad de los rodales de cultivo, promueve la floración y el crecimiento de las plantas y, en último término, mejora el rendimiento cuando se compara con un control no tratado. La cantidad del aislado de la invención necesaria para obtener los efectos deseados difiere entre los cultivos y depende del método de aplicación del aislado de la invención (tratamiento de semillas de cultivos de dicotiledóneas y monocotiledóneas sembrados con semillas, unidad de propagación vegetativa (tubérculo, bulbo, rizoma, etc.), tratamiento en la patata y otros cultivos de propagación vegetativa, así como en tratamientos de suelo/raíz/empapado de trasplantes vegetales y otras plántulas de cultivos). Generalmente se recomienda de 10 a 100 ml del producto de la *Pseudomonas azotoformans* F30A (entre $7,5 \times 10^8$ y $7,5 \times 10^9$ (unidades formadoras de colonias por ml) por un kilogramo de semillas, de 10 a 20 ml por cada plántula trasplantada (raíz/suelo/empapado) y de 100 µl a 1 ml por cada unidad de propagación vegetativa, p. ej. tubérculo de la patata, para obtener el efecto promotor del crecimiento de las plantas deseado. Sin embargo, la cantidad del aislado de la invención debe determinarse preferiblemente caso por caso para diferentes combinaciones de métodos de cultivo/aplicación.

Opcionalmente, se suele recomendar de 10 a 100 ml del sobrenadante exento de células de la *Pseudomonas azotoformans* F30A por un kilogramo de semillas, de 10 a 20 ml por cada plántula trasplantada (raíz/suelo/empapado) y de 100 µl a 1 ml por cada unidad de propagación vegetativa, p. ej., el tubérculo de la patata, para obtener el efecto promotor del crecimiento de las plantas deseado. Sin embargo, la cantidad del aislado de la invención debe determinarse preferiblemente caso por caso para diferentes combinaciones de métodos de cultivo/aplicación.

Las células de *Pseudomonas azotoformans* F30A de la invención se pueden aplicar a semillas, plantas y/o al entorno que rodea a la semilla o planta (por ejemplo, al suelo) en forma de un producto de fermentación o en forma de una composición agrícola para estimular la germinación de las semillas y/o el crecimiento de la planta.

Por lo tanto, un aspecto de la invención se refiere a un producto de fermentación (es decir, células bacterianas junto con su medio de crecimiento usado) de la cepa biológicamente pura de *Pseudomonas azotoformans* F30A.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de un cultivo de una cepa biológicamente pura de *Pseudomonas azotoformans*, cepa F30A, que se ha depositado en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH y a la que se le ha asignado el número de acceso DSM 22077, para producir un sobrenadante de cultivo. Dicho sobrenadante se puede usar en todos los aspectos de la invención en lugar de las células bacterianas o el producto de fermentación de las células.

Otro aspecto más de la invención se refiere, por lo tanto, a una composición agrícola que comprende la cepa biológicamente pura de *Pseudomonas azotoformans* F30A, opcionalmente en combinación con uno o más vehículos líquidos y/o sólidos. Una composición agrícola es una composición que, sin afectar al efecto biológico del ingrediente activo, hace posible la aplicación práctica y el uso en sistemas agrícolas. Una composición agrícola de la invención comprende el producto de cultivo/fermentación puro de *Pseudomonas azotoformans* F30A, sus células (p. ej., preparadas mediante la eliminación del medio de cultivo por centrifugación y, opcionalmente, lavando las células con, por ejemplo, un tampón adecuado) y/o su sobrenadante exento de células, formulado opcionalmente con cualquier líquido y/o vehículo sólido agrícolamente aceptable, que no afecte negativamente a la actividad del aislado ni al crecimiento del cultivo al que se va a aplicar. Otros constituyentes opcionales de una composición agrícola de este tipo se ilustran en otra parte de la presente memoria.

Además, el medio de crecimiento también puede eliminarse de un cultivo bacteriano de *Pseudomonas azotoformans* F30A, por ejemplo, por centrifugación, y las células bacterianas se resuspenden en agua de otros medios líquidos o tampones conocidos en la técnica antes de la aplicación a plantas, semillas o al suelo. Como el propio sobrenadante comprende sustancias activas producidas por la *Pseudomonas azotoformans* F30A, también se puede usar el sobrenadante en lugar de las células bacterianas en todos los aspectos de la invención.

Otro aspecto más de la invención se refiere a un método para preparar una composición agrícola que comprende *Pseudomonas azotoformans* F30A que comprende la etapa de mezclar dicha *Pseudomonas azotoformans* F30A, con uno o más vehículos líquidos y/o sólidos y, opcionalmente, uno o más microorganismos promotores del crecimiento de las plantas adicionales, microorganismos para el control biológico, fertilizantes orgánicos y/o agroquímicos. La persona experta conoce bien tales agentes adecuados.

Las células de *Pseudomonas azotoformans* F30A también pueden proporcionarse a semillas, plantas y/o al entorno que rodea a la semilla o la planta (por ejemplo, al suelo) en forma de células secas, tales como células liofilizadas, secadas por pulverización, secadas al vacío o en lecho fluidizado. Tal composición puede comprender además uno o más vehículos adecuados.

Una composición agrícola, que comprende *Pseudomonas azotoformans* F30A o un sobrenadante de cultivo de la misma, también puede comprender otros microorganismos, tales como microorganismos para el control biológico, aditivos y/o adyuvantes que tienen, por ejemplo, efectos promotores del crecimiento de las plantas, efectos protectores de las plantas (es decir, control biológico) o técnicamente beneficiosos, con el fin de mejorar aún más el rendimiento de la composición agrícola.

El cultivo puro/producto de fermentación/sobrenadante de la *Pseudomonas azotoformans* F30A de la invención se puede aplicar directamente a las semillas, tubérculos o plántulas de cultivos y/o al entorno que rodea a la semilla o planta (por ejemplo, al suelo) que se va a tratar, y puede constituir una parte de una composición agrícola adecuada para las aplicaciones especificadas anteriormente.

El producto de cultivo puro/fermentación de *Pseudomonas azotoformans* F30A, sus células (por ejemplo, preparadas eliminando el medio de cultivo por centrifugación y, opcionalmente, lavando las células con, por ejemplo, un tampón adecuado) o su sobrenadante exento de células, se pueden mezclar y formular opcionalmente con cualquier vehículo adecuado agrícolamente aceptable, que no influya negativamente en la actividad del aislado y en el crecimiento del cultivo a aplicar. Los ejemplos de vehículos adecuados son compuestos orgánicos a base de peptona de soja u otros compuestos apropiados mezclados con sales fisiológicas, metilcelulosa, dextrina y

minerales. Los vehículos adecuados para uso agrícola para la aplicación de bacterias a plantas son conocidos por los expertos. Cuando la *Pseudomonas azotoformans* F30A se aplica en forma de una suspensión o una emulsión, esta suspensión o emulsión también puede comprender uno o más aditivos comercializados, tales como tensioactivos, agentes humectantes, etc. Asimismo, *Pseudomonas azotoformans* F30A se puede usar
 5 preferiblemente junto con otros agentes que promueven el crecimiento de las plantas (ver, por ejemplo, Lugtenberg y Kamilova, 2009 para agentes promotores de crecimiento de las plantas adecuados), agentes para el control biológico (ver por ejemplo, Compant *et al.*, 2005 para los agentes para el control biológico adecuados), fertilizantes orgánicos y/o agroquímicos. Por lo tanto, un aspecto adicional de la invención se refiere a una composición agrícola que comprende *Pseudomonas azotoformans* F30A que comprende además uno o más microorganismos promotores
 10 del crecimiento de las plantas adicionales, microorganismos de control biológico y/o agroquímicos.

Los agentes para el control biológico y los productos agroquímicos podrían tener, por ejemplo, efectos fungicidas, bactericidas, nematocidas, insecticidas, herbicidas o repelentes de aves. Los agroquímicos también podrían ser fertilizantes o reguladores de plantas. Los ejemplos de compatibilidad completa entre el aislado de la invención y
 15 algunos agroquímicos seleccionados, fertilizantes orgánicos y agentes de control biológico se dan en el Ejemplo 18 a continuación.

A continuación se proporcionan ejemplos de áreas de aplicación para el aislado de la invención, especificaciones de aplicación y cantidades efectivas definidas. La cantidad del aislado de la invención que es eficaz para una aplicación
 20 específica y un cultivo agrícola específico se determina preferiblemente caso por caso.

Para la aplicación de semillas, preferiblemente, las células bacterianas, el producto de fermentación (es decir, las células bacterianas junto con su medio de crecimiento usado) o la composición agrícola que comprende *Pseudomonas azotoformans* F30A (que comprende, por ejemplo, aproximadamente 10^7 - 10^{10} unidades formadoras
 25 de colonias ml^{-1}) se aplica mediante un equipo de tratamiento de semillas comercializado en dosis adecuadas dependiendo del cultivo. Los vehículos, aditivos y/o adyuvantes adecuados (que son bien conocidos por los expertos en la materia) pueden añadirse en concentraciones apropiadas para aumentar el efecto, la adherencia, la estabilidad durante el almacenamiento y el rendimiento técnico de la formulación durante y después del recubrimiento de la semilla. Además, las células de *Pseudomonas azotoformans* F30A pueden formularse con los vehículos o
 30 combinaciones de vehículos por métodos convencionales disponibles para obtener preparaciones sólidas. Tales preparaciones se suspenden en vehículos líquidos, lo que da como resultado una concentración celular de aproximadamente 10^7 - 10^{10} unidades formadoras de colonias por ml.

Para la aplicación en el suelo, césped u otros medios de crecimiento de plantas o para el tratamiento de trasplantes/plántulas en la raíz/suelo, se puede utilizar el riego, la pulverización o el empapado de bastidores de trasplantes para la distribución de *Pseudomonas azotoformans* F30A al sitio deseado. Las bacterias también pueden distribuirse a través de sistemas de riego, pulverización o suministro de nutrientes cuando se utilizan para el
 35 tratamiento de cultivos comerciales de invernadero. El producto de cultivo o fermentación puro, o diluciones de cualquiera de estos, o composición agrícola que comprende *Pseudomonas azotoformans* F30A (preferiblemente aproximadamente 10^6 - 10^{10} unidades formadoras de colonias ml^{-1}) se aplica en dosis adecuadas para cada cultivo y técnica de aplicación. Los vehículos adecuados se podrían añadir en concentraciones apropiadas para, por ejemplo, mejorar la adherencia de las bacterias a las raíces de la planta.
 40

Para la aplicación a varios tubérculos, bulbos, etc., se aplica el recubrimiento por pulverización con maquinaria convencional (recubrimiento centralizado en el momento de la clasificación) o el empapado del tubérculo/bulbo, etc., antes de la siembra o en el lugar de la siembra. El cultivo puro o el producto de fermentación de *Pseudomonas azotoformans* F30A (preferiblemente aproximadamente 10^9 - 10^{10} unidades formadoras de colonias ml^{-1}) se aplica en
 45 dosis de aproximadamente 0,1-10 ml por tubérculo. Los vehículos adecuados se pueden añadir en concentraciones apropiadas para, por ejemplo, mejorar la adherencia de las bacterias a los tubérculos.
 50

La *Pseudomonas azotoformans* F30A de la invención estimula la germinación de semillas y/o de la unidad de propagación vegetativa tubérculos/plantas, mejora la densidad de los rodales de cultivos, promueve el crecimiento de las plantas y/o mejora significativamente los rendimientos de cultivos agrícolas de dicotiledóneas y/o monocotiledóneas de campo y de invernadero. Además, la capacidad para promover el crecimiento y mejorar el
 55 rendimiento no se ve afectada por el tipo de suelo, las condiciones climáticas, ni el tipo de sustrato utilizado para el cultivo de plantas. Más de 60 ensayos de campo se han realizado en diferentes suelos (de arena a arcilla) durante cuatro años, que representan diferentes condiciones climáticas. Además, se han realizado 10 pruebas comerciales de invernadero, además de numerosos otros experimentos de invernadero, utilizando tierra de siembra a base de turba.
 60

La invención comprende además una descripción de caracteres identificativos específicos. Los resultados de la identificación y caracterización del aislado de la invención se describen en la presente memoria.

Un aspecto adicional de la invención comprende parámetros de fermentación específicos, aplicables a una gama de sustratos de laboratorio e industriales que podrían usarse para el cultivo del agente promotor del crecimiento de plantas de la invención.

- 5 La presente invención también se refiere a un método para estimular la germinación de semillas, la emergencia de plantas y/o el crecimiento de plantas que comprende la etapa de aplicar las células bacterianas de *Pseudomonas azotoformans* F30A, o un producto de fermentación o una composición agrícola que comprende *Pseudomonas azotoformans* F30A a una semilla, una planta y/o al entorno que rodea a una semilla, o una planta. La *Pseudomonas azotoformans* F30A puede aplicarse en tal método, por ejemplo, puede aplicarse a las raíces de una planta. De
- 10 forma alternativa, la *Pseudomonas azotoformans* F30A en tal método se puede aplicar al suelo antes y/o después de la emergencia de raíces de plantas o a medios de cultivo que rodean semillas y/o plantas. Las células bacterianas de *Pseudomonas azotoformans* F30A, o un producto de fermentación o una composición agrícola que comprende *Pseudomonas azotoformans* F30A pueden aplicarse de forma alternativa a unidades de propagación vegetativa de plantas o aplicarse a medios de cultivo de plantas que rodean semillas y/o plantas. Por supuesto, se puede usar una
- 15 combinación de cualquiera de los métodos de aplicación anteriores. La semilla o la planta tratada con las células bacterianas de *Pseudomonas azotoformans* F30A, o un producto de fermentación o una composición agrícola que comprende *Pseudomonas azotoformans* F30A puede ser una planta monocotiledónea o una planta dicotiledónea o una semilla que se convertirá en tal planta.
- 20 Los objetos y las ventajas adicionales de la invención se harán evidentes sin duda a partir de la siguiente descripción detallada de esta invención. Sin embargo, la descripción detallada y los ejemplos específicos solo se dan para ilustrar las realizaciones preferidas de esta invención y los diversos cambios y modificaciones dentro del alcance de esta invención serán evidentes para los expertos en las cuestiones relacionadas con el objeto de la invención.

25 Sección experimental

Los siguientes ejemplos ilustran adicionalmente las ventajas de esta invención y no deben limitar el alcance de la invención como se define en las reivindicaciones.

- 30 Para la aplicación en todos los ejemplos descritos, si no se especifica lo contrario, el aislado de la invención se fermentó de acuerdo con el protocolo de fermentación estándar (pH 7,0, 20 °C) u optimizado (pH 7,25, 25 °C) con el medio de cultivo MPSO (Levenfors *et al.*, 2008) como sustrato de crecimiento. Antes de la fermentación, se esteriliza el medio de cultivo. Se agrega una cantidad apropiada de fuente de carbono (por ejemplo, glicerol, fructosa, sacarosa, glucosa) y se calibran los electrodos de oxígeno y pH. El fermentador se inocula después con una
- 35 cantidad apropiada de cultivo de inicio del aislado de la invención crecido en cualquier sustrato líquido bacteriano apropiado. Los parámetros de fermentación (suministro de oxígeno y pH) se controlan a lo largo del procedimiento de fermentación. Se añade un sustrato antiespumante adecuado cuando sea necesario. El producto de fermentación se cosecha 2 a 3 h después de que el consumo de oxígeno medido indique el cambio en el metabolismo secundario (generalmente después de 40 a 48 h). El producto de fermentación, no diluido o diluido con agua del grifo, que
- 40 comprende las células del aislado en el medio de cultivo MPSO o su sobrenadante exento de células, y preferiblemente no más de 3 meses después, se aplicó a semillas, tubérculos de patata o raíces/suelo de los cultivos agrícolas y hortícolas probados. También se realizaron ciertos ensayos con células bacterianas no diluidas o diluidas del aislado de la invención obtenidos por medio de la centrifugación de su producto de fermentación estándar u optimizado (8000 rpm, 15 min) y luego se formularon en vehículos apropiados inorgánicos u orgánicos compatibles
- 45 desde el punto de vista agrícola.

- Los primeros siete ejemplos describen ensayos invernadero/cámaras de crecimiento, incluidos ensayos comerciales, y que demuestran la estimulación de la germinación de las semillas y la emergencia de las plantas de trigo, espinaca y colza, así como el aumento del rendimiento de la masa verde de lechuga iceberg, el aumento del peso del fruto del
- 50 pimiento, el aumento del rendimiento de hierbas en macetas seleccionadas y el aumento de rendimiento de pepino después de la aplicación del aislado de la invención.

Ejemplo 1

- 55 Estimulación de la emergencia y el crecimiento de las plantas - ensayos de invernadero en trigo de primavera

- Antes de la siembra, las semillas de trigo de primavera (30 g) se trataron con el producto de fermentación del aislado de la invención fermentado según el protocolo de fermentación estándar, con sus células bacterianas diluidas con agua del grifo o con sobrenadante exento de células diluidas con agua del grifo (300 ml/kg de semillas), seguido de
- 60 la mezcla de las semillas con el producto de fermentación/células bacterianas/sobrenadante durante un período de alrededor de 2 minutos y secado durante la noche. En caso necesario, las semillas se almacenaban posteriormente durante un período de hasta 2 semanas antes de establecer los ensayos.

- A continuación, se sembraron cuatro macetas con 50 semillas cada una para cada tratamiento, respectivamente, y
- 65 se colocaron en una cámara de crecimiento con una temperatura de 18-20 °C (lote de semillas no infectadas) o 10-

12 °C (lote de semillas infectadas con hongos *Fusarium* y *Microdochium*) y un período de iluminación de 14 horas. En todos los ensayos se utilizó la mezcla de turba comercial no estéril "Enhetsjord" (Gerhardson *et al.*, 1985). Las plantas emergidas se contaron 5-6 días después de colocar las macetas a la temperatura de 18-20 °C y 12-14 días las colocadas a 10-12 °C. Después de 12 a 18 días adicionales, las plantas se cortaron a una distancia de alrededor de 0,5 cm de la superficie del suelo y se midió el peso seco de los brotes después del secado durante la noche a 105 °C para estimar el aumento de la masa de la planta después del tratamiento con el aislado de invención.

Las Figuras 2 y 3 muestran la estimulación de la emergencia de la planta del trigo de primavera después del tratamiento con el aislado de la invención en diferentes concentraciones y el efecto de su aplicación sobre el peso seco del trigo probado en experimentos en cámaras de crecimiento con lotes de semillas no infectadas (Fig. 2) y lotes de semillas infectadas (Fig. 3), respectivamente, de trigo de primavera. A las concentraciones apropiadas, la emergencia aumentó en un 10 a 15 % (lote de semillas no infectadas) y en un 12 a 35 % (lote de semillas infectadas). El peso seco estimado alrededor de 20 días después de la siembra también aumentó significativamente; 13-18 % (lote de semillas no infectadas) y 10-36 % (lote de semillas infectadas). Además, la Figura 2 muestra el aumento de la emergencia del trigo de primavera y el peso seco después de la aplicación del sobrenadante del aislado de la invención en diferentes concentraciones. En concentraciones apropiadas, la emergencia aumentó en un 5 a 10 % y el peso seco en un 8 a 15 %.

Los resultados presentados confirman la utilidad del aislado en la aplicación a lotes de semillas no infectadas e infectadas como agente exclusivo para promover el crecimiento de las plantas. La propiedad única del aislado F30A para aumentar fuertemente la germinación y la emergencia de las semillas en el proceso de escape de la enfermedad, mejora el crecimiento del grano y el estado general de la planta expresada como una cantidad de materia vegetal seca producida durante el período del experimento (alrededor de 20 días).

25 Ejemplo 2

Estimulación de la emergencia de plantas - ensayos de invernadero en espinacas

Antes de la siembra, las semillas de espinaca (3 a 5 g) se trataron con los productos de fermentación del aislado de la invención, o con su sobrenadante exento de células, fermentados de acuerdo con el protocolo estándar (lote N.º FOM115) o el protocolo optimizado (lote N.º FOM139) o con células bacterianas, que se obtuvieron de los productos de fermentación respectivos y luego se rehidrataron con agua del grifo (300 ml/kg de semillas). Las semillas se mezclaron luego con los tratamientos bacterianos respectivos durante un período de alrededor de 2 minutos y se secaron durante la noche. En caso necesario, las semillas se almacenaron posteriormente durante un período de hasta 2 semanas antes de establecer los ensayos.

A continuación, se sembraron cuatro macetas con 25 semillas cada una para cada tratamiento, respectivamente, y se colocaron en cámaras de crecimiento con una temperatura de 12-14 °C y un período de iluminación de 14 horas. En todos los ensayos se utilizó la mezcla de turba comercial no estéril "Enhetsjord" (Gerhardson *et al.*, 1985). Las plantas de espinaca emergidas se contaron continuamente durante un período de alrededor de 8-10 días, a partir del día 7 después de la siembra. Los recuentos de plantas obtenidos el día 9 se utilizan en todos los resultados presentados a continuación.

La Figura 4 muestra el aumento de la emergencia de espinacas después del tratamiento con el aislado de la invención a diferentes concentraciones y con su sobrenadante (Fig. 4A) y después del tratamiento con la preparación sólida seleccionada del aislado (Fig. 4B). En concentraciones apropiadas, el tratamiento de las semillas con el producto de fermentación dio como resultado un aumento de la emergencia de hasta el 35 %. La aplicación del sobrenadante no diluido dio como resultado un aumento del 13 % de la emergencia en comparación con el control no tratado. Una aplicación de la preparación de células sólidas también fue efectiva en el aumento de la emergencia; a concentraciones probadas, emergieron un 15 % más de plantas después de tratar las semillas con esta preparación, y rehidratarlas en solución salina fisiológica.

Los ejemplos de ensayos en invernadero muestran claramente una capacidad significativa de la cepa de la invención para estimular la germinación y la emergencia de la espinaca. Este aumento se expresa en presencia del producto de fermentación del aislado, así como en presencia de células suspendidas en la solución salina fisiológica o agua o preparaciones de células secas, rehidratadas en soluciones salinas fisiológicas. El aumento detectable de la emergencia, como se muestra en los ejemplos dados, generalmente está en un rango de 10 a 40 % y depende de la concentración de los productos aplicados a las semillas de espinaca.

60 Ejemplo 3

Estimulación de la emergencia de plantas - ensayos de invernadero en colza

Antes de sembrar las semillas de colza oleaginosa cv. Joplin (10-20 g), estas se trataron con el producto de fermentación del aislado de la invención fermentado de acuerdo con el protocolo modificado y se secaron durante la

noche. Las semillas se trataron con cuatro dosis (10, 20, 40 y 60 ml por kg de semillas) del producto de fermentación que contenía respectivamente $5,0 \times 10^7$, $5,0 \times 10^8$ y $5,0 \times 10^9$ de UFC del aislado de invención por ml.

Se sembraron seis macetas con 25 semillas cada una para cada tratamiento, respectivamente, y se colocaron en cámaras de crecimiento con una temperatura de 12-14 °C y un período de iluminación de 14 horas. En todos los ensayos se utilizó mezcla de turba comercial no estéril.

Las plantas de colza oleaginosa emergidas se contaron continuamente durante un período de alrededor de 4-5 días, a partir del día 5 después de la siembra. Los recuentos de plantas obtenidos el día 6 se usaron para estimar el aumento de la emergencia. La aplicación del producto de fermentación con $5,0 \times 10^7$ por ml (0,5 %) proporcionó el aumento más uniforme de la emergencia de la colza oleaginosa independientemente de la dosis, con un promedio de aumento del 31 % en la emergencia. Se detectó una mayor variación cuando a las semillas se aplicaban las dosis de 20, 40 y 60 ml por kg del producto de fermentación $5,0 \times 10^8$ por ml (5 %) y $5,0 \times 10^9$ por ml (50 %) (Tabla 3).

Tabla 3. Mejora de la emergencia de colza oleaginosa después de la aplicación del aislado de la invención en tres concentraciones y cuatro dosis (n = 6).

Dosis	Tratamiento/Plantas emergidas, día 6		
	$5,0 \times 10^7$ por ml (0,5%)	$5,0 \times 10^8$ por ml (5%)	$5,0 \times 10^9$ por ml (50 %)
0 ml (no tratada)	16,0 +/- 2,3	16,0 +/- 2,3	16,0 +/- 2,3
10 ml	22,0 +/- 1,1	18,3 +/- 2,5	23,8 +/- 0,4
20 ml	20,3 +/- 1,0	20,7 +/- 1,0	18,8 +/- 3,2
40 ml	20,3 +/- 1,1	22,3 +/- 0,7	20,7 +/- 1,5
60 ml	21,5 +/- 0,8	17,3 +/- 3,7	23,6 +/- 1,2

Ejemplo 4

Aumento del rendimiento de la lechuga iceberg: aplicación en raíz, ensayos en invernadero

Se colocaron bandejas en el invernadero/cámaras de crecimiento (18 °C y un período de iluminación de 14 h) y, después de un período de aproximadamente 2 semanas, las plántulas se trasplantaron a macetas (1 plántula/maceta) con el mismo sustrato a base de turba. Las macetas se colocaron en el invernadero/cámara de crecimiento durante 4 a 6 días adicionales y luego se aplicó cerca de las raíces de 10 a 20 ml del producto de fermentación del aislado de la invención fermentado según el protocolo estándar o el protocolo de fermentación optimizado, así como otras soluciones bacterianas que comprendían *Pseudomonas azotoformans* F30A (por ejemplo, células bacterianas rehidratadas en disolventes orgánicos e inorgánicos apropiados) y su sobrenadante. Las macetas se mantuvieron durante un período posterior de aproximadamente 2 a 3 semanas en el invernadero/cámara de crecimiento. Las plantas de lechuga se cortaron a una distancia de alrededor de 0,5 cm de la superficie del suelo y se pesaron para medir la masa verde producida durante el período de prueba.

La aplicación de 10 ml de productos de fermentación u otras preparaciones del aislado de la invención (5×10^9 - 4×10^{10} de unidades formadoras de colonias (UFC) por ml) como tratamientos de raíz/suelo en las plántulas de lechuga iceberg en el momento del trasplante dio como resultado un aumento excepcional del crecimiento de la lechuga y, en última instancia, de la masa verde de las plantas tratadas en comparación con las plántulas de control no tratadas.

La Figura 5 muestra ejemplos de dos experimentos de invernadero independientes con dos productos de fermentación del aislado de la invención y su sobrenadante (lote FOM173 y lote FOM176), ambos fermentados según el protocolo optimizado. El aumento detectado de la masa verde de lechuga iceberg estaba en un rango de 19 a 68 % (ensayo de invernadero con el lote de fermentación 173) y de 3 a 32 % (ensayo de invernadero con el lote de fermentación 176). La aplicación del sobrenadante dio como resultado un aumento de masa verde del 56 % (lote 173) y 36 % (lote 176), respectivamente.

Además, los productos de fermentación del aislado de la invención tienen una buena estabilidad de almacenamiento; la eficacia de los productos de fermentación almacenados durante un período de hasta 14 semanas a 4 °C no se vio afectada por el almacenamiento del producto. En la Figura 6 se muestra un ejemplo de ensayo de invernadero que demuestra el efecto promotor del crecimiento de la lechuga iceberg tratada con productos de fermentación de 2, 6 y 14 semanas de antigüedad, todos fermentados según el protocolo optimizado. En este ensayo de invernadero, independientemente de la antigüedad del producto de fermentación, la masa verde de las plantas tratadas con el aislado de la invención se incrementó alrededor del 40 %. Además, el recuento de células viables en el producto de fermentación de 14 semanas de antigüedad fue de aproximadamente 1×10^{10} UFC

por ml en comparación con $1,3$ y $1,5 \times 10^{10}$ UFC por ml en productos de fermentación de 6 y 2 semanas de antigüedad, respectivamente.

Ejemplo 5

5

El aumento del rendimiento del pimiento - aplicación a la raíz, ensayo de invernadero

Para detectar el efecto de la estimulación del crecimiento después de la aplicación a la raíz/suelo a los trasplantes/plántulas, se utilizó pimiento como cultivo de prueba adicional. Las semillas de pimiento se sembraron en bandejas con sustrato comercial a base de turba. Las bandejas se colocaron en el invernadero/cámaras de crecimiento (25 °C día; 20 °C noche y un período de iluminación de 14 h) y después de un período de aproximadamente 3 semanas las plántulas se trasplantaron a macetas (1 plántula/maceta) con el mismo sustrato a base de turba. Las macetas se colocaron en el invernadero/cámara de crecimiento durante 4 a 6 días adicionales y luego se aplicó cerca de las raíces 10 ml del producto de fermentación del aislado de la invención fermentado según el protocolo estándar o el protocolo de fermentación optimizado, así como otras soluciones bacterianas que comprendían *Pseudomonas azotoformans* F30A (por ejemplo, células bacterianas rehidratadas en disolventes orgánicos e inorgánicos apropiados). Las macetas se mantuvieron durante un período posterior de hasta 4 meses en el invernadero/cámara de crecimiento. Los frutos de pimiento se cosecharon en dos ocasiones y se pesaron para estimar el peso total de cada planta.

20

La aplicación de 10 ml de productos de fermentación del aislado de la invención a concentraciones variables de $3,5 \times 10^7$ a $3,5 \times 10^{10}$ UFC por ml como tratamiento de la raíz/suelo en tapones de plántulas de pimiento en el momento de su trasplante dio como resultado un mayor rendimiento promedio de los frutos de pimiento en comparación con las plantas de control no tratadas. La Figura 7 muestra el aumento del rendimiento de los frutos de pimiento después de que las plántulas de pimiento se trataron con el producto de fermentación del aislado del lote de la invención FOM076. Los aumentos de rendimiento del 6 al 30 % en comparación con el control no tratado se detectaron dependiendo de la concentración del aislado de la invención durante el tratamiento de plántulas de pimiento.

25

Ejemplo 6

30

El aumento del rendimiento de remolacha forrajera, cilantro, orégano y cebollino - aplicación en el suelo, ensayo en invernadero

Se sembraron las siguientes hierbas en macetas: remolacha forrajera, cilantro, orégano y cebolleta en macetas con un sustrato comercial y utilizando un sistema de siembra comercializado. La superficie de la tierra de las macetas (25 por cada hierba en maceta) se roció a continuación con 10 ml del producto de fermentación del aislado de la invención (aproximadamente 1 a 3×10^9 UFC por ml) por un litro de sustrato de la tierra. Las macetas se colocaron en un invernadero comercial utilizado para el cultivo de hierbas en macetas y las condiciones de crecimiento fueron las normales para el cultivo de hierbas en macetas. La masa verde de las plantas se midió después de aproximadamente uno o dos meses, dependiendo de la hierba plantada en la maceta.

40

La masa verde de las hierbas plantadas en macetas tratadas con el aislado de la invención fue en promedio alrededor de un 7 % más que la masa verde de las hierbas recolectadas de macetas sin tratar (Tabla 4). Además, las plantas parecían más verdes y más fuertes.

45

Tabla 4. Masa verde de hierbas en macetas tratadas con el aislado de la invención en comparación con la masa verde de los controles no tratados respectivos y el porcentaje de aumento del rendimiento medio (n = 25).

Hierba en maceta	Masa verde promedio (g)		Aumento medio del rendimiento (%)
	No tratada	F30A	
Cilantro	22,33	23,82	6,7
Remolacha forrajera (roja)	25,06	26,86	7,2
Orégano	19,17	20,64	7,7
Cebollino	22,09	23,56	6,7

Ejemplo 7

El aumento del rendimiento de pepino - aplicación a raíz/suelo, prueba de invernadero comercial

Antes del tratamiento con el aislado de la invención, los trasplantes de pepino se plantaron en un invernadero comercial con un área de 4600 m² de acuerdo con los requisitos para el cultivo del pepino. El cultivo de fermentación

55

del aislado de la invención (20 litros; aproximadamente $2\text{-}3 \times 10^9$ UFC por ml) se mezcló a continuación con 80 litros de agua en el recipiente de riego y las plantas se trataron con la mezcla utilizando un sistema de riego comercial. Los controles fueron pepinos cultivados en el mismo tipo de invernadero; superficie de cultivo de 5400 m^2 ; tratado con agua. Ambos tratamientos se iniciaron y terminaron el mismo día, todos los parámetros de crecimiento y otras medidas prácticas necesarias, como la fertilización, se mantuvieron iguales para ambos invernaderos. El rendimiento del pepino se midió en kg por metro cuadrado del invernadero y, además, se contó el número de pepinos cosechados por metro cuadrado. Durante el periodo de cosecha, se cosecharon $13,75\text{ kg/m}^2$ y 344 pepinos/m^2 del invernadero tratado con el aislado de la invención, en comparación con $13,03\text{ kg/m}^2$ y 326 pepinos/m^2 del invernadero tratado con agua. Los números corresponden al aumento de rendimiento del 5,5 % por m^2 en el invernadero con la aplicación del aislado de invención.

Ensayos de campo

Los ensayos de campo e invernadero comerciales con el aislado de la invención tuvieron como objetivo evaluar su potencial para estimular la germinación de las semillas y la emergencia de las plantas, así como mejorar la cobertura de las plantas, el crecimiento de las plantas, la floración y/o el rendimiento en condiciones naturales. Los experimentos de campo (en total 82 ensayos de campo/ensayos de invernadero comerciales) que incluyeron algunos experimentos a gran escala (hasta 1 ha) se realizaron durante cuatro estaciones de crecimiento en una amplia gama de cultivos de dicotiledóneas de importancia agrícola (ver Tabla 2) y se centraron en la evaluación de las propiedades para promover el crecimiento de las plantas mediante el uso de diferentes parámetros de medición. Los datos de aumento del rendimiento promedio para cultivos, en los cuales los tratamientos con el aislado de la invención dieron como resultado una mejora significativa del rendimiento, se presentan en la Tabla 2.

Los productos de fermentación estándar y optimizados del aislado de la invención se utilizaron en un gran número de ensayos de campo. Se utilizaron tres métodos de aplicación diferentes para tratar un cultivo objetivo con el aislado F30A. Estos fueron el tratamiento de semillas, el tratamiento de tubérculos de semilla (patata) y el tratamiento de trasplante en raíz/suelo. El método de aplicación dependió y se ajustó a las prácticas comunes utilizadas para cada cultivo y la mayoría de los ensayos de campo se realizaron en el sur de Suecia, el área principal de producción de hortalizas y patatas en Suecia. Además, en todos los experimentos de campo, se han utilizado prácticas agrícolas comunes para probar la utilidad de la aplicación del aislado de la invención en combinación con otras medidas necesarias, que deben realizarse para garantizar una cosecha rentable. La mayoría de los ensayos se llevaron a cabo siguiendo un diseño de bloques completamente al azar con cuatro, o en algunos experimentos cinco repeticiones. Los datos se analizaron mediante un análisis de la varianza (ANOVA) y un modelo lineal generalizado (GLM) en el SAS/Stat (Sistema de análisis estadístico). En los ensayos se ha calificado la emergencia/establecimiento de la planta, número de flores (fresa) y rendimiento/rendimiento comercial.

El tratamiento de semillas de varios cultivos con el aislado F30A dio lugar a aumentos del rendimiento de entre 6 y 19 % (Tabla 2). Además, los rendimientos a menudo fueron significativamente más altos o más altos que los obtenidos después del tratamiento con productos químicos estándar (ver ejemplo 8 espinacas y ejemplo 10 guisantes). La emergencia de la planta se mejoró visiblemente en comparación con la emergencia de la planta en parcelas con control no tratado y el efecto se mantuvo durante toda la temporada de crecimiento hasta la cosecha. En algunos ensayos de campo individuales se midió un aumento del rendimiento de hasta el 40 %. Además, el tratamiento de trasplantes en la raíz/suelo con el aislado F30A con el método de empapado dio como resultado un aumento rápido y visible del crecimiento de las plántulas tratadas, ya evidente después de unos días (un ejemplo del efecto sobre el crecimiento de la lechuga en los ensayos en invernadero se muestra en la Fig. 8).

Estos efectos se mantuvieron durante toda la temporada de crecimiento, lo que dio como resultado una cosecha más temprana y rendimientos mucho más altos que en los tratamientos de control. Los aumentos de rendimiento después de los tratamientos de la raíz/suelo con el aislado de la invención dependían del cultivo y eran como promedio entre un 17 y un 52 % (Tabla 2). El tratamiento de los tubérculos de patata dio como resultado un aumento del rendimiento del 4 al 9 % (Tabla 2), siendo el aumento de rendimiento relativo más alto registrado de hasta el 25 % en algunos ensayos de campo individuales con patata nueva.

Los ejemplos individuales (ejemplos 8 - 18) presentados a continuación demostrarán aún más la utilidad de la aplicación del aislado de la invención para mejorar el rendimiento en una variedad de cultivos de importancia agrícola. Los efectos de la aplicación del aislado de la invención a otros cultivos se prueban actualmente o se evaluarán posteriormente. Por lo tanto, los ejemplos presentados no pretenden limitar el alcance de esta invención como se define en las reivindicaciones.

60 Ejemplo 8

Estimulación de la emergencia y el rendimiento de las plantas: un ejemplo de ensayos de campo en espinacas.

En los ensayos de campo en espinacas con excepción de los ensayos a gran escala, se utilizó el diseño de bloques al azar con 4 a 5 repeticiones para configurar los experimentos. Las semillas se sembraron en hileras y cada parcela

tenía habitualmente 15 m². El rendimiento se estimó en dos ocasiones después de la cosecha de parcelas representativas de 0,25 m². Antes de comenzar los ensayos de campo, se trataron lotes de semillas de variedades de espinaca utilizadas comercialmente con el producto de fermentación del aislado de la invención fermentado de acuerdo con el protocolo estándar o el protocolo de fermentación optimizado y también se aplicaron a las semillas otros tratamientos apropiados como, por ejemplo, fungicidas comerciales. Las dos dosis del aislado de la invención se usaron generalmente en ensayos de campo; 300 ml/kg de semilla o 10 ml/kg de semilla. El ajuste de la dosis se realizó después de los experimentos en invernadero de dosis-respuesta y es adecuado para aplicaciones industriales. Antes de la siembra, las semillas podrían almacenarse según las normas utilizadas en las prácticas comunes. El ensayo de campo de ejemplo presentado aquí, que demuestra la estimulación de la emergencia de la planta, así como la mejora del rendimiento, se realizó en el sur de Suecia. Las semillas de espinaca se trataron con una dosis de 10 ml/kg del producto de fermentación del aislado de la invención (lote FOM233); los controles fueron semillas no tratadas y semillas tratadas con la dosis estándar del producto químico fungicida Apron. La Figura 9 muestra los datos de la estimulación de la emergencia de la planta. La mejora de la emergencia fue especialmente significativa en dos ocasiones de primera lectura cuando se detectó un aumento de la emergencia de un 33 y 32 % respectivamente (Fig. 9).

El aumento de la emergencia de la planta mejoró visiblemente la cobertura temprana de la planta, que fue claramente mejor que la cobertura obtenida en las semillas no tratadas y las tratadas con el fungicida estándar Apron. Además, las plantas después del tratamiento con el aislado de la invención eran más fuertes y más grandes que las que emergen de semillas no tratadas o de semillas tratadas con Apron. Esto dio lugar a rendimientos significativamente más altos. La Figura 10 muestra el aumento del rendimiento en el ejemplo presentado, en el que el rendimiento se incrementó en un 24 % (cosecha temprana) y un 14 % (cosecha final), respectivamente.

Ejemplo 9

Estimulación de la emergencia y el rendimiento de las plantas: un ejemplo de los ensayos de campo en rúcula.

Los ensayos de campo en rúcula se realizaron de manera similar a los ensayos en espinacas. El diseño experimental se ajustó conforme a las prácticas agronómicas en el sitio de ensayo. Las semillas se sembraron en hileras con un espacio de 6 cm y se eligieron parcelas de alrededor de 4 m² como estándar. El rendimiento se estimó en dos ocasiones después de la recolección aleatoria de rúcula en hileras correspondientes a cada tratamiento; se recolectaron y pesaron plantas de 2 metros (n = 2 o n = 4) de la longitud total de la hilera de hasta 55 metros. El tratamiento de semillas se realizó de una manera similar al de las espinacas; en los ensayos de campo se usaron generalmente dos dosis del aislado de la invención; 300 ml/kg de semilla o 100 ml/kg de semilla. En el sur de Suecia se realizó un ensayo de campo ilustrativo que demuestra la estimulación de la emergencia de la planta, así como el aumento del rendimiento de la rúcula. En este ensayo de campo, las semillas de rúcula se trataron con una dosis de 300 ml/kg del producto de fermentación del aislado de la invención (lote FOM154) fermentado de acuerdo con el protocolo optimizado; los controles fueron semillas no tratadas. La Figura 11 muestra los datos de la estimulación de la emergencia de la planta de rúcula y el aumento del rendimiento después de la aplicación del aislado de la invención. La emergencia aumentó alrededor del 13 %, lo que dio como resultado un aumento del rendimiento del 8 al 18 % según el momento de la cosecha (Fig. 11).

Ejemplo 10

Estimulación de la emergencia y aumento del rendimiento de las plantas: un ejemplo de los ensayos de campo en guisantes.

En los experimentos con guisantes se utilizaron los mismos principios que para los ensayos de campo con el tratamiento de semillas de otros cultivos. Los ensayos de campo se realizaron en el sur de Suecia en granjas comerciales que cultivan guisantes. Generalmente se aplicaron 50 ml de los productos de fermentación por kilogramo de semillas y la mayoría de las veces se utilizó un área de parcela de 15 m². El rendimiento se estimó después de cosechar el guisante del área de la parcela de 10 m². El rendimiento se recalculó a un valor de tendómetro de 100 (T 100) que representa el mismo estado de madurez para todos los guisantes cosechados. En el sur de Suecia se realizó un ensayo de campo ilustrativo que demuestra la estimulación de la emergencia de la planta y el aumento del rendimiento de los guisantes. Las semillas de guisantes se trataron con una dosis de 50 ml/kg del producto de fermentación del aislado de la invención fermentado de acuerdo con el protocolo optimizado (lote FOM150; aproximadamente 9,25 x 10⁹ UFC por ml); los controles fueron semillas no tratadas y semillas tratadas con el fungicida químico Wakil. La Figura 12 muestra los datos del aumento del rendimiento, que fue ligeramente mejor (3 %) que después de la aplicación de Wakil y un 12 % mejor en comparación con el control no tratado. Además, la emergencia de la planta mejoró en un 4 % en comparación con el control no tratado.

Ejemplo 11

Aumento del rendimiento - un ejemplo de los ensayos de campo en zanahoria.

- 5 En los experimentos con zanahoria se utilizaron los mismos principios que para los ensayos de campo con el tratamiento de semillas de otros cultivos
- Los ensayos de campo se realizaron en el sur de Suecia en granjas comerciales que cultivaban zanahorias; generalmente se aplicaron 300 o 100 ml de los productos de fermentación por kilogramo de semillas y el área de la parcela difirió de 20 a 30 m² dependiendo del ensayo. El rendimiento se midió después de cosechar al azar
- 10 zanahorias de una hilera de 0,5 o 1 metro (n = 3) de cada tratamiento. Las zanahorias de cada tratamiento y repetición se recolectaron, contaron y pesaron por separado. Se realizó un ensayo de campo ilustrativo que demuestra el aumento del rendimiento de la zanahoria en el sur de Suecia. En este ensayo de campo, las semillas de zanahoria se trataron con una dosis de 300 ml/kg del producto de fermentación del aislado de la invención (lote FOM076, fermentado de acuerdo con el protocolo estándar); los controles fueron semillas no tratadas y semillas
- 15 tratadas con agua. La Figura 13 muestra los datos del aumento del rendimiento (alrededor del 19 % en comparación con los controles) después de la aplicación del aislado de la invención.

Ejemplo 12

- 20 Aumento del rendimiento: un ejemplo de los ensayos de campo con el tratamiento en la raíz/suelo de lechuga iceberg.

En ensayos de campo con tratamiento de la raíz/suelo de la lechuga iceberg, las plántulas cultivadas comercialmente se trataron con 10 ml del producto de fermentación del aislado de la invención, fermentadas de

25 acuerdo con el protocolo estándar o con el protocolo optimizado. El tratamiento generalmente se realizó durante el trasplante de plántulas en el campo. Antes del tratamiento, los productos de fermentación se diluyeron generalmente en proporciones de 1 parte del producto de fermentación ($5,0 \times 10^9$ a $1,0 \times 10^{10}$ UFC por ml, dependiendo del lote del producto de fermentación) y 1 parte de agua del grifo. Opcionalmente, las plántulas también pueden tratarse con las diversas preparaciones de las células bacterianas del aislado de la invención rehidratadas en disolventes apropiados

30 inorgánicos u orgánicos compatibles desde el punto de vista agrícola. Antes del trasplante, las bandejas con plántulas (150 a 300 plantas por cada tratamiento) se empaparon en el volumen apropiado del producto de fermentación, o el mismo volumen de agua que el control, y luego se trasplantaron al campo. En caso necesario, las plántulas también pueden tratarse unos días antes del trasplante y almacenarse de acuerdo con las prácticas agrícolas comerciales. Durante el trasplante se siguieron los estándares utilizados para el cultivo en campo de

35 lechuga iceberg (un espacio de 30 cm entre hileras y un espacio de 27 cm entre plantas). La lechuga se cosechó de acuerdo con las prácticas agrícolas comunes y el aumento del rendimiento se midió en gramos de aumento de peso por cada cabeza de iceberg.

- La Figura 14 muestra los datos del experimento de campo realizado en el sur de Suecia. En este ensayo, el
- 40 rendimiento de la lechuga iceberg (g por cabeza de lechuga) aumentó un promedio del 41 % en comparación con el rendimiento promedio obtenido con las plantas tratadas con agua.

Ejemplo 13

- 45 Aumento de la floración y del rendimiento: un ejemplo de los ensayos de campo con el tratamiento de raíz/suelo en fresa.

En ensayos de campo con tratamiento de raíz/suelo de fresa, las plántulas cultivadas comercialmente se trataron con 10 ml del producto de fermentación del aislado de la invención (lote FOM095, fermentado de acuerdo con el

50 protocolo estándar, alrededor de $1,2 \times 10^{10}$ UFC por ml) en el momento del trasplante de las plántulas al campo durante el verano. Esto fue seguido por el segundo tratamiento realizado como riego de la planta durante la primavera siguiente con 20 ml del producto de fermentación (lote FOM147, fermentado de acuerdo con el protocolo optimizado, alrededor de $3,1 \times 10^9$ UFC por ml). En caso necesario, se realizaron ajustes a las concentraciones apropiadas de los productos de fermentación por dilución con agua del grifo. Para ambos tratamientos, la aplicación

55 del mismo volumen de agua se utilizó como control. En el ensayo se usaron plántulas comerciales, que se plantaron de acuerdo con los estándares utilizados para el cultivo en campo de fresas (un espacio de 90 cm entre filas y un espacio de 30 cm entre plantas). Las mediciones del número de flores establecidas se realizaron en 7 ocasiones diferentes y las fresas maduras se recolectaron en 6 ocasiones diferentes para la medición del rendimiento. Las Figuras 15 y 16 muestran el aumento del establecimiento de flores y el aumento del rendimiento de las bayas

60 detectadas durante la segunda temporada de crecimiento. Tanto el aumento de la floración como el aumento del rendimiento son evidentes en todas las ocasiones de lectura, con excepción de la primera cosecha de las bayas, y son significativas durante toda la temporada de floración y cosecha. Dependiendo de la ocasión de la lectura, la floración aumentó de un 20 % (lectura del 30 de mayo) hasta el 142 % (lectura del 12 de mayo), como se muestra en la figura 15.

65

El aumento de la floración dio como resultado también un aumento significativo del rendimiento de las bayas. El rendimiento acumulado durante toda la temporada de cosecha fue un 43 % mayor en comparación con el rendimiento de las bayas obtenidas de plantas de control tratadas con agua (Fig. 16).

5 Ejemplo 14

Mejora de la madurez del brócoli y su rendimiento inicial: un ejemplo de los ensayos de campo con el tratamiento de brócoli en la raíz/suelo.

- 10 En ensayos de campo con tratamiento de brócoli en la raíz/suelo, las plántulas cultivadas comercialmente se trataron con 10 ml por plántula del producto de fermentación del aislado de la invención, fermentado de acuerdo con el protocolo estándar o con el protocolo optimizado. El tratamiento generalmente se realizó durante el trasplante de plántulas al campo. Antes del tratamiento, el o los productos de fermentación se diluyeron con agua del grifo para ajustar la concentración de células a aproximadamente $2,5 - 7,5 \times 10^9$ UFC por ml. Antes del trasplante, las bandejas con plántulas se empaparon en el volumen apropiado del producto de fermentación, o el mismo volumen de agua que el control, y luego se trasplantaron al campo. En caso necesario, las plántulas también pueden tratarse unos días antes del trasplante y almacenarse de acuerdo con las prácticas agrícolas comerciales. Durante el trasplante se siguieron los estándares utilizados para el cultivo en campo de brócoli (un espacio de 30 cm entre hileras y un espacio de 30 cm entre plantas o un espacio de 50 cm entre hileras y un espacio de 50 cm entre plantas). El brócoli se cosecha de acuerdo con las prácticas agrícolas comunes en varias ocasiones. El aumento de rendimiento fue al principio registrado en gramo por parcela; normalmente se utilizan parcelas de 20 m^2 y luego se vuelven a calcular para el correspondiente rendimiento en kilogramos por hectárea. La Figura 17 muestra los datos del rendimiento acumulativo de brócoli cosechado en cinco ocasiones diferentes durante el experimento de campo realizado en el sur de Suecia; con el lote de producto de fermentación FOM076 (fermentado según el protocolo estándar, alrededor de $6,5 \times 10^9$ UFC por ml). El efecto de la aplicación del aislado de la invención fue sorprendente, especialmente durante el inicio del período de recolección. La cantidad de brócoli maduro y listo para cosechar se mejoró en más del 200 % durante la primera cosecha y en más del 20 % durante la segunda y la tercera cosechas en comparación con el rendimiento obtenido de las plántulas de control tratadas con agua (Fig. 17). Aunque la mejora de la cosecha no fue tan fuerte al final de la temporada de cosecha, económicamente la maduración temprana mejorada es de una importancia excepcional para los potenciales usuarios/agricultores, ya que en promedio las plantas tratadas con el aislado de la invención podrían haberse cosechado 5 días antes en comparación con las tratadas con agua.

Ejemplo 15

- 35 Aumento del rendimiento y mejora de la calidad del repollo: un ejemplo de los ensayos de campo con el tratamiento de la raíz/suelo de la col.

- En los ensayos de campo con tratamiento de la raíz/suelo del repollo, las plántulas cultivadas comercialmente se trataron con entre 5 y 10 ml por plántula del producto de fermentación del aislado de la invención fermentado de acuerdo con el protocolo estándar o con el protocolo optimizado y el tratamiento generalmente se realizó durante el trasplante de plántulas al campo. Antes del tratamiento, el o los productos de fermentación se diluyeron con agua del grifo para ajustar la concentración de células a alrededor de $5,0 - 7,0 \times 10^9$ UFC por ml. Antes del trasplante, las bandejas con plántulas se empaparon en un volumen apropiado del producto de fermentación, o el mismo volumen de agua que el control, y luego se trasplantaron al campo. En caso necesario, las plántulas se pueden tratar unos días antes del trasplante y almacenarlas de acuerdo con las prácticas agrícolas comerciales. Los estándares utilizados para el cultivo en campo de repollo (un espacio de 50 cm entre filas y un espacio de 50 cm entre plantas) se siguieron durante el trasplante. El repollo se cosechó de acuerdo con las prácticas agrícolas comunes y se estimó el peso de cada cabeza de repollo. La Figura 18 muestra los datos del aumento del rendimiento en el repollo a principios del verano (ensayo a gran escala; 50 plántulas de repollo por tratamiento, 5 bloques) después del tratamiento con el lote del producto de fermentación FOM154 (5 ml, fermentado según el protocolo optimizado, alrededor de $6,5 \times 10^9$ UFC por ml). En este ensayo, el peso de las cabezas de repollo aumentó en un 53 % (Fig. 18) después de la aplicación del aislado de la invención. Además del aumento del rendimiento, también se observó una mejora significativa de la fracción comercializable del repollo (aprobada para la venta) (Fig. 18; +38 % en comparación con las plántulas tratadas con agua). Esto tiene una importancia económica significativa para los posibles usuarios/agricultores.

Ejemplo 16

- 60 Aumento del rendimiento y mejora de la calidad del tubérculo: un ejemplo de los ensayos de campo con tratamiento del tubérculo de la patata.

- Los experimentos de campo en patata, con la excepción de un ensayo a gran escala, se configuraron como un diseño de bloques al azar con 5 repeticiones. Cada repetición de cada tratamiento incluyó 60 semillas de tubérculos que se sembraron en dos o tres hileras. Las hileras y las distancias entre semillas seguían las prácticas convencionales en el cultivo de la patata. Los ensayos en patata se realizaron en Skane y en Uppland/Dalarna (parte

central de Suecia). Los ensayos se realizaron en cultivares de patata nueva y tardía. En la patata nueva, todos los ensayos de campo se cubrieron después de la siembra hasta que las plantas se desarrollaron completamente, de acuerdo con la práctica de cultivo normal. En uno de los primeros nuevos experimentos de campo en patata, se incluyó un tratamiento no cubierto. Los tubérculos de patata fueron tratados en conexión directa con la siembra o hasta con diez días de anticipación. En general, el producto de fermentación fermentado de acuerdo con el protocolo estándar o con el protocolo optimizado se diluyó hasta un 50 % de concentración utilizando agua del grifo normal para el tratamiento de tubérculos, pero también se evaluó el efecto del producto de fermentación a una concentración del 10 %. Los tubérculos se sumergieron en las preparaciones bacterianas respectivas durante 20 a 30 minutos, y luego se plantaron con una máquina comercial para plantar patatas. En el caso de que los tratamientos se realizaran varios días antes de la siembra, los tubérculos inoculados se secaron al aire antes de colocarlos en el almacén de patatas. Al sumergir, cada tubérculo de patata recibió alrededor de 0,75 a 1 ml de suspensión bacteriana. Además, se realizó otro método de aplicación bacteriana utilizando un dispositivo de pulverización estándar que se utiliza comercialmente para el tratamiento químico de tubérculos de patata. Usando este dispositivo, se rociaron tubérculos en una dosis de 4 litros de suspensión bacteriana por tonelada, lo que significa que cada tubérculo recibió aproximadamente 0,2 ml de suspensión. La eficacia de este método de inoculación también se evaluó mediante la pulverización de tubérculos en diferentes puntos temporales, de uno a tres meses antes de la siembra. Para mejorar la adhesión y mejorar la protección de las bacterias en las semillas de tubérculos de patata, se desarrolló una formulación húmeda que incluye una combinación de un compuesto adhesivo compatible desde el punto de vista agrícola y un tensioactivo, ambos con buenos perfiles ambientales. Esta formulación se aplicó en experimentos de campo, tanto en tratamientos de inmersión como de pulverización. La emergencia/establecimiento de la planta, el momento de la floración, los síntomas de la enfermedad final y el rendimiento/rendimiento comercial se calificaron y midieron en todos los ensayos de campo.

El efecto del aislado de la invención en el nuevo cultivar de patata 'Rocket' se muestra en la figura 19. El tratamiento bacteriano mejoró significativamente el desarrollo de las plantas emergidas y aumentó el rendimiento final, con un aumento del rendimiento promedio del 24 %.

La aplicación de la formulación húmeda del aislado de la invención en los cultivares de patata temprana y tardía aumentó el rendimiento final del tubérculo en un 17 % (patata nueva) y en un 4 % (patata tardía), en comparación con los aumentos de rendimiento correspondientes del 8 % y 3 % después de la aplicación del producto de fermentación no formulado (Figura 20).

Ejemplo 17

Mejora del crecimiento de árboles y raíces en viveros de plantas.

Para probar los efectos de la aplicación del aislado de la invención en la mejora del crecimiento de las plántulas de árboles en viveros de plantas, se usó el producto de fermentación del aislado de la invención, cultivado de acuerdo con el protocolo de fermentación optimizado, para tratar las plántulas recién emergidas de pino silvestre. Las semillas se sembraron y trataron de acuerdo con las prácticas comerciales y los métodos utilizados en los viveros de plantas. Las plántulas se regaron con 5 ml del producto de fermentación ($2-3,5 \times 10^9$ por ml) por plántula 9 días después de la siembra; los controles fueron plántulas tratadas con la misma cantidad de agua. El crecimiento de las plántulas se controló visualmente 3, 6 y 10 semanas después de los tratamientos. Trece semanas después de los tratamientos, se midió el peso seco de las raíces y los brotes después de recoger muestras representativas de las plántulas. Los resultados resumidos en la Tabla 5 muestran que la aplicación del aislado de la invención produce un mayor peso seco de las raíces y brotes de las plántulas de pino silvestre, lo que también se ilustra en la Figura 21. El peso seco de la raíz es de hasta el 14 % y el peso seco de la planta superior es hasta un 31 % mayor en comparación con el control tratado con agua. El peso total de las plántulas tratadas con el aislado de la invención es, por lo tanto, hasta un 25 % mayor que el peso de las plántulas de control tratadas con agua. La *Pseudomonas azotoformans*, cepa F30A, de la presente invención, por lo tanto, también puede usarse para mejorar el crecimiento de árboles y/o plántulas de árboles.

Tabla 5. Mejora del peso seco de plántulas de pino silvestre después de la aplicación del aislado de la invención

Tratamiento	N.º plántulas recolectadas	Peso medio por plántula (g)/porcentaje de mejora (%)					
		Raíz		Planta superior		Total	
Agua	29	0,21 g		0,39 g		0,60 g	
Producto de fermentación ($2,0 \times 10^9$ por ml)	27	0,24 g	14 %	0,51 g	31 %	0,75 g	25 %
Producto de fermentación ($3,3 \times 10^9$ por ml)	30	0,22 g	5 %	0,49 g	26 %	0,71 g	18 %

Tratamiento	N.º plántulas recolectadas	Peso medio por plántula (g)/porcentaje de mejora (%)					
		Raíz		Planta superior		Total	
10 ⁹ por ml)							

Ejemplo 18

Compatibilidad con productos agrícolas. Ejemplos del crecimiento del aislado de la invención junto con ingredientes
5 activos de productos agrícolas biológicos, orgánicos y químicos.

Tabla 6. Valores límite de compatibilidad ($\mu\text{g ml}^{-1}$), basados en las dosis respectivas recomendadas para el
tratamiento de semillas, para fungicidas químicos sintéticos seleccionados e ingredientes orgánicos utilizados
comercialmente para el tratamiento de semillas y los valores de compatibilidad ($\mu\text{g ml}^{-1}$) en los cuales el crecimiento
10 de *P. azotoformans* F30A ($3,3 \times 10^8 \text{ ml}^{-1}$) no se inhibe en presencia de compuestos probados.

Ingrediente activo	Valor límite de compatibilidad de ingrediente ($\mu\text{g/ml}$)	Valor de compatibilidad ($\mu\text{g/ml}$) de la combinación ingrediente/P. azotoformans F30A ($3,3 \times 10^8 \text{ ml}^{-1}$)
Metalaxil-m	710	>1000
Iprodion	1930	>1000*)
Thiram	3200	>3520
Quitano	360	>1000
Ácidos húmicos y fúlvicos.	25	>1000
*) Las concentraciones más altas no pudieron ser probadas debido a la precipitación.		

Tabla 7. Compatibilidad de la *P. azotoformans* F30A con tres agentes de control biológico comerciales según el
ensayo de unión (ensayo de placa doble)

15

Aislado bacteriano A	Aislado bacteriano B	Compatibilidad
<i>P. azotoformans</i> F30 A	<i>Pseudomonas</i> sp.	Completa (+++)
<i>P. azotoformans</i> F30 A	<i>Bacillus</i> sp. A	Completa (+++)
<i>P. azotoformans</i> F30 A	<i>Bacillus</i> sp. B	Completa (+++)

En todos los ejemplos anteriores, el aislado de la invención no mostró ningún signo de deterioro del crecimiento y,
por lo tanto, era totalmente compatible con todos los ingredientes activos comercializados en las concentraciones
recomendadas para el tratamiento de semillas.

20

Referencias

1. Benizri, E., Baudoin, E. Guckert, A. 2001: Root Colonization by Inoculated Plant Growth-Promoting Rhizobacteria. *Biocontrol Science and Technology* 11: 557-574Brisbane, P.G., Harris, J.R., and Moen, R. 1989: Inhibition of fungi from wheat roots by *Pseudomonas fluorescens* 2-79. *Soil Biol. Biochem.* 21: 1019-1026.
2. Compant, S., Duffy, B., Nowak, J., Clement, C. and d Ait Barka, E. 2005. Use of Plant Growth-Promoting Bacteria for Biocontrol of Plant Diseases: Principles, Mechanisms of Action, and Future Prospects. *Appl. and Environ. Microbiol.*, Sept. 2005, p. 4951-4959 Vol. 71, No. 9
3. Dabboussi, F., Hamze, M., Elomari, M., Verhille, S., Baida, N., Izard, D. and Leclerc, H. 1999: *Pseudomonas libanensis* sp. nov., a new species isolated from Lebanese spring waters. *Int J Syst Bacteriol.* 49: 1091-1101.
4. Davies, K.G., and Whitbread, R. 1989: Factors affecting the colonisation of a root system by fluorescent *Pseudomonads*: The effects of water, temperature and soil microflora. *Plant and Soil* 116: 247-256.
5. Deshwal, V. K., Kumar, T., Dubey, R. C. and Maheshwari, D. K., 2006: Long-term effect of *Pseudomonas aeruginosa* GRC1 on yield of subsequent crops of paddy after mustard seed bacterization. *Current Science* 91: 423-424.
6. DeFreitas, R.J. and Germida, J.J. 1991: *Pseudomonas cepacia* and *Pseudomonas putida* as winter wheat inoculants for biocontrol of *Rhizoctonia solani*. *Canadian journal of microbiology* 37: 780-784.
7. Dowling, D.N. and F. O'. Gara. 1994: Metabolites of *Pseudomonas* involved in the biocontrol of plant disease. *Trends Biotechnol.* 12: 133-141.
8. Garcia de Salamone, I. E., Hynes, R. K. and Nelson, L. M. 2001: Cytokinin production by plant growth promoting rhizobacteria and selected mutants. *Can. J. Microbiol.* 47: 404-411.

9. Gerhardson, B., Alstrom, S. and Rämert, B. 1985: Plant reactions to inoculation of roots with fungi and bacteria. *Phytopathol. Z.* 114: 108-117.
10. Hemming BC. 1990: Bacteria as antagonists in biological control of plant pathogens. In: Baker RR, Dunn PE, eds. *New directions in biological control: Alternatives for suppressing agricultural pests and diseases*. New York: Alan R. Liss. 223-242.
- 5 11. Hökeberg, M., Gerhardson, B. and Johnsson, L. 1997. Biological control of cereal seed-borne diseases by seed bacterization with greenhouse selected bacteria. *Europea Journal of Plant Pathology* 103, 25-33.
12. Howie WJ. and Echandi E (1983) Rhizobacteria: Influence of cultivar and soil type on plant growth and yield of potato. *Science* 4:86.
- 10 13. Kloepper, J. W., Leong, J., Teintze, M., and Schroth, M. N. 1980a: Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth promoting rhizobacteria. *Nature* 286:885-886
14. Kloepper J W, Schroth M N, Miller T D 1980b: Effects of rhizosphere colonization by plant growth-promoting rhizobacteria on potato plant development and yield *Phytopathology* 70: 1078-1082.
- 15 15. Kloepper, JW and Schroth, MN. 1978. Plant growth promoting rhizobacteria on radishes. *Proc. 4th Int. Conference on Plant Pathogenic bacteria*. Angers 879-882.
16. Kropp BR, Thomas E, Pounder JI, Anderson AJ. 1996: Increased emergence of spring wheat after inoculation with *Pseudomonas chlororaphis* isolate 2E3 under field and laboratory conditions. *Biology and fertility of soils*. 23: 200-206.
- 20 17. Levenfors, J. P., Eberhard T. H., Levenfors, J. J., Gerhardson B. and Hökeberg M. 2008: Biological control of snow mould (*Microdochium nivale*) in winter cereals by *Pseudomonas brassicacearum*, MA250. *BioControl* 53: 651-665.
18. Micsinai, A., Borsodi, A. K., Csengeri, V., Horvath, A., Oravecz, O., Nikolausz, M., Reskone, M. N. and Marialigeti, K. 2003 Rhizome-associated bacterial communities of healthy and declining reed stands in Lake Velencei, Hungary. *Hydrobiologia* 506: 707-713.
- 25 19. Maeng, J. and Khudairi, A.K. 1973: Studies on the flowering mechanism in *Lemna*. I. Amino acids changes during flower induction. *Physiol. Plant* 28: 264-270.
20. Loper, J.E. and Buyer, J.S., 1991. Siderophores in microbial interactions on plant surfaces. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 4: 5-13.
- 30 21. Lucy, M., Reed, E., and Glick, B. R. 2004 Applications of free living plant growth-promoting rhizobacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 86: 1-25.
22. Lugtenberg, B and Kamilova, F. 2009. Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria *Annual Review of Microbiology* Vol. 63: 541-556
22. Paten, C. and Glick, B. R. 1996: Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. *Can. J. Microbiol.* 42:207-220.
- 35 23. Piao, Z., Cui, Z., Yin, B., Hu, J., Zhou, C., Xie, G., Su, B. and Yin, S. 2005: Changes in acetylene reduction activities and effects of inoculated rhizosphere nitrogen-fixing bacteria on rice. *Biology and Fertility of Soils* 41: 371-378.
24. Stanier, R. Y., Palleroni, N. J. and Doudoroff, M. 1966: The aerobic pseudomonads: a taxonomic study. *Journal of General Microbiology* 43: 159-271.
- 40 25. Suslow, T.V. and Schroth, M.N. 1982: Rhizobacteria of sugar beets: Effects of seed application and root colonization on yield. *Phytopathology* 72:199-206.
26. O'Sullivan, D.J. and O'Gara F. 1992: Traits of fluorescent *Pseudomonas* spp. involved in suppression of plant root pathogens. *Microbiol Mol Biol Rev.* 56: 662-676.
27. Urashima, Y., Suga, Y. and Hori, K. 2006: Growth Promotion of Spinach by Fluorescent *Pseudomonas* Strains under Application of Organic Materials. *Soil Science & Plant Nutrition* 51: 841 - 847.
- 45 28. Vivekananthan, R., Ravia, M., Saravanakumara, D., Kumarb, N., Prakasama V. and Samiyappana, R. 2004: Microbially induced defense related proteins against postharvest anthracnose infection in mango. *Crop Protection* 23:11, 1061-1067
29. Weller, D.M. 1988: Biological Control of Soilborne Plant Pathogens in the Rhizosphere with Bacteria. *Annual Review of Phytopathology* 26: 379-407.
- 50 30. Kloepper, J.W., Scher, W. and Murphy, F. 1986: Emergence-promoting rhizobacteria PCT/US1986/001375, WO/1987/000194
31. Kloepper, J.W. and Scher, F. 1996 Plant growth-promoting rhizobacteria for agronomic, nonroot crops US1996/5503651
- 55 32. Kloepper, J.W., Simonson, C. and Lifshitz, R. 1996: Bacterial cultures for root-colonizing plants. US1996/5503652
33. Nautiyal C.S. 2002: Biologically pure culture of bacteria, which suppresses diseases caused by pathogens in chickpea crops and a culture of bacteria comprising a strain of *Pseudomonas fluorescens*. US2002/6495362
34. Raaijmakers, J.M., Weller, D.M., Tomashow, L. S. and Cook, R.J. 2002: Biocontrol agents for take-all. US2002/6447770
- 60 35. Tuzun, S., Kloepper, J. W., Rodrigues-Kabana, R., and Kenney, D. S. Biological compositions and methods for enhancing plant growth and health and producing disease-suppressive plants 2000: PCT/US2000/005147, WO0051435.

TRATADO DE BUDAPEST SOBRE EL RECONOCIMIENTO
INTERNACIONAL DEL DEPÓSITO DE MICROORGANISMOS
A LOS FINES DEL PROCEDIMIENTO EN MATERIA DE PATENTES



Lantmännen BioAgri AB
P.O. Box 914
751 09 Uppsala
SUECIA

DECLARACIÓN SOBRE LA VIABILIDAD
emitida conforme a la Regla 10.2 por la
AUTORIDAD INTERNACIONAL DE DEPÓSITO
identificada al pie de esta página

I. DEPOSITARIO	II. IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO
Nombre: Lantmännen BioAgri AB P.O. Box 914 Dirección: 751 09 Uppsala SUECIA	Número de acceso otorgado por la AUTORIDAD INTERNACIONAL DE DEPÓSITO: DSM 22077 Fecha del depósito o de la transferencia ¹ : 03-12-2008
III. DECLARACIÓN SOBRE LA VIABILIDAD	
La viabilidad del microorganismo identificado en el apartado II se probó el 03-12-2008 En esa fecha, dicho microorganismo era ☒ viable ☐ ya no era viable	
IV. CONDICIONES EN LAS QUE SE HA REALIZADO EL ENSAYO DE VIABILIDAD ⁴	
V. AUTORIDAD INTERNACIONAL DE DEPÓSITO	
Nombre: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Dirección: Inhoffenstr. 7 B D-38124 Braunschweig	Firma de la persona o personas que tienen el poder de representación de la Autoridad Internacional de Depósito o del funcionario o funcionarios autorizados: Fecha: 15-12-2008

¹ Indica la fecha del depósito original o, cuando se ha hecho un nuevo depósito o una transferencia, la fecha relevante más reciente (fecha del nuevo depósito o fecha de la transferencia).

² En los casos contemplados en la Regla 10.2(a) (ii) y (iii), indicar el ensayo de viabilidad más reciente.

³ Marcar con una cruz la casilla aplicable.

⁴ Rellenar si se ha requerido la información y si los resultados del ensayo fueron negativos.

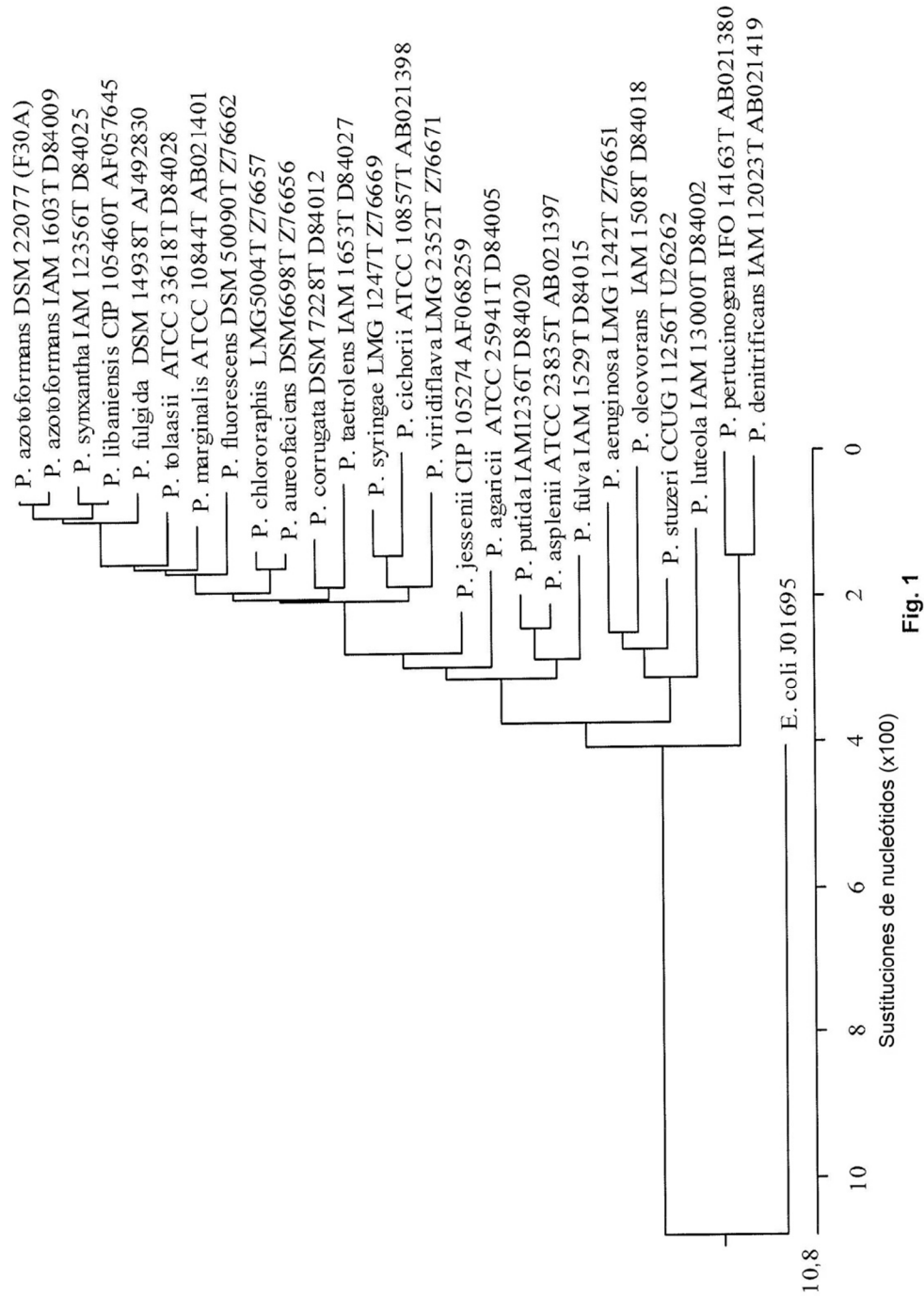
Referencias

1. Benizri, E., Baudoin, E. Guckert, A. 2001: Root Colonization by Inoculated Plant Growth-Promoting Rhizobacteria. *Biocontrol Science and Technology* 11: 557-574
- 5 Brisbane, P.G., Harris, J.R., and Moen, R. 1989: Inhibition of fungi from wheat roots by *Pseudomonas fluorescens* 2-79. *Soil Biol. Biochem.* 21: 1019-1026.
2. Compant, S., Duffy, B, Nowak, J., Clement, C. and d Ait Barka, E. 2005. Use of Plant Growth-Promoting Bacteria for Biocontrol of Plant Diseases: Principles, Mechanisms of Action, and Future Prospects. *Appl. and Environ. Microbiol.*, Sept. 2005, p. 4951-4959 Vol. 71, No. 9
3. Dabboussi, F., Hamze, M., Elomari, M., Verhille, S., Baida, N., Izard, D. and Leclerc, H. 1999: *Pseudomonas libanensis* sp. nov., a new species isolated from Lebanese spring waters. *Int J Syst Bacteriol.* 49: 1091-1101.
- 10 4. Davies, K.G., and Whitbread, R. 1989: Factors affecting the colonisation of a root system by fluorescent *Pseudomonads*: The effects of water, temperature and soil microflora. *Plant and Soil* 116: 247-256.
5. Deshwal, V. K., Kumar, T., Dubey, R. C. and Maheshwari, D. K., 2006: Long-term effect of *Pseudomonas aeruginosa* GRC1 on yield of subsequent crops of paddy after mustard seed bacterization. *Current Science* 91: 423-424.
- 15 6. DeFreitas, R.J. and Germida, J.J. 1991: *Pseudomonas cepacia* and *Pseudomonas putida* as winter wheat inoculants for biocontrol of *Rhizoctonia solani*. *Canadian journal of microbiology* 37: 780-784.
7. Dowling, D.N. and F. O'. Gara. 1994: Metabolites of *Pseudomonas* involved in the biocontrol of plant disease. *Trends Biotechnol.* 12: 133-141.
- 20 8. Garcia de Salamone, I. E., Hynes, R. K. and Nelson, L. M. 2001: Cytokinin production by plant growth promoting rhizobacteria and selected mutants. *Can. J. Microbiol.* 47: 404-411.
9. Gerhardson, B., Alstrom, S. and Rämert, B. 1985: Plant reactions to inoculation of roots with fungi and bacteria. *Phytopathol. Z.* 114: 108-117.
10. Hemming BC. 1990: Bacteria as antagonists in biological control of plant pathogens. In: Baker RR, Dunn PE, eds. *New directions in biological control: Alternatives for suppressing agricultural pests and diseases*. New York: Alan R. Liss. 223-242.
- 25 11. Hökeberg, M., Gerhardson, B. amd Johnsson, L. 1997. Biological control of cereal seed-borne diseases by seed bacterization with greenhouse selected bacteria. *Europea Journal of Plant Pathology* 103, 25-33.
12. Howie WJ. and Echandi E (1983) Rhizobacteria: Influence of cultivar and soil type on plant growth and yield of potato. *Science* 4:86.
- 30 13. Kloepper, J. W., Leong, J., Teintze, M., and Schroth, M. N. 1980a: Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth promoting rhizobacteria. *Nature* 286:885-886
14. Kloepper J W, Schroth M N, Miller T D 1980b: Effects of rhizosphere colonization by plant growth-promoting rhizobacteria on potato plant development and yield *Phytopathology* 70: 1078-1082.
- 35 15. Kloepper, JW and Schroth, MN. 1978. Plant growth promoting rhizobacteria on radishes. *Proc. 4th Int. Conference on Plant Pathogenic bacteria*. Angers 879-882.
16. Kropp BR, Thomas E, Pounder JI, Anderson AJ. 1996: Increased emergence of spring wheat after inoculation with *Pseudomonas chlororaphis* isolate 2E3 under field and laboratory conditions. *Biology and fertility of soils*. 23: 200-206.
- 40 17. Levenfors, J. P., Eberhard T. H., Levenfors, J. J., Gerhardson B. and Hökeberg M. 2008: Biological control of snow mould (*Microdochium nivale*) in winter cereals by *Pseudomonas brassicacearum*, MA250. *BioControl* 53: 651-665.
18. Micsinai, A., Borsodi, A. K., Csengeri, V., Horvath, A., Oravecz, O., Nikolausz, M., Reskone, M. N. and Marialigeti, K. 2003 Rhizome-associated bacterial communities of healthy and declining reed stands in Lake Velencei, Hungary. *Hydrobiologia* 506: 707-713.
- 45 19. Maeng, J. and Khudairi, A.K. 1973: Studies on the flowering mechanism in *Lemna*. I. Amino acids changes during flower induction. *Physiol. Plant* 28: 264-270.
20. Loper, J.E. and Buyer, J.S., 1991. Siderophores in microbial interactions on plant surfaces. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 4: 5-13.
- 50 21. Lucy, M., Reed, E., and Glick, B. R. 2004 Applications of free living plant growth-promoting rhizobacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 86: 1-25.
22. Lugtenberg, B and Kamilova, F. 2009. Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria *Annual Review of Microbiology* Vol. 63: 541-556
22. Patten, C. and Glick, B. R. 1996: Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. *Can. J. Microbiol.* 42:207-220.
- 55 23. Piao, Z., Cui, Z., Yin, B., Hu, J., Zhou, C., Xie, G., Su, B. and Yin, S. 2005: Changes in acetylene reduction activities and effects of inoculated rhizosphere nitrogen-fixing bacteria on rice. *Biology and Fertility of Soils* 41: 371-378.
24. Stanier, R. Y., Palleroni, N. J. and Doudoroff, M. 1966: The aerobic pseudomonads: a taxonomic study. *Journal of General Microbiology* 43: 159-271.
- 60 25. Suslow, T.V. and Schroth, M.N. 1982: Rhizobacteria of sugar beets: Effects of seed application and root colonization on yield. *Phytopathology* 72:199-206.
26. O'Sullivan, D.J. and O'Gara F. 1992: Traits of fluorescent *Pseudomonas* spp. involved in suppression of plant root pathogens. *Microbiol Mol Biol Rev.* 56: 662-676.
27. Urashima, Y., Suga, Y. and Hori, K. 2006: Growth Promotion of Spinach by Fluorescent *Pseudomonas* Strains under Application of Organic Materials. *Soil Science & Plant Nutrition* 51: 841 - 847.

28. Vivekananthan, R., Ravia, M., Saravanakumara, D., Kumarb, N., Prakasama V. and Samiyappana, R. 2004: Microbially induced defense related proteins against postharvest anthracnose infection in mango. *Crop Protection* 23:11, 1061-1067
29. Weller, D.M. 1988: Biological Control of Soilborne Plant Pathogens in the Rhizosphere with Bacteria. *Annual Review of Phytopathology* 26: 379-407.
- 5 30. Kloepper, J.W., Scher, W. and Murphy, F. 1986: Emergence-promoting rhizobacteria PCT/US1986/001375, WO/1987/000194
31. Kloepper, J.W. and Scher, F. 1996 Plant growth-promoting rhizobacteria for agronomic, nonroot crops US1996/5503651
- 10 32. Kloepper, J.W., Simonson, C. and Lifshitz, R. 1996: Bacterial cultures for root-colonizing plants. US1996/5503652
33. Nautiyal C.S. 2002: Biologically pure culture of bacteria, which suppresses diseases caused by pathogens in chickpea crops and a culture of bacteria comprising a strain of *Pseudomonas fluorescens*. US2002/6495362
34. Raaijmakers, J.M., Weller, D.M., Tomashow, L. S. and Cook, R.J. 2002: Biocontrol agents for take-all. US2002/6447770
- 15 35. Tuzun, S., Kloepper, J. W., Rodrigues-Kabana, R., and Kenney, D. S. Biological compositions and methods for enhancing plant growth and health and producing disease-suppressive plants 2000: PCT/US2000/005147, WO0051435.

REIVINDICACIONES

1. Una cepa biológicamente pura de *Pseudomonas azotoformans*, cepa F30A, que se ha depositado en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH y a la que se le ha asignado el número de acceso DSM 5 22077.
2. Uso de la cepa biológicamente pura de *Pseudomonas azotoformans*, cepa F30A, como se define en la reivindicación 1, para estimular la germinación de las semillas, la emergencia de las plantas y/o el crecimiento de las plantas.
3. Uso de acuerdo con la reivindicación 2, en el que dicha semilla y/o planta es dicotiledónea.
4. Uso de acuerdo con la reivindicación 2, en el que dicha semilla y/o planta es monocotiledónea.
5. Un producto de fermentación de una cepa biológicamente pura de *Pseudomonas azotoformans*, cepa F30A, como se define en la reivindicación 1, comprendiendo dicho producto de fermentación comprendiendo células bacterianas de la cepa de *Pseudomonas azotoformans* F30A y su medio de crecimiento utilizado.
6. Una composición agrícola que comprende una cepa biológicamente pura de *Pseudomonas azotoformans*, cepa F30A, como se define en la reivindicación 1, opcionalmente en combinación con uno o más portadores líquidos y/o sólidos, comprendiendo dicha composición opcionalmente además uno o más microorganismos promotores adicionales del crecimiento de las plantas, microorganismos de control biológico, fertilizantes orgánicos y/o agroquímicos.
7. Un método para estimular la germinación de semillas, la emergencia de plantas y/o el crecimiento de plantas que comprende la etapa de aplicar el producto de fermentación de la reivindicación 5, la composición agrícola de la reivindicación 6 o un sobrenadante obtenido de un cultivo de una cepa biológicamente pura de *Pseudomonas azotoformans*, cepa F30A, como se define en la reivindicación 1, a una semilla, una planta y/o el entorno que rodea a dicha semilla o planta.
8. Un método de acuerdo con la reivindicación 7, en el que dicho producto de fermentación de la reivindicación 5, dicha composición agrícola de la reivindicación 6, o dicho sobrenadante se aplica a las raíces de una planta.
9. Un método de acuerdo con la reivindicación 7, en el que dicho producto de fermentación de la reivindicación 5, dicha composición agrícola de la reivindicación 6, o dicho sobrenadante se aplica al suelo antes y/o después de la emergencia de las raíces de las plantas.
10. Un método de acuerdo con la reivindicación 7, en el que dicho producto de fermentación de la reivindicación 5, dicha composición agrícola de la reivindicación 6, o dicho sobrenadante se aplica a unidades de propagación vegetativa de las plantas.
11. Un método de acuerdo con la reivindicación 7, en el que dicho producto de fermentación de la reivindicación 5, dicha composición agrícola de la reivindicación 6, o dicho sobrenadante se aplica a medios de cultivo de plantas que rodean a las semillas y/o plantas.
12. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7-11, en el que la planta es, o la semilla se desarrollará en, una planta monocotiledónea.
13. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7-11, en el que la planta es, o la semilla se desarrollará en, una planta dicotiledónea.
14. Un método para preparar una composición agrícola que comprende una cepa biológicamente pura de *Pseudomonas azotoformans*, cepa F30A, como se define en la reivindicación 1, o un sobrenadante obtenido de un cultivo de dicha cepa biológicamente pura de *Pseudomonas azotoformans*, cepa F30A, que comprende la etapa de mezclar dicha cepa *Pseudomonas azotoformans*, F30A, o dicho sobrenadante de la misma con uno o más portadores líquidos o sólidos y, opcionalmente, uno o más microorganismos promotores del crecimiento de la planta adicionales, microorganismos de control biológico, fertilizantes orgánicos y/o productos agroquímicos.
15. Uso de un cultivo de la cepa biológicamente pura de *Pseudomonas azotoformans* F30A, que se ha depositado en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH y a la que se le ha asignado el número de acceso DSM 22077, para producir un sobrenadante de cultivo.



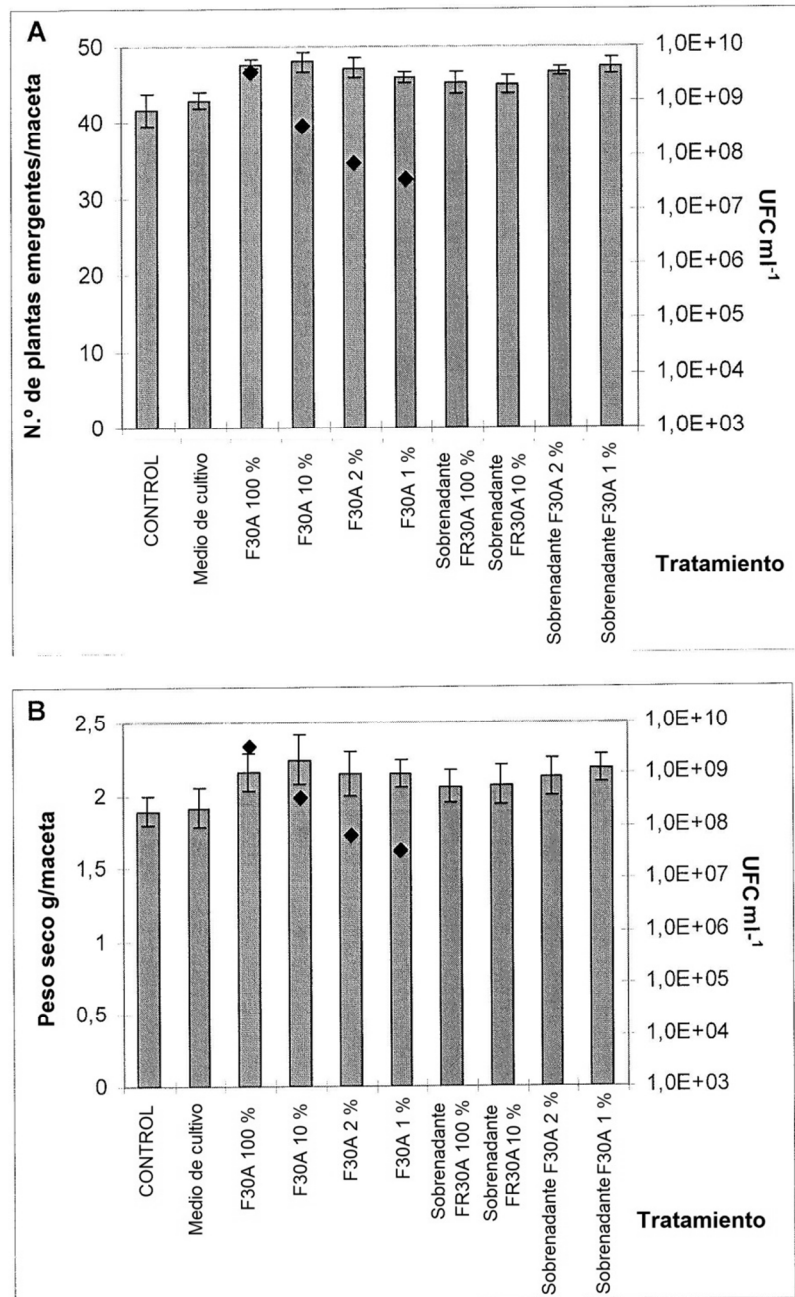


Fig. 2

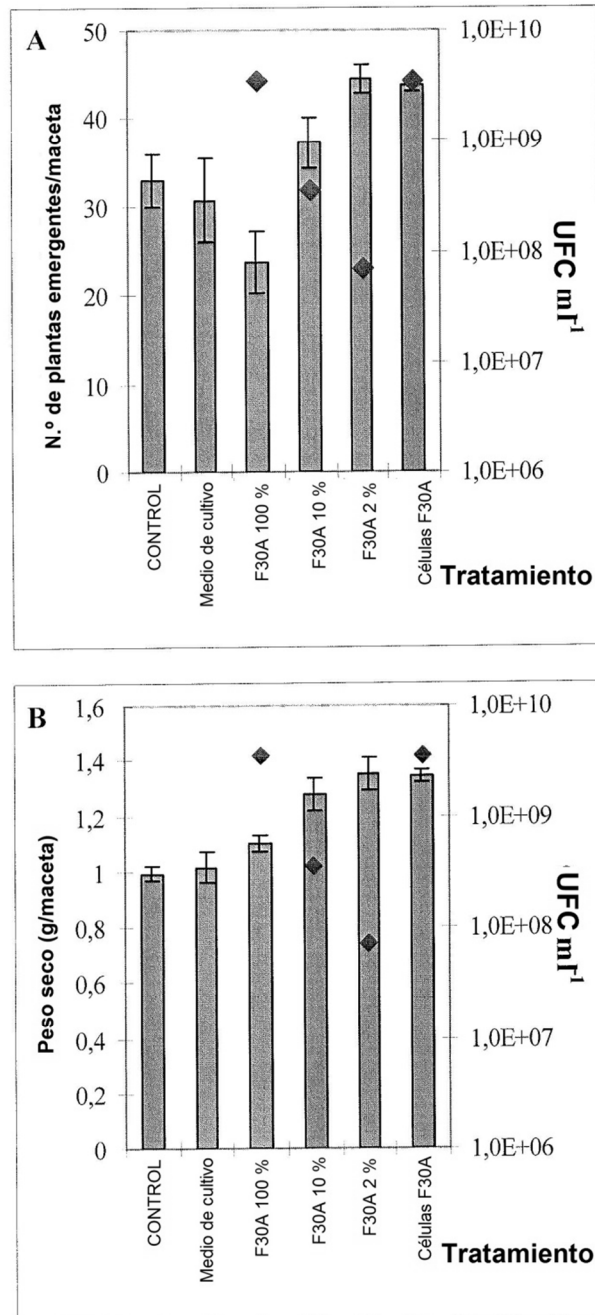


Fig. 3

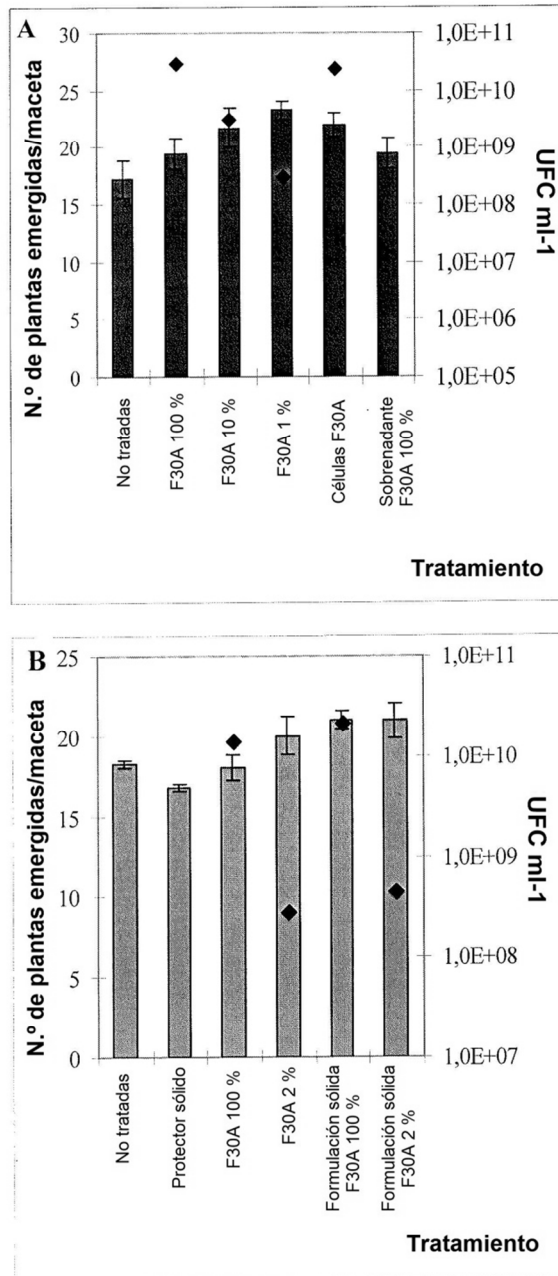


Fig. 4

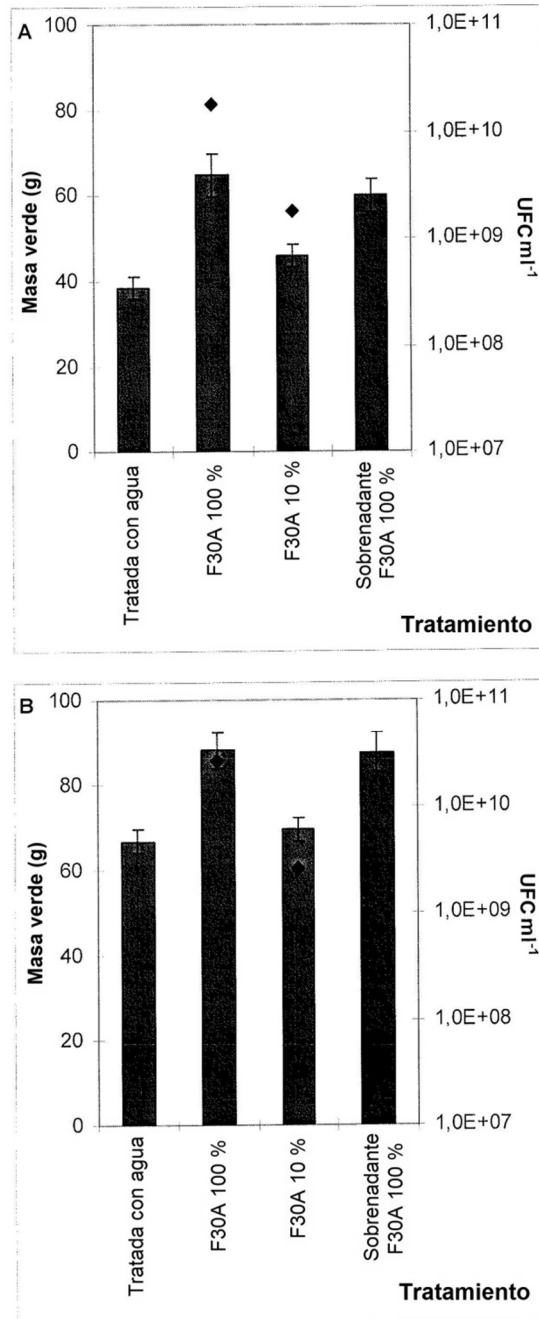


Fig. 5

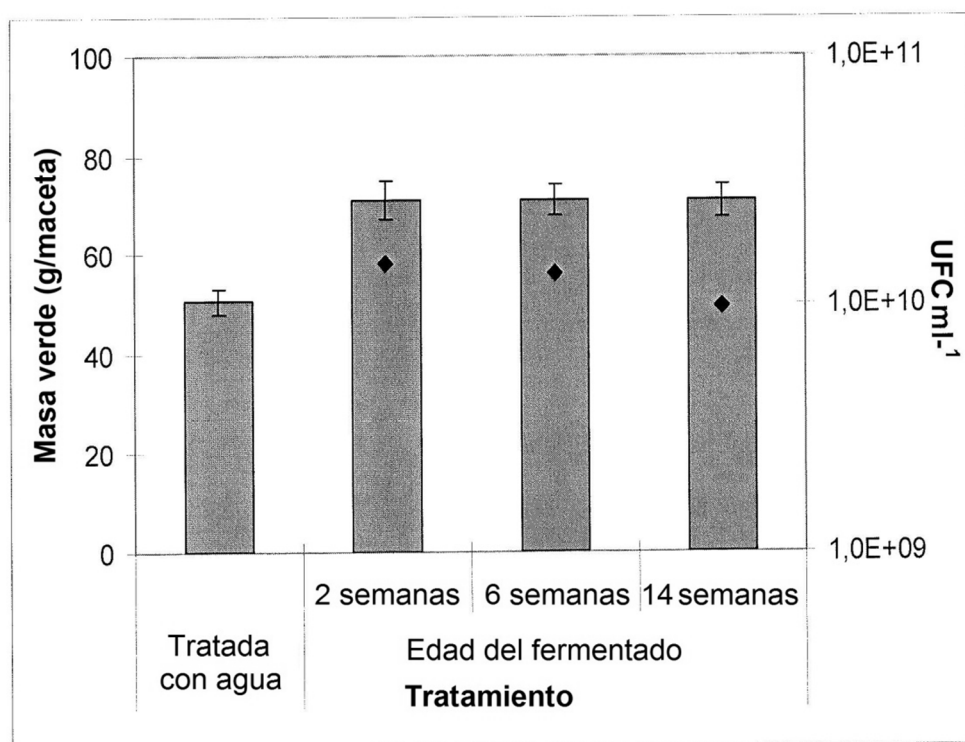


Fig. 6

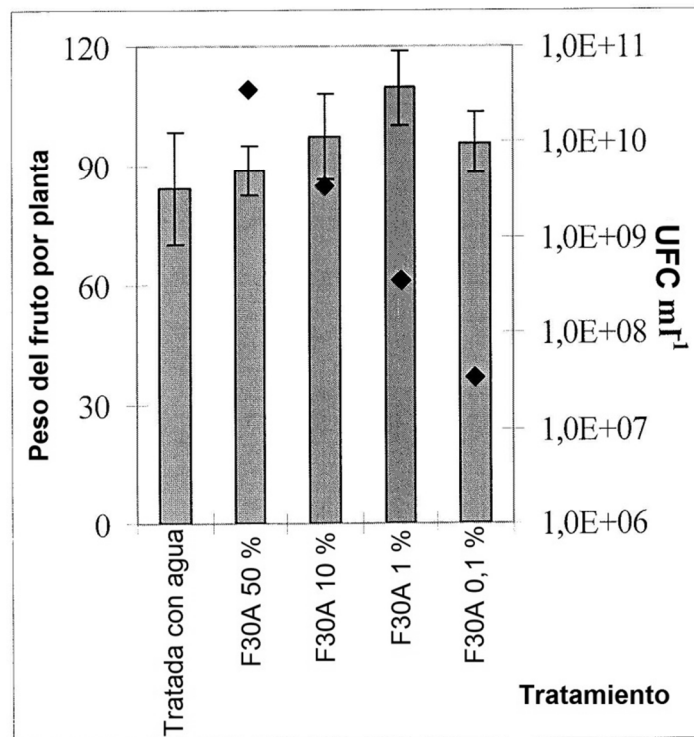


Fig. 7

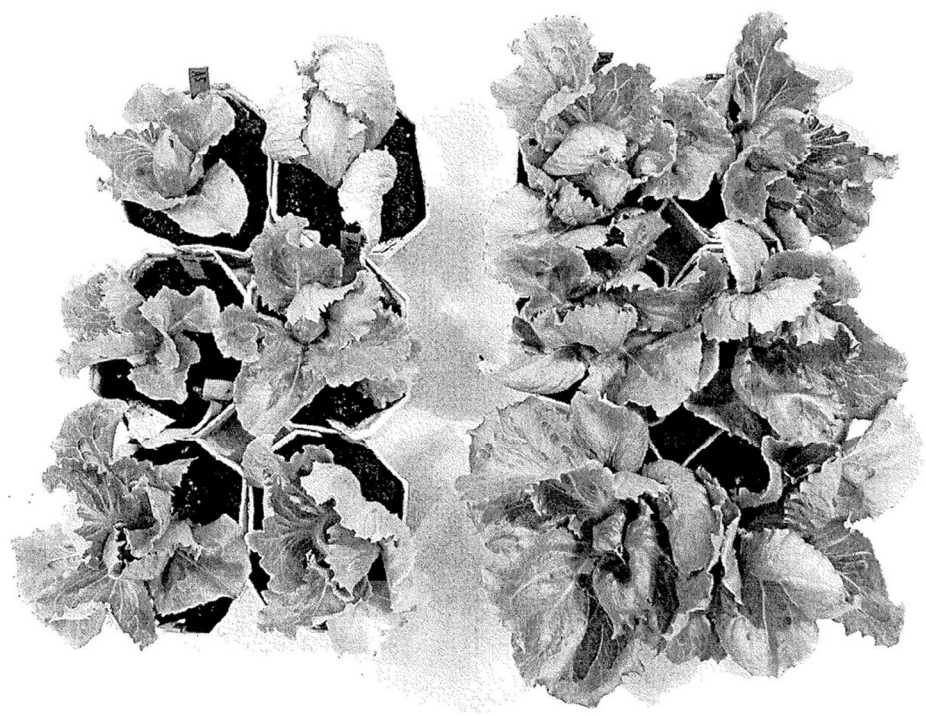


Fig. 8

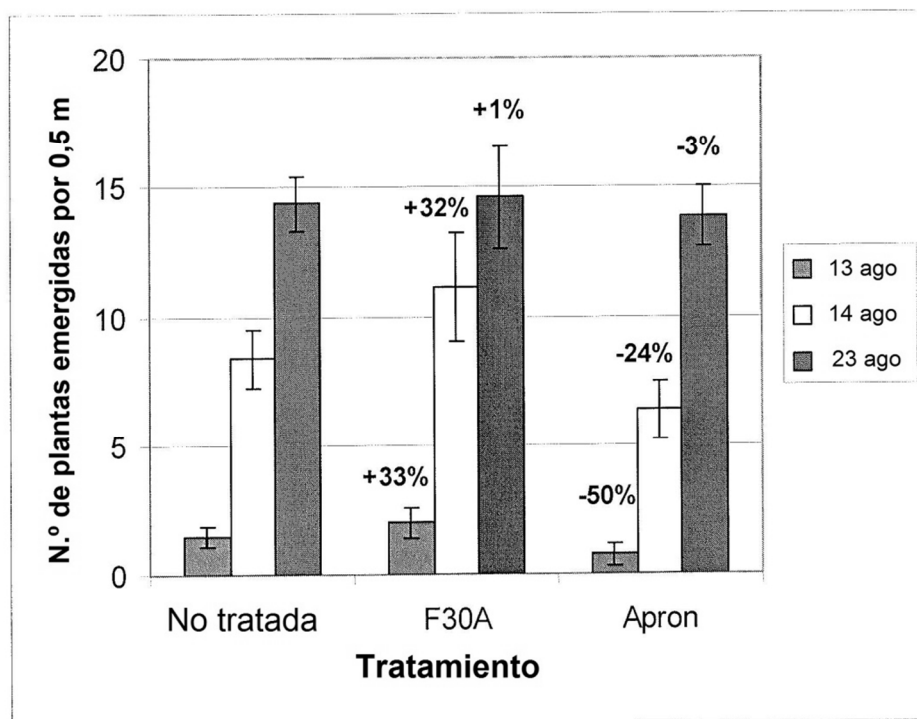


Fig. 9

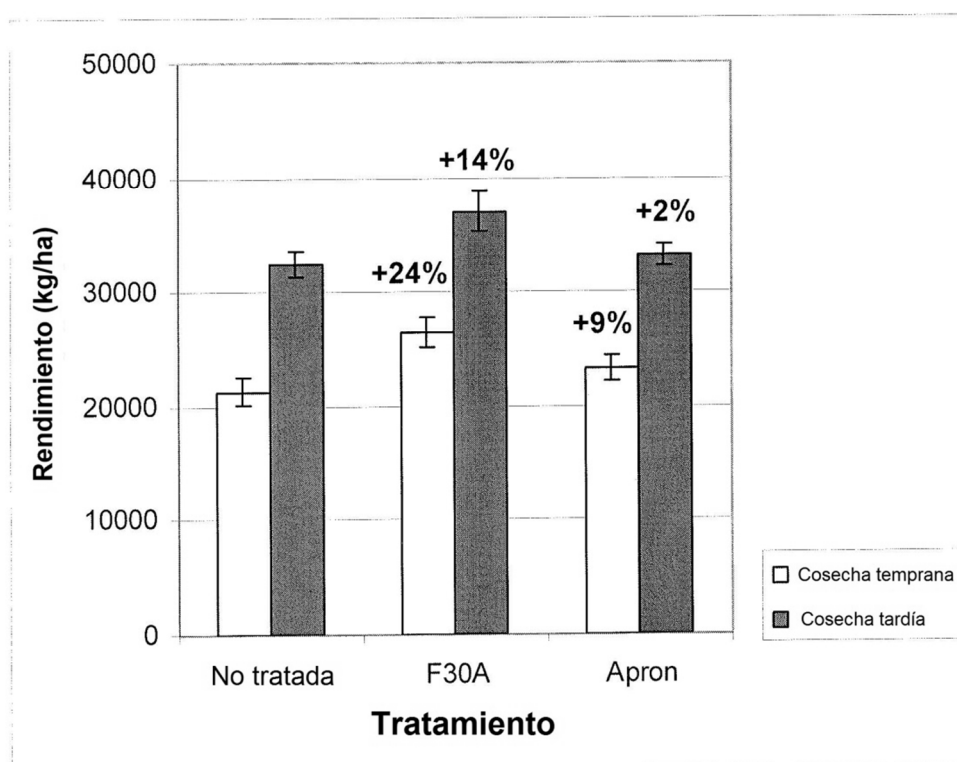


Fig. 10

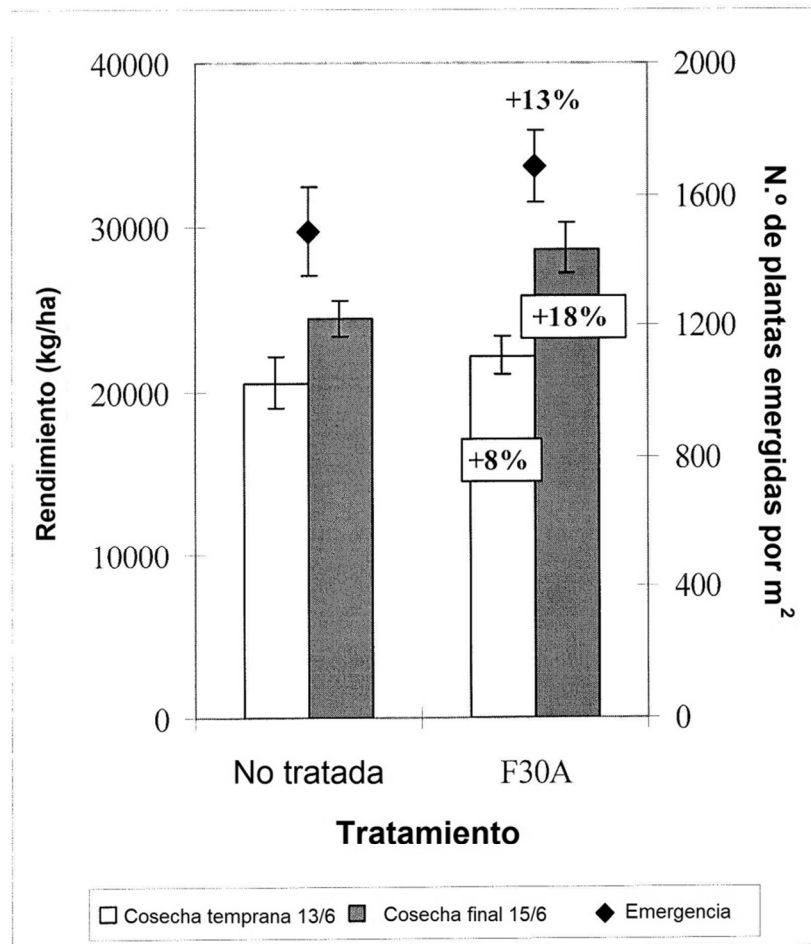


Fig. 11

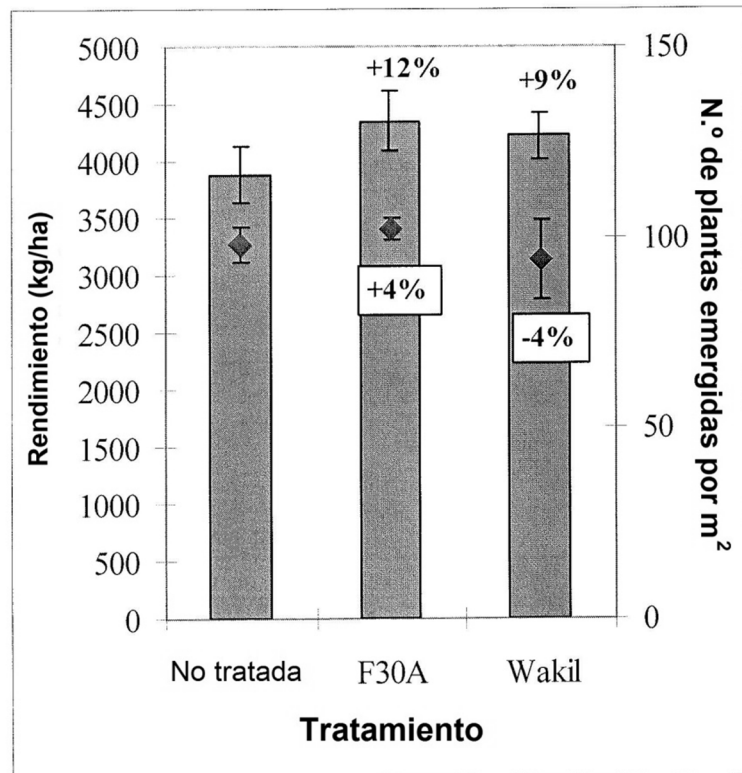


Fig. 12

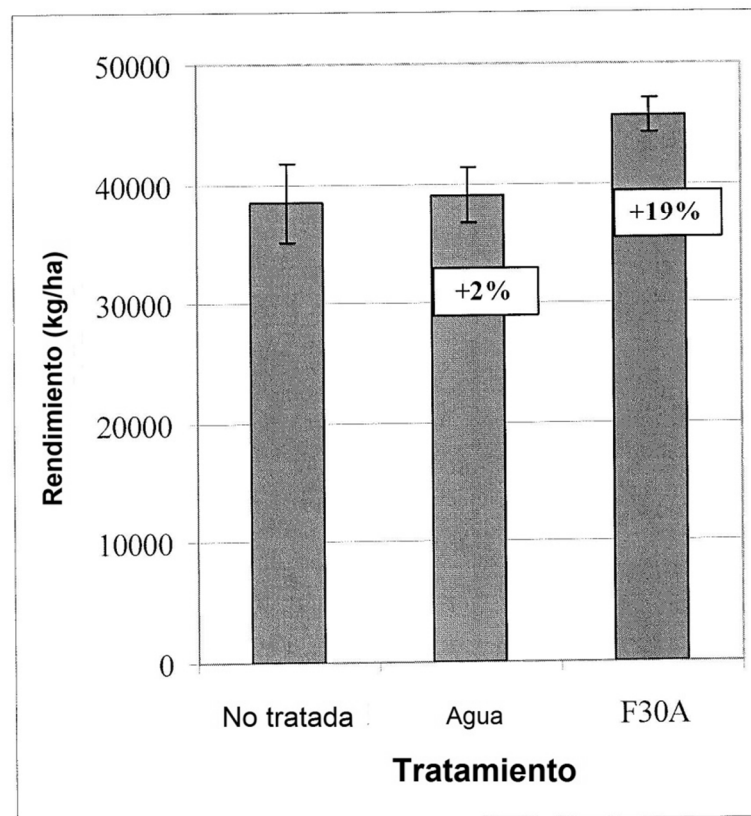


Fig. 13

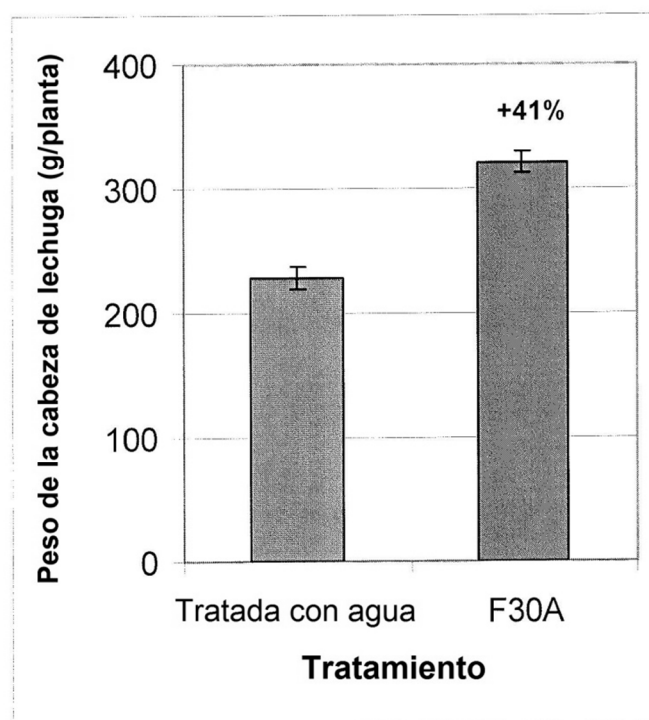


Fig. 14

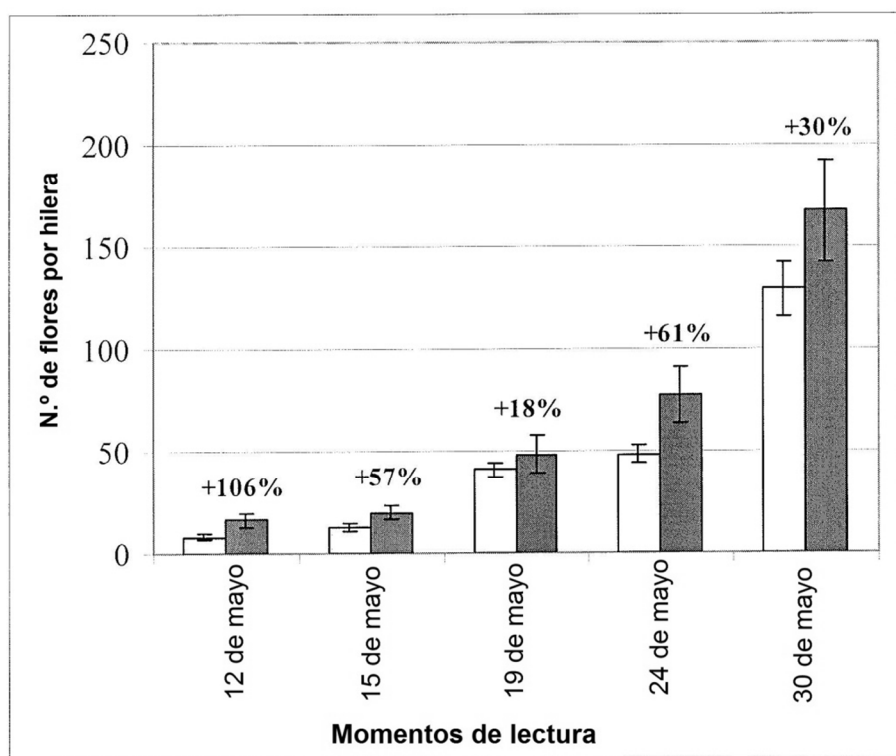


Fig. 15

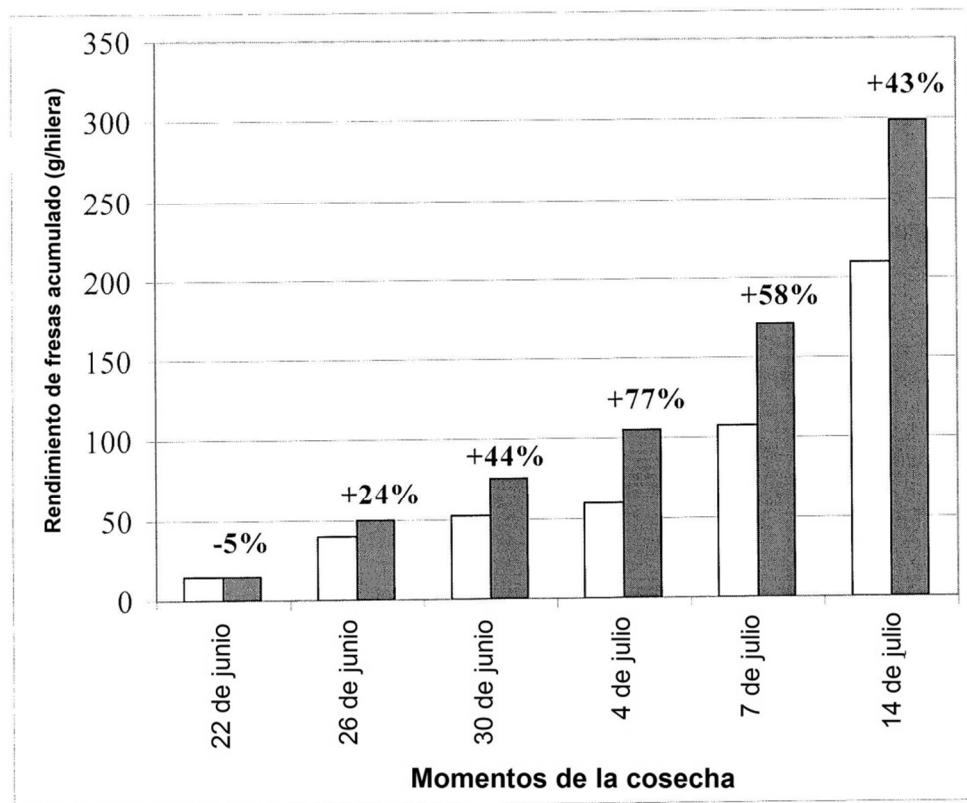


Fig. 16

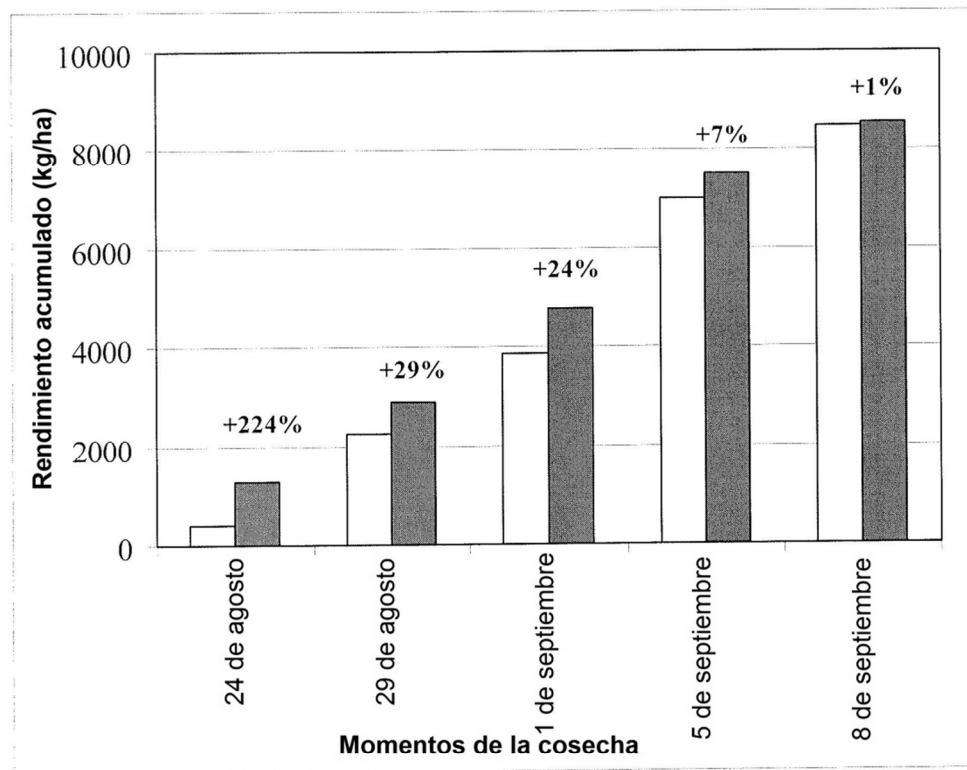


Fig. 17

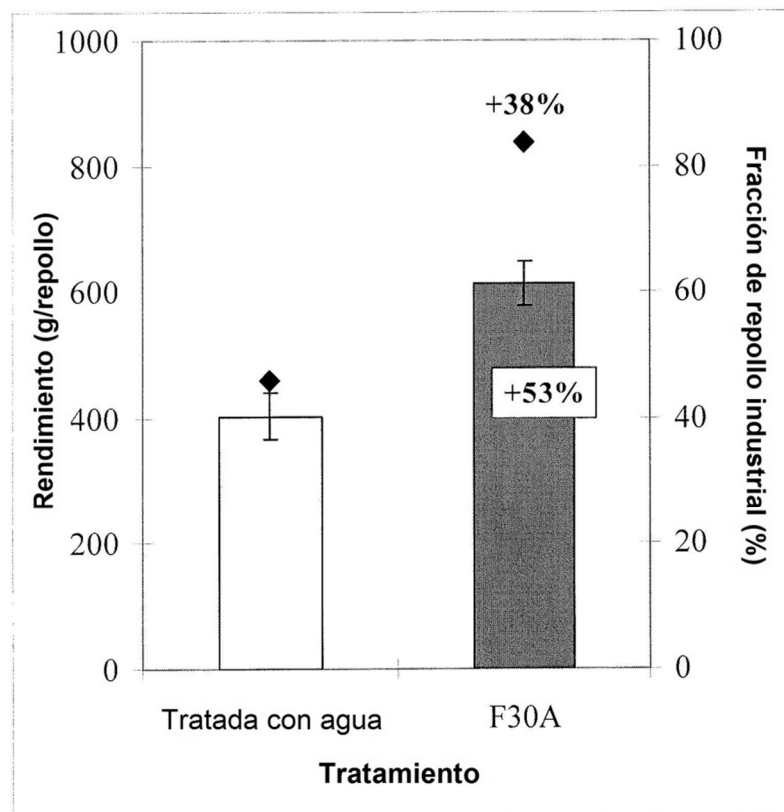


Fig. 18

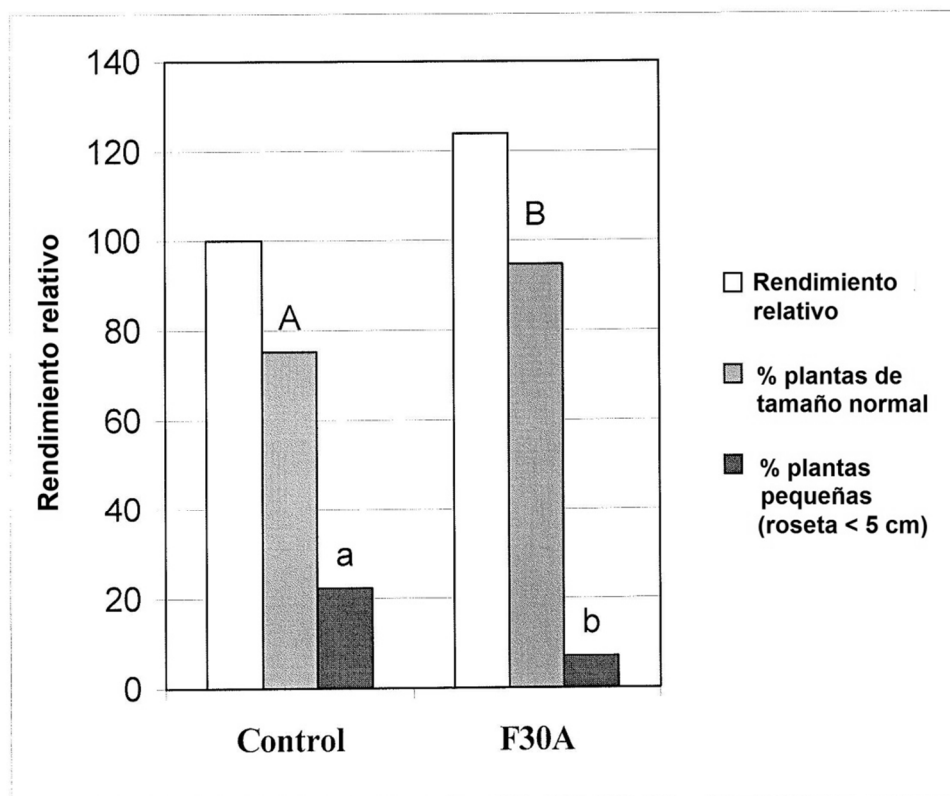


Fig. 19

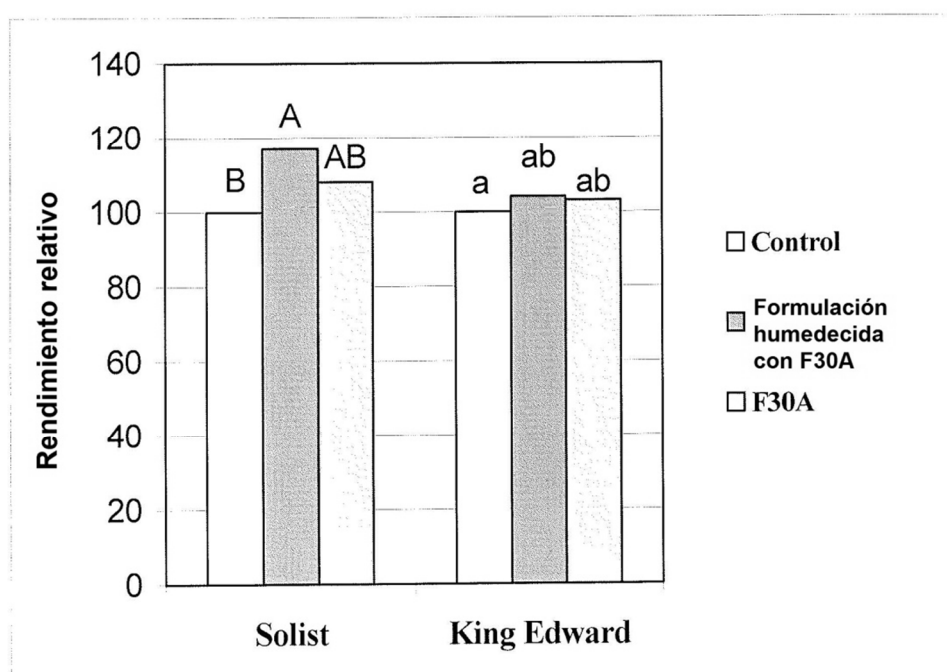


Fig. 20



Fig. 21

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Esta lista de referencias citadas por el solicitante es únicamente para la comodidad del lector. No forma parte del documento de la patente europea. A pesar del cuidado tenido en la recopilación de las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la EPO niega toda responsabilidad en este sentido.

Documentos de patentes citados en la descripción

- WO 1987000194 A [0003] [0109] [0110]
- 10 • US 19965503652 A [0003] [0109] [0110]
- WO 0051435 A [0003] [0109] [0110]
- US 19965503651 A [0003] [0109] [0110]
- US 20026447770 A [0003] [0109] [0110]
- US 20026495362 A [0003] [0109] [0110]
- 15 • US 6048713 A [0003]
- US 20030054959 A [0003]
- WO 03016241 A [0003]
- US 4849008 A [0003]
- US 1986001375 W [0109] [0110]
- 20 • US 2000005147 W [0109] [0110]

Literatura diferente de patentes citada en la descripción

- BENIZRI, E. ; BAUDOUIN, E. ; GUCKERT, A. Root Colonization by Inoculated Plant Growth-Promoting Rhizobacteria. *Biocontrol Science and Technology*, 2001, vol. 11, 557-574 [0109] [0110]
- 25 • BRISBANE, P.G. ; HARRIS, J.R. ; MOEN, R. Inhibition of fungi from wheat roots. *Pseudomonas fluorescens*, 1989, 2-79 [0109] [0110]
- Soil Biol. Biochem., vol. 21, 1019-1026 [0109] [0110]
- COMPANT, S. ; DUFFY, B. ; NOWAK, J. ; CLEMENT, C. ; D AIT BARKA, E. Use of Plant Growth-Promoting Bacteria for Biocontrol of Plant Diseases: Principles, Mechanisms of Action, and Future Prospects. *Appl. and Environ. Microbiol.*, September 2005, vol. 71 (9), 4951-4959 [0109] [0110]
- 30 • DABBOUSSI, F. ; HAMZE, M. ; ELOMARI, M. ; VERHILLE, S. ; BAIDA, N. ; IZARD, D. ; LECLERC, H. *Pseudomonas libanensis* sp. nov., a new species isolated from Lebanese spring waters. *Int J Syst Bacteriol.*, 1999, vol. 49, 1091-1101 [0109] [0110]
- 35 • DAVIES, K.G. ; WHITBREAD, R. Factors affecting the colonisation of a root system by fluorescent *Pseudomonads*: The effects of water, temperature and soil microflora. *Plant and Soil*, 1989, vol. 116, 247-256 [0109] [0110]
- DESHWAL, V. K. ; KUMAR, T. ; DUBEY, R. C. ; MAHESHWARI, D. K. Long-term effect of *Pseudomonas aeruginosa* GRC1 on yield of subsequent crops of paddy after mustard seed bacterization. *Current Science*, 2006, vol. 91, 423-424 [0109] [0110]
- 40 • DEFREITAS, R.J. ; GERMIDA, J.J. *Pseudomonas cepacia* and *Pseudomonas putida* as winter wheat inoculants for biocontrol of *Rhizoctonia solani*. *Canadian journal of microbiology*, 1991, vol. 37, 780-784 [0109] [0110]
- DOWLING, D.N. ; F. O' GARA. Metabolites of *Pseudomonas* involved in the biocontrol of plant disease. *Trends Biotechnol.*, 1994, vol. 12, 133-141 [0109] [0110]
- GARCIA DE SALAMONE, I. E. ; HYNES, R. K. ; NELSON, L. M. Cytokinin production by plant growth promoting rhizobacteria and selected mutants. *Can. J. Microbiol.*, 2001, vol. 47, 404-411 [0109] [0110]
- 45 • GERHARDSON, B. ; ALSTROM, S. ; RÅMERT, B. Plant reactions to inoculation of roots with fungi and bacteria. *Phytopathol. Z.*, 1985, vol. 114, 108-117 [0109] [0110]
- Bacteria as antagonists in biological control of plant pathogens. HEMMING BC. New directions in biological control: Alternatives for suppressing agricultural pests and diseases. Alan R. Liss, 1990, 223-242 [0109] [0110]
- 50 • HÖKEBERG, M. ; GERHARDSON, B. ; JOHNSSON, L. Biological control of cereal seed-borne diseases by seed bacterization with greenhouse selected bacteria. *Europea Journal of Plant Pathology*, 1997, vol. 103, 25-33 [0109] [0110]
- HOWIE WJ. ; ECHANDI E. Rhizobacteria: Influence of cultivar and soil type on plant growth and yield of potato. *Science*, 1983, vol. 4, 86 [0109] [0110]
- 55 • KLOEPPER, J. W. ; LEONG, J. ; TEINTZE, M. ; SCHROTH, M. N. Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth promoting rhizobacteria. *Nature*, 1980, vol. 286, 885-886 [0109] [0110]
- KLOEPPER J W ; SCRHOOT M N ; MILLER T D. Effects of rhizosphere colonization by plant growth-promoting rhizobacteria on potato plant development and yield *Phytopathology*, 1980, vol. 70, 1078-1082 [0109]
- KLOEPPER, JW ; SCHROTH, MN. Plant growth promoting rhizobacteria on radishes. *Proc. 4th Int. Conference on Plant Pathogenic bacteria. Angra*, 1978, 879-882 [0109]
- 60 • KROPP BR ; THOMAS E ; POUNDER JI ; ANDERSON AJ. Increased emergence of spring wheat after inoculation with *Pseudomonas chlororaphis* isolate 2E3 under field and laboratory conditions. *Biology and fertility of soils*, 1996, vol. 23, 200-206 [0109] [0110]

- **LEVENFORS, J. P. ; EBERHARD T. H. ; LEVENFORS, J. J. ; GERHARDSON B. ; HÖKEBERG M.** Biological control of snow mould (*Microdochium nivale*) in winter cereals by *Pseudomonas brassicacearum*, MA250. *BioControl*, 2008, vol. 53, 651-665 [0109] [0110]
- **MICSINAI, A. ; BORSODI, A. K. ; CSENGERI, V. ; HORVATH, A. ; ORAVECZ, O. ; NIKOLAUSZ, M. ; RESKONE, M. N. ; MARIALIGETI, K.** Rhizome-associated bacterial communities of healthy and declining reed stands in Lake Velencei, Hungary. *Hydrobiologia*, 2003, vol. 506, 707-713 [0109] [0110]
- 5 • **MAENG, J. ; KHUDAIRI, A.K.** Studies on the flowering mechanism in *Lemna*. I. Amino acids changes during flower induction. *Physiol. Plant*, 1973, vol. 28, 264-270 [0109] [0110]
- **LOPER, J.E. ; BUYER, J.S.** Siderophores in microbial interactions on plant surfaces. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 1991, vol. 4, 5-13 [0109] [0110]
- 10 • **LUCY, M. ; REED, E. ; GLICK, B. R.** Applications of free living plant growth-promoting rhizobacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2004, vol. 86, 1-25 [0109] [0110]
- **LUGTENBERG, B ; KAMILOVA, F.** Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. *Annual Review of Microbiology*, 2009, vol. 63, 541-556 [0109] [0110]
- 15 • **PATTEN, C. ; GLICK, B. R.** Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. *Can. J. Microbiol.*, 1996, vol. 42, 207-220 [0109] [0110]
- **PIAO, Z.; CUI, Z. ; YIN, B. ; HU, J. ; ZHOU, C. ; XIE, G. ; SU, B. ; YIN, S.** Changes in acetylene reduction activities and effects of inoculated rhizosphere nitrogen- fixing bacteria on rice. *Biology and Fertility of Soils*, 2005, vol. 41, 371-378 [0109] [0110]
- 20 • **STANIER, R. Y. ; PALLERONI, N. J. ; DOUDOROFF, M.** The aerobic pseudomonads: a taxonomic study. *Journal of General Microbiology*, 1966, vol. 43, 159-271 [0109] [0110]
- **SUSLOW, T.V.; SCHROTH, M.N.** Rhizobacteria of sugar beets: Effects of seed application and root colonization on yield. *Phytopathology*, 1982, vol. 72, 199-206 [0109] [0110]
- **O'SULLIVAN, D.J. ; O'GARA F.** Traits of fluorescent *Pseudomonas* spp. involved in suppression of plant root pathogens. *Microbiol Mol Biol Rev.*, 1992, vol. 56, 662-676 [0109] [0110]
- 25 • **URASHIMA, Y. ; SUGA, Y. ; HORI, K.** Growth Promotion of Spinach by Fluorescent *Pseudomonas* Strains under Application of Organic Materials. *Soil Science & Plant Nutrition*, 2006, vol. 51, 841-847 [0109] [0110]
- **VIVEKANANTHAN, R. ; RAVIA, M. ; SARAVANAKUMARA, D. ; KUMARB, N. ; PRAKASAMA V. ; SAMIYAPPANA, R.** Microbially induced defense related proteins against postharvest anthracnose infection in mango. *Crop Protection*, 2004, vol. 23 (11), 1061-1067 [0109] [0110]
- 30 • **WELLER, D.M.** Biological Control of Soilborne Plant Pathogens in the Rhizosphere with Bacteria. *Annual Review of Phytopathology*, 1988, vol. 26, 379-407 [0109] [0110]
- **KLOEPPER J W ; SCRHOOT M N ; MILLER T D.** Effects of rhizosphere colonization by plant growth-promoting rhizobacteria on potato plant development and yield. *Phytopathology*, 1980, vol. 70, 1078-1082 [0110]
- 35 • **KLOEPPER, JW ; SCHROTH, MN.** Plant growth promoting rhizobacteria on radishes. *Proc. 4th Int. Conference on Plant Pathogenic bacteria*, 1978, 879-882 [0110]