

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 722 275**

51 Int. Cl.:

A01P 21/00	(2006.01)
A01N 63/04	(2006.01)
A01H 3/00	(2006.01)
A01H 17/00	(2006.01)
A01N 63/00	(2006.01)
C05F 11/08	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.06.2013 PCT/EP2013/062976**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.12.2013 WO13190082**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.06.2013 E 13730258 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.02.2019 EP 2866541**

54 Título: **Procedimiento de producción de semillas de planta que contienen bacterias endófitas**

30 Prioridad:

22.06.2012 EP 12173124

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

08.08.2019

73 Titular/es:

**AIT AUSTRIAN INSTITUTE OF TECHNOLOGY
GMBH (100.0%)
Giefinggasse 4
1210 Wien, AT**

72 Inventor/es:

**MITTER, BIRGIT;
SESSITSCH, ANGELA y
NAVEED, MUHAMMAD**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 722 275 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

Procedimiento de producción de semillas de planta que contienen bacterias endófitas

La presente invención se refiere a la producción de semillas de plantas que comprenden endófitos.

5 A pesar de la limitada tierra cultivable unida a la creciente demanda de una población humana en constante aumento que podría alcanzar los 9 mil millones para 2050, el suministro de alimentos es un desafío mundial que hace que la producción de alimentos económicamente atractivos y de alta calidad, libre de niveles inaceptables de productos químicos, sea una necesidad imperiosa. El uso de microorganismos con el objetivo de mejorar el crecimiento y la salud de las plantas es una práctica importante y necesaria para la agricultura.

10 Durante las últimas dos décadas, las rizobacterias promotoras de crecimiento de plantas (PGPR) han recibido importancia y aceptación mundial en la práctica agrícola. Estos microorganismos son las herramientas potenciales para la agricultura sustentable porque no solo aseguran la disponibilidad de nutrientes esenciales para las plantas, sino que también mejoran la eficiencia del uso de nutrientes.

15 En el futuro, las bacterias endófitas pueden ser incluso más importantes que las bacterias de la rizosfera para promover el crecimiento de las plantas porque escapan de la competencia con los microorganismos de la rizosfera y establecen un contacto más íntimo con los tejidos de las plantas. Además, la naturaleza inherente de ciertos endófitos para colonizar potencialmente las plantas de una manera sistemática proporciona un enfoque novedoso como un sistema de administración a las plantas de varios rasgos beneficiosos.

20 Los mecanismos bacterianos de la promoción del crecimiento de las plantas incluyen la fijación de nitrógeno biológico (BNF), síntesis de fitohormonas y vitaminas, alivio del estrés ambiental, sinergismo con otras interacciones entre bacterias y plantas, inhibición de la síntesis de etileno de las plantas, así como el aumento de la disponibilidad de nutrientes como el fósforo, hierro y otros microelementos, y la mejora del crecimiento por compuestos volátiles.

25 Se han utilizado numerosas estrategias de aplicación para PGPR/bacterias endófitas en los niveles experimentales, que varían desde el tratamiento de semillas y la aplicación al suelo hasta la inyección en tallos y la pulverización foliar. El tratamiento de la semilla (remojar e incrustar en el material de soporte) con inóculos bacterianos antes de la siembra es el medio de inoculación tradicional, más comúnmente utilizado y más sencillo. Los inoculantes de turba (mezcla basada en portadores) han sido el estándar para la industria de la inoculación; sin embargo, se han comercializado varias otras preparaciones comerciales. Crop Genetics International Ltd. desarrolló una técnica de inoculación de semillas mediante la aplicación de un diferencial de presión para infundir la suspensión bacteriana en las semillas embebidas y volver a secar las semillas (US 5.415.672 A).

30 Para obtener beneficios de los inóculos bacterianos, es crucial aplicar inóculos bacterianos (técnica y tiempo) de una manera viable. Además, es igualmente importante que los microorganismos permanezcan viables durante varios meses de almacenamiento de semillas y que se activen fácilmente y colonicen el ambiente de la planta. Sin embargo, al utilizar procedimientos convencionales (basados en portador, caldo líquido y aplicación en el suelo; ver también: US 7.084.331 B2, US 7.906.313 B2, US 7.037.879 B2), la viabilidad de las bacterias está sujeta a los peligros del secado, contacto con los fertilizantes, toxicidad de la cubierta de la semilla, plaguicida y aditivos minerales incompatibles. Además de esto, varios estreses ambientales y del suelo afectan la eficiencia de supervivencia/colonización de las cepas inoculantes. La densidad de la población bacteriana, las especies de plantas huésped, las prácticas agronómicas y las condiciones climáticas se encuentran entre los factores importantes para el éxito de la fertilización biológica de las plantas. Se describen ejemplos para el uso de endófitos como potenciadores del crecimiento de plantas, bioplaguicidas, tratamiento de patógenos o agentes de tolerancia a plagas, por ejemplo, en los documentos WO 00/29607 A1, WO 2011/117351 A1, WO 2010/115156 A2, WO 2007/107000 A1, WO 2007/021200 A1, US 2012/144533 A1, US 4.940.834 A, CA 2562175 A1 y WO 2011/082455 A1.

WO2011/112781 A2 describe un procedimiento de aplicación de una composición a una planta en una cantidad efectiva para aumentar el crecimiento, donde la composición incluye un cultivo aislado de *Enterobacter* sp. 638

45 Sin embargo, con los procedimientos de inoculación actuales, la colonización de las plantas con los microorganismos endófitos deseados es difícil y, a menudo, no reproducible, lo que dificulta la aplicación de esta tecnología a escala industrial. Por ejemplo, los microorganismos utilizados en el recubrimiento de semillas a menudo no sobreviven bien o son incapaces de colonizar la planta (debido a que los microorganismos del exterior no pueden entrar en la semilla o planta). Si la planta se lesiona mecánicamente (o de otra manera) para proporcionar una entrada, esto pone en riesgo la salud de las semillas, plántulas o plantas, porque los microorganismos dañinos también pueden entrar a la planta de manera desprotegida. Además, incluso si los microorganismos pueden colonizar una planta dada, puede haber una pérdida natural de viabilidad y la eficiencia de la colonización puede ser baja. Las técnicas de inoculación más complejas (por ejemplo, mediante la aplicación de infiltración al vacío o presión, inoculación por inyección, etc.) también están causando riesgos para la planta y, lo que es más importante, no son transferibles a gran escala o aplicabilidad industrial y, por lo tanto, no son efectivas.

55 Un objeto de la presente invención proporcionar un procedimiento mejorado para producir semillas que contienen microorganismos endófitos. El procedimiento debe proporcionar semillas con una composición reproducible y definida

de microorganismos endofíticos que permitan el crecimiento de las plantas con las propiedades deseadas debido a la presencia de tales microorganismos endofíticos. Otro objeto es proporcionar procedimientos para introducir microorganismos endofíticos en semillas de plantas para microorganismos que no están o no están necesariamente presentes en las semillas.

5 En consecuencia, la divulgación proporciona un procedimiento de producción de semillas de planta que contienen microorganismos endofíticos que se caracteriza por las siguientes etapas:

- poner en contacto con una planta con flores con una preparación de microorganismos endofíticos, mediante el cual los microorganismos endofíticos ingresan a la planta a través de las flores y se transportan a las semillas producidas por la planta; y - obtener las semillas de planta que contienen microorganismos endofíticos de la planta.

10 Sobre la base de la divulgación que se contiene en la presente, la presente invención proporciona un procedimiento de producción de semillas de planta que contienen bacterias endofíticas caracterizado por las siguientes etapas:

- poner en contacto con una planta con flores con una preparación de bacterias endofíticas, mediante el cual las bacterias endofíticas ingresan a la planta a través de las flores y se transportan a las semillas producidas por la planta; y

15 - obtener las semillas de planta que contienen bacterias endofíticas de la planta.

Los aspectos adicionales y las realizaciones de la presente invención se exponen en las reivindicaciones adjuntas.

El término "endofito" significa, en su sentido más amplio, la ubicación de un organismo, con "endo" significa "dentro" y "fito" significa "plantas". Por lo tanto, endofito, en su sentido más amplio, se refiere a los organismos que viven dentro de las plantas. Los hongos y las bacterias son los organismos más comunes asociados con el término endofito.

20 Una característica importante de los microorganismos endofíticos es que ocupan los tejidos internos de las plantas sin causar daños sustanciales a sus huéspedes. En muchos casos, los endofitos son responsables de conferir una o más ventajas a la planta. Para la presente invención, un "microorganismo endofítico" se define de esta manera habitual: como un microorganismo que vive dentro de una planta y es responsable de los efectos beneficiosos de la planta, por ejemplo, la tolerancia a la sequía, metales, enfermedades (por ejemplo, aumento de la resistencia a patógenos y parásitos). y herbivoría, y/o promoción del crecimiento y adquisición de nutrientes, producción de fitohormonas, antibióticos (protección contra microorganismos que son dañinos para semillas y plantas) o sideróforos, plaguicidas; promoción de la fijación biológica de nitrógeno, etc. (como algunos (de muchos) ejemplos: tolerancia al frío (*Burkholderia*), estrés por salinidad (*Achromobacter*, *Azospirillum*), tolerancia a la sequía (*Burkholderia*, *Pantoea*), metales, enfermedad (*Bacillus*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas*), promoción del crecimiento (*Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Pantoea* y *Pseudomonas*) y obtención de nutrientes (*Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Micrococcus*, *Flavobacterium*, *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Erwinia*, y *Agrobacterium*) (US 7,906,313 B2)).

Los organismos endofíticos asociados con las plantas son variados y complejos. Los microbios endofíticos ocupan un nicho relativamente privilegiado dentro de una planta y frecuentemente contribuyen a la salud o crecimiento de la planta. 35 La coevolución puede existir entre los endofitos y su huésped, por ejemplo, en la resistencia al estrés ambiental. Los endofitos se han dirigido como fuentes valiosas de nuevos compuestos bioactivos. Los endofitos habitan tejidos de las plantas, en particular el llamado espacio intercelular, espacio entre las células. Se han encontrado microorganismos endofíticos en prácticamente todas las plantas estudiadas, donde colonizan los tejidos internos de su planta huésped y pueden formar una gama de diferentes relaciones, que incluyen simbióticas, mutualistas, comensales y trofobióticas. La mayoría de los endofitos parecen originarse en la rizosfera o filósfera; sin embargo, algunos se pueden transmitir a través de la semilla. Los microorganismos endofíticos pueden promover el crecimiento y el rendimiento de la planta y pueden actuar como agentes de biocontrol. Los endofitos también pueden ser beneficiosos para su huésped mediante la producción de una gama de productos naturales que no solo son beneficiosos para la planta, sino que también se pueden aprovechar para su uso potencial en medicina, agricultura o industria. Además, se ha demostrado que tienen el potencial de eliminar los contaminantes del suelo mediante la mejora de la fitorremediación y pueden desempeñar un papel en la fertilidad del suelo a través de la solubilización de fosfato y la fijación de nitrógeno. Existe un interés creciente en desarrollar las aplicaciones biotecnológicas potenciales de los endofitos para mejorar la fitorremediación y la producción sustentable de cultivos no alimentarios para la producción de biomasa y biocombustible.

El procedimiento de acuerdo con la presente invención usa una forma completamente nueva y diligente para introducir endofitos en plantas que resultó ser muy efectivo en el curso de la presente invención, sin dañar las plantas o semillas durante o después de la inoculación. La aplicación de los microorganismos a las plantas con flores utiliza una entrada natural en la planta que introduce el endofito de manera eficiente en las semillas de plantas de la próxima generación. En el transcurso de la presente invención, también se produjo que cuando los microorganismos se aplican a la planta en el momento de la floración (por ejemplo, mediante pulverización simple), los microorganismos entran cuando se inicia la formación de grano y establecen poblaciones dentro de la semilla. El método de la presente invención puede facilitar la productividad del cultivo mediante la mejora de la germinación, vigor de las plántulas y la biomasa en comparación con el control no tratado. Además, la introducción de los microorganismos beneficiosos dentro de la semilla en lugar de la aplicación externa, por ejemplo, el recubrimiento de semillas hace que los inóculos sean menos susceptibles a las

perturbaciones ambientales y más compatibles con los recubrimientos químicos de semillas (plaguicidas y herbicidas). Mediante el uso de semillas colonizadas bacterianas, el crecimiento y la biomasa de la planta son estadísticamente similares al procedimiento de inoculación convencional, por ejemplo, remojo de semillas exógenas e inoculación de suelos (que son más laboriosos y menos prácticos en ciertas circunstancias).

5 En consecuencia, la presente invención proporciona un nuevo concepto de aplicación de cepas endófitas para mejorar el crecimiento y vitalidad de las plantas: la integración de la cepa bacteriana o fúngica dentro de las semillas de planta. Los microorganismos por ejemplo se pulverizan en la planta con flores progenitora, ingresan en las plantas y colonizan las semillas emergentes. Los microorganismos también se pueden aplicar mediante instrumentos específicos a la flor, por ejemplo, mediante una espátula, una jeringa o un asa de inoculación. Otra realización preferente para administrar los endófitos a la flor de una planta se lleva a cabo mediante el empleo de insectos que se alimentan de polen, preferiblemente abejorros, que transportan los microorganismos endofíticos. Tales insectos (además de los abejorros también se pueden usar abejas melíferas, mariposas, algunas especies de avispas y moscas u otros "polinizadores") incluso pueden provenir de fuentes comerciales y ponerse en contacto con los endófitos antes de que se liberen para ponerse en contacto con la planta con flores. Los microorganismos se proporcionan preferiblemente en una parte del cuerpo de estos insectos que tiene la mayor probabilidad de ponerse en contacto con la flor de la planta (por ejemplo, las patas o la parte ventral del cuerpo).

Mediante la plantación de las semillas colonizadas internamente, los endófitos se activan y proliferan y colonizan las plantas de generación de descendientes. Las semillas colonizadas internamente pueden resultar (de acuerdo con la naturaleza del endófito) en una producción de biomasa mejorada y en la vitalidad de la planta en la generación de la planta posterior. Los efectos positivos son al menos comparables (si no se mejoran) a los observados después de la aplicación externa de endófitos, pero hacen que los inóculos sean menos susceptibles a la perturbación ambiental y más compatibles con los recubrimientos químicos de semillas (plaguicidas y herbicidas). Con la presente invención también es posible introducir endófitos en semillas que no están o no están necesariamente presentes en semillas. Prácticamente se puede introducir cualquier tipo de endófitos en las semillas mediante el procedimiento de acuerdo con la presente, siempre que estos endófitos tengan al menos un poder básico para establecerse en las semillas.

Ninguno de los procedimientos de la técnica previa, especialmente no los procedimientos descritos en los documentos WO 00/29607 A1, WO 2011/117351 A1, WO 2010/115156 A2, WO 2007/107000 A1, WO 2007/021200 A1, US 2012/144533 A1, US 4.940.834 A, CA 2562175 A1 y WO 2011/082455 A1, dirigidos a proporcionar procedimientos para el suministro de semillas que comprenden endófitos seleccionados. El objetivo principal de estos procedimientos de acuerdo con la técnica previa es siempre la provisión de los endófitos a la misma planta tratada y no, como en la presente invención, suministrar a una planta madre los endófitos de interés y obtener endófitos que contengan semillas de esta planta madre para plantas hijas en crecimiento que ya contienen los endófitos y, opcionalmente, los endófitos también pasan a su propia generación de hijas. En consecuencia, la tecnología provista con la presente invención puede proporcionar semillas con características completamente novedosas, por ejemplo, tener una configuración única de endófitos (por ejemplo, al tener una especie endófito única presente predominantemente en las semillas (por ejemplo, que representan más del 50%, o más del 70% o incluso más del 80% del total de endófitos en la semilla).

Las plantas adecuadas incluyen tanto monocotiledóneas como dicotiledóneas (que incluyen las eudicotiledóneas) que pueden ser colonizadas por los microorganismos endofíticos de acuerdo con la presente invención. Obviamente, la planta debe ser una planta con flores (angiosperma) para transferir los microorganismos a la planta en el curso de la fase de floración. Las semillas resultantes contienen los endófitos inoculados en una concentración eficiente. Las plantas cultivadas a partir de tales semillas contienen los endófitos y las propiedades beneficiosas del endófito se pueden desarrollar en las semillas o plantas. En consecuencia, las plantas que surgen de tales semillas, en las que el endófito puede expresar su función beneficiosa para la planta, pueden estar en cualquier etapa de crecimiento, que incluye semillas, plántulas o plantas completas. Por lo tanto, la presente invención no consiste simplemente en pulverizar los microorganismos a una planta (o semilla) determinada para proporcionar el efecto endofítico beneficioso a esta planta, sino que proporciona un procedimiento que protege la presencia de endófitos en las semillas generadas por esta planta y, por lo tanto, para las próximas generaciones de la planta. Esto difiere esencialmente de todas las estrategias de inoculación aplicadas anteriormente (impregnación de semillas, pulverización de los microorganismos a las semillas, gérmenes o plantas completas), porque el presente procedimiento trata sobre la producción de semillas que contienen una configuración de endófitos reproducible.

En una realización preferente, la planta diana es una planta de la familia Graminae (pastos). Las plantas de pasto en las que se introducen estos endófitos pueden ser cualquiera de los pastos útiles pertenecientes a los géneros *Agropyron*, *Agrostis*, *Andropogon*, *Anthoxanthum*, *Arrhenatherum*, *Avena*, *Brachypodium*, *Bromus*, *Chloris*, *Cynodon*, *Dactylis*, *Elymus*, *Eragrostis*, *Festuca*, *Glyceria*, *Hierochloa*, *Hordeum*, *Lolium*, *Oryza*, *Panicum*, *Paspalum*, *Phalaris*, *Phleum*, *Poa*, *Setaria*, *Sorghum*, *Triticum*, *Zea* y *Zoysia*.

En una realización preferente, la planta diana se selecciona de los trigos, que incluyen *Triticum monococcum*, *Triticum turgidum*, *Triticum timopheevi* (trigo de Timofev) y *Triticum aestivum* (trigo harinero).

En otra realización preferente, la planta diana es un maíz del género *Zea*. *Zea* es un género de la familia Gramineae (Poaceae), comúnmente conocida como la familia del pasto. El género consiste en cuatro especies: *Zea mays*, maíz cultivado y teosinte; *Zea diploperennis* Ilitis et al., Diploteosinte perenne; *Zea luxurians* (Durieu et Asch.) Bird y *Zea*

perennis (Hitc.) Reeves et Mangelsd., teosinte perenne.

Otros pastos útiles que se pueden usar en forma industrial son los pastos de centeno y pastos azules. Los pastos azules, conocidos en la técnica, incluyen pasto azul de Kentucky, pasto azul de Canadá, pasto de pradera rugoso, pasto de pradera bulboso, pasto de pradera alpino, pasto de pradera ondulado, pasto de pradera de madera, pasto de pradera de Balforth, pasto de pradera de pantano, pasto de pradera de hoja ancha, pasto de pradera de hoja estrecha, pasto de pradera liso, pasto de pradera extendido y pasto de pradera aplanado.

En una realización preferente, las plantas para las cuales se producen las semillas mediante el procedimiento de acuerdo con la presente invención son dicotiledóneas, que incluyen eudicotiledóneas tales como tomate, sandía, calabaza, pepino, fresa, pimienta, soja, maní, Brassicaceae, especialmente colza, girasol, remolacha azucarera, algodón, alfalfa y arábido.

Por consiguiente, la planta preferiblemente se selecciona del grupo que Graminae (pastos), preferiblemente pastos de los géneros *Agropyron*, *Agrostis*, *Andropogon*, *Anthoxanthum*, *Arrhenatherum*, *Avena*, *Brachypodium*, *Bromus*, *Chloris*, *Cynodon*, *Dactylis*, *Elymus*, *Eragrostis*, *Festuca*, *Glyceria*, *Hierochloe*, *Hordeum*, *Lolium*, *Oryza*, *Panicum*, *Paspalum*, *Phalaris*, *Phleum*, *Poa*, *Setaria*, *Sorghum*, *Triticum*, *Zea*, especialmente *Zea mays*, maíz cultivado y teosinte, *Zea diploperennis* Iltis et at., diploteosinte perenne, *Zea luxurians* (Durieu et Asch.) Bird; y *Zea perennis* (Hitc.) Reeves et Mangelsd., teosinte perenne y *Zoysia*; trigos, preferiblemente *Triticum monococcum*, *Triticum turgidum*, *Triticum timopheevi* (trigo de Timofevi) y *Triticum aestivum* (trigo harinero); preferiblemente pastos de centeno y pastos azules, especialmente pasto azul de Kentucky, pasto azul de Canadá, pasto de pradera rugoso, pasto de pradera bulboso, pasto de pradera alpino, pasto de pradera ondulado, pasto de pradera de madera, pasto de pradera de Balforth, pasto de pradera de pantano, pasto de pradera de hoja ancha, pasto de pradera de hoja estrecha, pasto de pradera liso, pasto de pradera extendido y pasto de pradera aplanado; dicotiledóneas, preferiblemente eudicotiledóneas, especialmente eudicotiledóneas tales como tomate, sandía, calabaza, pepino, fresa, pimienta, soja, maní, Brassicaceae, especialmente colza, girasol, remolacha azucarera, algodón, alfalfa y arábido.

El procedimiento de acuerdo con la presente invención es específicamente adecuado para proporcionar semillas de plantas transgénicas. En la presente invención, las plantas transgénicas que se pueden obtener – además de sus propiedades ventajosas provistas por el transgén – también contienen propiedades del endófito "adaptadas" que se pueden construir selectivamente y proporcionar en la presente invención.

De acuerdo con una realización preferente del presente procedimiento el microorganismo endofítico es una bacteria endofita, preferiblemente seleccionada de *Burkholderia*, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, y *Sinorhizobium*, *Herbaspirillum*, *Azospirillum*, *Acetobacter*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Streptomyces*, *Enterobacter*, y *Pseudomonas*, *Pantoea* y *Enterobacter*, especialmente *Burkholderia phytofirmans*. De acuerdo con otra realización preferente de, el microorganismo endofítico es un hongo endofítico, preferiblemente seleccionado de *Curvularia*, *Mycorrhiza*, *Piiformospora*, *Trichoderma*, y *Colletotrichum*.

En una realización preferente de acuerdo con la presente invención, el contacto de la flor de una planta con una preparación de microorganismos endofíticos se realiza por medio de la pulverización en el momento de floración. La pulverización es específicamente útil en un procedimiento de producción industrial. Otros procedimientos incluyen la inoculación mediante cepillado, mediante un asa de inoculación, mediante aplicación de gotitas, etc; sin embargo, la pulverización se puede automatizar fácilmente, por ejemplo, en cultivos de invernadero.

La inoculación se realiza mediante la aplicación del cultivo del endófito a la planta con flores. Es recomendable salvaguardar las condiciones que sean favorables para los microorganismos utilizados. Los microorganismos se aplican generalmente en suspensión a una concentración adecuada. Por consiguiente, se prefiere poner en contacto la flor de una planta con una preparación de microorganismos endofíticos mediante la aplicación de los microorganismos en una suspensión de 10^6 a 10^{10} ufc/ml, preferiblemente de 10^7 a 10^9 ufc/ml, especialmente de 10^8 a 10^9 ufc/ml.

Las semillas obtenidas por el presente procedimiento se pueden tratar como semillas normales. Las propiedades beneficiosas (los endófitos) permanecen empacadas de manera segura dentro de la semilla, lo que evita la exposición de los peligros del exterior (lo que generalmente causa daños a los cultivos que se aplican cuando las semillas solo están recubiertas). Por consiguiente, las semillas se pueden almacenar durante un tiempo considerable sin una pérdida significativa de su actividad endofítica. Preferiblemente, la semilla de planta obtenida por el presente procedimiento que contiene microorganismos endofíticos de la planta se almacena durante al menos 1 mes, preferiblemente durante al menos 3 meses, especialmente durante al menos 6 meses.

Obviamente, también son posibles tiempos de almacenamiento mucho más largos para las semillas producidas de acuerdo con la presente invención. Por lo tanto, también se prefiere que la semilla de planta obtenida por el presente procedimiento que contiene microorganismos endofíticos de la planta se almacene durante al menos 12 meses, preferiblemente durante al menos 2 años, especialmente durante al menos 3 años.

El procedimiento de acuerdo con la presente invención es adecuado para proporcionar prácticamente cualquier semilla que contiene endófito, porque la transferencia de los microorganismos de la flor a la semilla es una forma de exposición de bajo riesgo (a plantas y endófitos). Es específicamente adecuado para producir semillas con un endófito que, en principio, se sabe que prolifera naturalmente en las plantas, especialmente en la planta dada, es decir, un "endófito

obtenible de forma natural". Estos endófitos son derivados de fuentes naturales del mismo tipo de planta o de otros tipos de plantas. De acuerdo con una realización preferente, el microorganismo endofítico es, por lo tanto, un endófito que se puede obtener naturalmente.

5 También es posible usar el presente procedimiento para proporcionar semillas con microorganismos optimizados o creados artificialmente, por ejemplo, bacterias u hongos de manipulados genéticamente en forma recombinante; o cepas que se han optimizado mediante varias técnicas de cultivo y/o rondas de selección. Otra realización preferente de la presente invención es, por lo tanto, utilizar una bacteria producida de forma recombinante como el microorganismo endofítico.

10 Como ya se mencionó, las semillas obtenidas por el presente procedimiento se pueden procesar adicionalmente de la manera habitual. Por ejemplo, se puede tratar con varias sustancias que promueven adicionalmente que las plantas se produzcan a partir de las semillas, por ejemplo, mediante la impregnación de las semillas con agentes promotores del crecimiento u otros productos químicos beneficiosos para la salud de las plantas, tales como herbicidas, plaguicidas, antibióticos, etc. Obviamente, también es posible proporcionar un recubrimiento con otros microorganismos endófitos (o el mismo) que el microorganismo de acuerdo con la presente invención. De acuerdo con una realización preferente de la presente invención, la semilla de planta obtenida que contiene microorganismos endofíticos se somete por lo tanto a una etapa de impregnación de la semilla.

Esta invención también se refiere a las semillas que se pueden obtener por el procedimiento de acuerdo con la presente invención que muestran – en comparación con las semillas de acuerdo con la técnica previa - una configuración de endófitos única.

20 De acuerdo con una realización preferente, la presente invención proporciona semillas que pueden crecer en las plantas que se mejoran (en comparación con las plantas de tipo silvestre) con respecto a la tolerancia al estrés. El "estrés" en este contexto puede ser un estrés ambiental, que incluye alta temperatura, sequía, metales y iones metálicos, que causan una variedad de problemas y/o muerte en la planta, y un pH anormal (que incluye ácido y/o alcalino). Con las semillas producidas por la presente invención se pueden obtener plantas que tienen una resistencia al estrés mejorada reproducible, por ejemplo, al menos aproximadamente un 5, 10, 20, 25 y 50% de cambio en termotolerancia, al menos aproximadamente 5, 10, 20, 25 y 50% de cambio en la tolerancia a metales, o al menos aproximadamente a 5, 10, 20, 25 y 50% de cambio en la tolerancia al pH (cada uno medido de acuerdo con el documento US 7,906,313 B2, y en comparación con los controles aplicados sin el procedimiento de acuerdo con la presente invención).

30 De acuerdo con una realización preferente, las semillas de acuerdo con la presente invención se pueden cultivar para obtener plantas con mayor crecimiento. La mejora del crecimiento generalmente se mide como una comparación de plantas cultivadas a partir de semillas obtenidas de acuerdo con la presente invención con plantas de control que carecen de esta composición endofita. Las diferencias en el tamaño de la planta, que incluye hojas, raíz y tallos, generalmente se miden en peso, y el aumento del crecimiento se mide como al menos aproximadamente una diferencia de al menos el 2%, preferiblemente una diferencia de al menos el 3% (que ya se puede considerar como muy significativa ganancia en rendimiento. Aún más preferido, en algunos casos, se puede obtener una diferencia de 5-10% entre las plantas de control y las plantas cultivadas a partir de las semillas de acuerdo con la presente invención, se prefiere específicamente al menos aproximadamente una diferencia de 25%.

40 El procedimiento de acuerdo con la presente invención permite a creación de combinaciones de semillas/endófitos completamente nuevas. Uno de las propiedades más significativas de las semillas preferidas que se puede obtener por la presente invención es la posibilidad de proporcionar poblaciones endofitas predominantes en las semillas. Normalmente, las semillas que contienen endófitos contienen una población diversa de muchos microorganismos endofíticos diferentes con usualmente más de 10 o incluso más de 20 cepas cultivables e identificables diferentes (o incluso más de 30) (pero ninguna de estas cepas es predominante), el procedimiento de acuerdo con la presente invención permite la producción de semillas con una especie predominante de microorganismo endofítico. Por consiguiente, la preparación de semillas preferida que se puede proporcionar en la presente invención contiene semillas que tienen una población de microorganismos endofíticos en la que más de 30%, preferiblemente más de 40%, especialmente más de 50%, de los microorganismos endofíticos representa la cepa inoculante. Esto significa que la mayoría (más de 50%, preferiblemente más de 60%, especialmente más de 70%) de las semillas en la preparación contiene más de 30%, preferiblemente más de 40%, especialmente más de 50%, microorganismos endofíticos que comprenden la cepa inoculante.

55 Incluso es posible proporcionar una preparación de semilla que contiene semillas, en la que más de 60%, preferiblemente más de 70%, más preferida más de 80%, especialmente más de 90%, de microorganismos endofíticos de una especie única (el microorganismo endofítico de la cepa inoculante). Esto permite la producción de semillas que contienen, por ejemplo, más de 60%, preferiblemente más de 70%, especialmente más de 80%, de la cepa endofítica aplicada (por ejemplo, dentro de un campo único).

Una realización específica de la presente invención en consecuencia es una preparación de semilla que se puede obtener por un procedimiento de acuerdo con el presente procedimiento.

De acuerdo con una realización preferente, la presente invención proporciona una preparación de semilla que contiene semillas que tienen más de 30%, preferiblemente más de 40%, especialmente más de 50%, de los microorganismos endofíticos son *Burkholderia phytofirmans*, especialmente *Burkholderia phytofirmans* PsJN (DSM 17436); *Pantoea sp.* FD17 o *Paenibacillus sp.* S10., *Actinobacter sp.* S9, *Bradyrhizobium sp.* NC92 y *Bradyrhizobium japonicum* TAL379.

5 La presente invención también proporciona semillas que se pueden obtener por el procedimiento de acuerdo con la presente invención con características únicas, por ejemplo, con una especie endófito única como se describió anteriormente. Una realización preferente de la presente invención en consecuencia se dirige a las semillas, especialmente semillas de maíz, que se pueden obtener por un procedimiento de acuerdo con la presente invención, en el que los microorganismos endofíticos preferiblemente están presentes en una densidad de población de 10^2 a 10^5 ufc/g de peso seco.

De acuerdo con una realización preferente, la presente invención proporciona semillas de maíz que se pueden obtener por un procedimiento de acuerdo con la presente invención, preferiblemente en el que los microorganismos endofíticos son *Burkholderia phytofirmans*, especialmente en una densidad de población de 10^2 a 10^5 ufc/g de peso fresco de semilla. Se sabe que en el maíz, usualmente, las densidades de población viables son mucho menores (para el maíz dulce, se informó que tales concentraciones están por debajo de 10^1 ufc/g peso fresco (Kaga et al. *Microbes Environ* 24 (2009), 154-162)); en contraste con esto, las semillas de acuerdo con esta realización preferente contienen al menos 10^2 , preferiblemente al menos 10^3 , especialmente al menos 10^4 ufc/g de peso fresco de una especie, especialmente de *Burkholderia phytofirmans* (cepa PsJN). Por consiguiente, la concentración de endófitos de tales semillas contiene una cepa predominante, lo que no es el caso en las plantas naturales o las plantas que se han inoculado con procedimientos de inoculación de la técnica previa.

Las semillas de acuerdo con la presente invención proporcionan un producto de semilla comercializable que contiene un peso o volumen predeterminado de semillas con una composición de endófitos uniforme. Por ejemplo, un producto de semilla comercializable que contiene al menos 100 g de semillas, preferiblemente al menos 1 kg de semillas, más preferido al menos 5 kg de semillas, especialmente al menos 10 kg de semillas, se puede proporcionar mediante el procedimiento de acuerdo con la presente invención que contiene – como un producto entero - más de 30%, preferiblemente más de 40%, especialmente más de 50%, de una especie única de un microorganismo endofítico, es decir, la cepa inoculante. De acuerdo con una realización preferente, la presente invención proporciona un producto de semilla comercializable que contiene al menos 100 g de semillas, preferiblemente al menos 1 kg de semillas, más preferido al menos 5 kg de semillas, especialmente al menos 55 kg de semillas, en el que - como un producto entero – contiene más de 50%, preferiblemente más de 60%, especialmente más de 70% de una especie única de un microorganismo endofítico, es decir, la cepa inoculante. De acuerdo con una realización aun más preferente, la presente invención proporciona un producto de semilla comercializable que contiene al menos 100 g de semillas, preferiblemente al menos 1 kg de semillas, más preferido al menos 5 kg de semillas, especialmente al menos 10 kg de semillas, en el que - como un producto entero – contiene más de 75%, más preferiblemente más de 80%, especialmente más de 90% de microorganismo endofítico de una especie única (el microorganismo endofítico de la cepa inoculante).

Dicha uniformidad en la composición endofítica es única y es extremadamente ventajosa para la agricultura de alta tecnología y/o industrial. Permite una estandarización significativa con respecto a la carga cualitativa de endófitos de los productos de semilla. El término "producto de semilla comercializable" significa cualquier producto comercialmente utilizable que contiene semillas de plantas en un envase adecuado (por ejemplo, una caja, una bolsa, un sobre o cualquier otro contenedor usado para almacenar, enviar u ofrecer semillas de plantas para la venta). Los volúmenes o pesos adecuados son los que se usan actualmente para semillas de plantas (es decir, al menos 100 g, al menos 1, 5 o 10 kg; pero también 25 o más, 40 o más, 50 kg o más, incluso 100 kg o más, 500 kg o más, 1 t o más, etc.). Los contenedores o envases adecuados son aquellos que se usan tradicionalmente en la comercialización de semillas de plantas: sin embargo, también se pueden usar otros contenedores con capacidades de almacenamiento más sofisticadas (por ejemplo, con envoltorios herméticamente cerrados o con contenedores a prueba de gases o agua). La cantidad de endófitos (cualitativa y cuantitativamente) contenida en las semillas o en el producto de semilla comercializable como un todo se puede determinar mediante técnicas estándares de microbiología fácilmente disponibles para cualquier persona experta en la técnica del análisis de endófitos en plantas.

La invención se describe adicionalmente por medio de los siguientes ejemplos y las figuras de los dibujos, pero sin estar restringido a ellos.

La Fig. 1 muestra la vaina de mazorca, colonización interior de grano y mazorca de *Burkholderia phytofirmans*, cepa PsJN en el maíz, cvs Peso y Morignon (el eje x muestra UFC/g de peso seco);

La Fig. 2 muestra imágenes de microscopía óptica de una semilla madura colonizada por *Burkholderia phytofirmans*, cepa PsJN::gusA; El color azul se debe a las células bacterianas marcadas con gusA; la cepa PsJN está presente dentro del embrión (a, b) y en los radicales (c); PsJN comienza a moverse desde el embrión a las partes germinadas (c);

La Fig. 3 muestra la recuperación de la cepa PsJN de *Burkholderia phytofirmans* del interior del grano en diferentes intervalos de tiempo después de la cosecha (DAH; Días después de la cosecha);

La Fig. 4 muestra el efecto de semillas colonizadas/no colonizadas por *Burkholderia phytofirmans* cepa PsJN sobre la germinación y el crecimiento de las plántulas de maíz (a, b, c); y

La Fig. 5 muestra el efecto de semillas colonizadas/no colonizadas por *Burkholderia phytofirmans* cepa PsJN sobre el crecimiento de los brotes de maíz (a, b, c; 30, 45, 60 días después de la siembra).

5 La Fig. 6 muestra los resultados representativos de la tinción con GUS en pimientos tratados con PsJN::gusA110 15 días p.i. Se halló actividad de GUS en todas las partes de la fruta que incluyen las semillas.

La Fig. 7 muestra los análisis FISH de semillas de pimiento colonizadas por *B. phytofirmans* PsJN usando una sonda general dirigida a eubacterias y una sonda de ADNr 23S específica para *B. phytofirmans*. Las bacterias distintas de *B. phytofirmans* (eubmix-FITC) están indicadas con una pequeña flecha y *B. phytofirmans* PsJN está indicada con una flecha más larga.

Ejemplos

Ejemplo 1: Introducción de *Burkholderia phytofirmans* cepa PsJN en semillas de maíz

15 El concepto de colonización de semillas interna con microorganismos promotores del crecimiento de las plantas de acuerdo con la presente invención se analizó con la bacteria endófito *Burkholderia phytofirmans* cepa PsJN y dos variedades de plantas de maíz. La cepa PsJN se aplicó mediante la pulverización de las flores femeninas con una suspensión de 10^8 - 10^9 ufc ml⁻¹. En la madurez, las células PsJN se detectaron dentro de las semillas de maíz en densidades de población viables que variaron de 10^2 - 10^5 UFC g⁻¹ de peso fresco. La cepa PsJN no se recuperó de las plantas del ensayo de inoculación de semillas. Después de 12 meses de almacenamiento, todavía se recuperaron 10^2 células viables por g de semillas. Se realizaron experimentos para determinar los efectos de las semillas de maíz colonizadas internamente sobre la biomasa y el vigor de las plantas descendientes en comparación con los controles no tratados y la aplicación externa de la misma cepa bacteriana.

Descripción experimental

25 La presente invención proporciona semillas que tienen microorganismos beneficiosos, especialmente bacterias, en el interior, lo que permite mejorar igualmente la biomasa de la planta respecto del control que mediante el empleo de los mismos microorganismos (en el presente caso: bacterias) en forma exógena a las semillas. Una variante de la bacteria *Burkholderia phytofirmans* cepa PsJN marcada cromosómicamente con el gen de la beta-glucuronidasa (gusA, gen indicador para la detección y control de la cepa por formación de color) se usó como una cepa de prueba en cultivares de maíz (Peso y Morignon). Para esto, se realizaron series de experimentos y la configuración experimental se dividió en dos categorías (experimentos de 1er y 2do año).

A) Evaluación del potencial de colonización de la cepa PsJN en diferentes tejidos de plantas de maíz (particularmente granos).

B) Evaluación de seguimiento de la semilla colonizada por la cepa PsJN y la inoculación de PsJN (exógenamente) para mejorar la productividad de la planta respecto del control.

35 Cultivo del inóculo de la cepa PsJN como inóculo bacteriano

La cepa bacteriana se cultivó mediante un asa de inoculación de una colonia única colonia en caldo LB modificado con espectinomicina ($100 \mu\text{g ml}^{-1}$) en matraces de 100 ml. El cultivo bacteriano se incubó a 28 ± 2 °C durante 2 días a 180 rpm en una incubadora de agitación. El inóculo bacteriano se aplicó de dos maneras diferentes, es decir, remojo de las semillas y pulverización del inóculo en la etapa de floración. Las semillas de maíz se esterizaron en superficie mediante inmersión durante 5 y 3 minutos en etanol 70% y NaOCl después de 3 lavados con agua esterilizada. Hubo tres tratamientos, 1) inoculación de semillas 2) pulverización específica de flores y 3) inoculación de semillas combinada con inoculación de flores. Las plantas cultivadas a partir de semillas tratadas con caldo de cultivo estéril solo sirvieron como control. Para la inoculación, se sumergieron semillas de dos cultivares de maíz durante 3-4 horas en inóculo bacteriano (10^8 - 10^9 ufc ml⁻¹). Del mismo modo, el inóculo bacteriano se pulverizó específicamente a la flor femenina cuando el cultivo alcanzó el estado de floración. Las semillas se sembraron en bandejas de plástico llenas de tierra y las plantas de semillero de 12 días se transfirieron a un contenedor de 50 kg de suelo (2 plantas en cada contenedor) en condiciones de almacenamiento.

Colonización endofítica por una cepa PsJN (en particular colonización del grano)

50 La rizosfera y la colonización endofítica de la raíz, tallo y hojas por la variante marcada con gusA de *B. phytofirmans* cepas PsJN se determinó por recuento en placa usando placas LB modificadas con 5-Bromo-4-cloro-3-indolil-PD-glucuronido (X-glcA, $50 \mu\text{g ml}^{-1}$), IPTG ($50 \mu\text{g ml}^{-1}$) y el antibiótico espectinomicina ($100 \mu\text{g ml}^{-1}$). Las muestras de raíz, tallo y hoja se lavaron, se esterizaron en la superficie (como se describió anteriormente) y se usaron para la recuperación de PsJN (colonización). Para esto, las muestras se trituraron en solución salina 0,9%, se sometieron a

oscilación en un pulsificador durante 30 seg y las series de dilución se extendieron en placas de agar. Las células positivas a beta-glucuronidasa aparecen de color azul en los medios que contienen X-glcA. Las colonias azules se contaron después de 3 días de incubación a 30 °C y se calculó el número de células original por g de tejido de planta. De manera similar, también se observó colonización de PsJN desde diferentes partes de la mazorca, es decir, vaina, granos y el interior de la mazorca. La identidad de las colonias azules se confirmó adicionalmente mediante el análisis RFLP de la región espaciadora intergénica del ARNr 16S-23S.

Se realizaron experimentos de seguimiento en el 2do año para evaluar

1. Viabilidad, activación y capacidad de colonización de la cepa PsJN que coloniza semillas de maíz.
2. Efecto de la semilla colonizada por la cepa PsJN sobre la germinación y el vigor de las plántulas en comparación con el control no tratado (ensayo en bandeja de plástico).
3. Efecto de la semilla colonizada por la cepa PsJN sobre la biomasa de la planta en comparación con el control no tratado (ensayos en maceta).

Antes de los experimentos de la planta, las semillas colonizadas con PsJN de ambos cultivares se analizaron para ver si las células PsJN están presentes y aún vivas en el interior. Para este propósito, se embebieron 20 semillas en tampón salino durante 2-3 días y posteriormente se trituraron en tampón salino 0,9%, se agitaron durante 45 segundos con un pulsificador y se extendieron en diluciones en placas LB modificadas con X-glcA, IPTG y espectinomicina.

El inóculo bacteriano se preparó como se describió anteriormente y se realizaron tres experimentos con cuatro tratamientos, es decir, control, inoculación de semillas con la cepa PsJN (exógenamente), semillas colonizadas con PsJN (producidas en el 1er año por pulverización), semillas colonizadas PsJN + inoculación.

Para analizar el rendimiento de la germinación, las semillas (45) se esterilizaron en superficie y se inocularon como se describió anteriormente, y se sembraron en una bandeja de plástico (diámetro 30 cm) con tres replicados. Los datos sobre el tiempo hasta el inicio de la germinación, tiempo de germinación, el tiempo hasta el 50% y germinación final, índice y energía de germinación, coeficiente de germinación uniforme y la asimetría se registraron de colonizado con PsJN respecto del control.

Se realizaron dos experimentos con macetas para evaluar el rendimiento de las semillas colonizadas con PsJN con respecto a la producción de biomasa vegetal en comparación con el control. Las semillas esterilizadas en la superficie se sembraron directamente en macetas con tierra (primer ensayo de macetas) o, alternativamente, se sembraron en bandejas de plástico, y después de 10 días, las plántulas se transfirieron a macetas de 5 kg (2do ensayo de macetas). Todas las plantas se recolectaron después de 60 días y se registraron los datos de la altura de la planta, el número de hojas por planta y la biomasa de brotes de raíz.

Los datos se sometieron a análisis de varianza utilizando el paquete de software SPSS versión 19 (SPSS Ink, Chicago, IL).

Resultados

Experimento A (1er año): Colonización de semilla por cepa PsJN

La capacidad de la cepa PsJN para colonizar las mazorcas de maíz (vainas de la mazorca, interior de la mazorca y granos) se analizó en plantas tratadas mediante inoculación de flores específicas (mediante pulverización) solo o mediante inoculación de semillas (Figura 1). Sólo la inoculación de las flores produjo la colonización interna de las semillas. Se observó una colonización interna de la semilla por la cepa PsJN en ambos cultivares y ambos tratamientos de inoculación de flores. Se detectaron células PsJN en semillas de maíz a densidades de población viables que variaron de 10^2 - 10^5 UFC de peso fresco g^{-1} .

Experimento B1 (2do año): Viabilidad, activación y capacidad de colonización de la cepa PsJN que coloniza semillas de maíz.

Se analizaron las semillas colonizadas con PsJN, se recuperaron del experimento del primer año, para ver si las células PsJN sobreviven en el interior de las semillas latentes y tienen la capacidad de colonizar las plantas que emergen de las semillas, lo que es muy importante ya que las semillas se pueden almacenar durante varios meses hasta siembra. Se detectaron 10^2 células viables en semillas latentes de dos meses (Figura 1). La impregnación en tampón salino durante 2-3 días activó las semillas de 6 meses y junto con las semillas que comienzan a germinar, la PsJN comenzó a proliferar, lo que produjo una recuperación de 10^4 células viables (Figura 4). Los brotes emergidos de las semillas de 420 días se colonizaron mediante 10^5 células PsJN y las bacterias se encontraron en el interior total de los brotes (Figura 1 y 2).

Experimento B2 (2do año): Efecto de las semillas colonizadas con PsJN sobre la germinación y vigor de las plántulas en comparación con el control tratado

Los datos resumidos en las tablas 1 y 4 revelaron que las semillas colonizadas con PsJN mostraron una capacidad de

administración significativamente mejorada. Las semillas colonizadas con PsJN de ambos cultivares comenzaron a germinar 36-48 horas antes que el control. La semilla colonizada por PsJN mostró una tasa de germinación final de casi el 100% y requirió menos tiempo de germinación medio en comparación con las semillas de control. En consecuencia, las semillas colonizadas tienen mejor índice de germinación en comparación con el control.

- 5 Además, las semillas colonizadas con PsJN de ambos cultivares mostraron una biomasa de plántulas de maíz significativamente mayor en comparación con las semillas de control no tratadas (Tablas 2 y 5; Figuras 3 y 4), pero la biomasa de plántulas no significativamente más altas en comparación con las semillas inoculadas exógenamente con PsJN.

- 10 **Experimento B3 (2do año):** Efecto de las semillas colonizadas por sobre la biomasa de planta en comparación con los controles no tratados (ensayos de maceta)

- 15 Los datos de los ensayos en macetas (Tabla 3 y 6) revelaron que las semillas de maíz colonizadas con PsJN tuvieron un efecto positivo en la producción de biomasa de plantas comparable a las semillas recubiertas externamente con células PsJN con la cv Morignon que responde mejor que la cv Peso en ambos tratamientos (Tablas 3 y 6; Figura 5). Las semillas colonizadas con PsJN mostraron un aumento de 38% en la producción de biomasa de planta y un aumento significativo en la biomasa de la raíz en comparación con el control. Además, el número de hojas por planta fue mayor en las plantas de semilla colonizada por PsJN en comparación con el control.

Conclusiones

- *Burkholderia phytofirmans* PsJN se puede introducir en semillas de maíz mediante la pulverización de las células sobre las flores.
- 20 • La inoculación de semillas solo no permite la colonización de semillas de maíz de la próxima generación.
- La cepa PsJN puede sobrevivir dentro de las semillas de maíz durante al menos 12 meses
- Las células bacterianas que colonizan las semillas se activan rápidamente, proliferan y colonizan brotes emergentes. La PsJN que coloniza las semillas muestra una importante promoción del crecimiento de las plantas
- 25 • PsJN que coloniza semillas muestra una promoción del crecimiento de plantas sustancial.

El presente ejemplo por lo tanto muestra que el procedimiento de acuerdo con la presente invención permite una vía efectiva y confiable para generar semillas con endófitos de una manera controlada y reproducible.

Ejemplo 2: Introducción de *B. phytofirmans* PsJN y *Enterobacter sp.* FD17 en semillas de trigo y cebada

Descripción experimental

- 30 Las semillas de trigo (*Triticum spp.* Cvs Collada y Monsun) y cebada (*Hordeum vulgare* L. cvs Victoriana y Totum) se esterilizaron en superficie mediante la inmersión durante 5 y 3 minutos en etanol 70% y NaOCl después de 3 lavados con agua esterilizada. Las semillas se sembraron en bandejas de plástico y las plántulas de 12 días se transfirieron a contenedores de 20 kg de suelo y se cultivaron en condiciones de invernadero. El suelo se recolectó en un campo agrícola en Tulln, Baja Austria, y se tamizó para eliminar material vegetal. Las cepas bacterianas (variantes marcadas con gusA de *B. phytofirmans* PsJN y *Enterobacter sp.* FD17) se cultivaron mediante inoculación de asa en caldo LB modificado con espectinomicina (100 mg ml⁻¹) en un matraz Erlenmeyer de 100 ml. Los cultivos bacterianos se incubaron a 28±2 °C durante 2 días a 180 rpm en una incubadora de agitación. El inóculo bacteriano se aplicó mediante la pulverización de exclusivamente flores. Las plantas de control se trataron con caldo esterilizado.
- 35

Colonización endofítica de semillas de trigo y cebada

- 40 Las plantas se cosecharon en la etapa de maduración y las semillas se recolectaron. La colonización de la semilla por las cepas inoculantes se determinó mediante tinción con GUS. Por lo tanto, las semillas se cortaron en dos trozos y se incubaron en solución de tinción GUS (EDTA 1 mM, ferricianuro de potasio 5 mM, ferrocianuro de potasio 5 mM, fosfato de sodio 100 mM, pH 7,0, Triton-X-100 1%, X-Gluc 0,1 mg/ml predisoluto en 5 µl/mg de N, N-dimetilformamida, 0,1% de IPTG) directamente después de la recolección a 37 °C durante 20 horas. Posteriormente, las muestras se lavaron con etanol 70%. El etanol se descartó posteriormente y las muestras se fijaron en solución de paraformaldehído (paraformaldehído 4% disuelto en PBS a 60 °C con agitación constante hasta la clarificación de la solución) durante la noche a 4 °C. Finalmente, las muestras fijadas se lavaron 3 veces en PBS y se almacenaron en el último enjuague a 4 °C hasta su posterior procesamiento. Paralelamente, las semillas se trituraron manualmente en condiciones estériles y se utilizaron para el aislamiento de ADN de una comunidad bacteriana mediante el empleo de procedimientos estándar.
- 45
- 50 La presencia de las cepas inoculantes se confirmó mediante el análisis de secuencia de la región espaciadora intergénica (IGS) del ARNr 16S-23S de clones individuales y la comparación posterior con las de las cepas inoculantes.

Resultados

Experimento A (1er año):

Se descubrió que ambas semillas de trigo y cebada estaban colonizadas internamente por las cepas inoculantes. El análisis de secuencia de la región IGS confirmó la presencia de *Enterobacter sp.* FD17 y *B. phytofirmans* PsJN.

Conclusiones

- 5 • *Burkholderia phytofirmans* PsJN y *Enterobacter sp.* El FD17 se pueden introducir en semillas de cebada y trigo mediante la pulverización de las células sobre las flores.

Ejemplo 3: Introducción de *B. phytofirmans* PsJN en semillas de tomate y pimiento

Descripción experimental

10 Se estudió el comportamiento de colonización de *Burkholderia phytofirmans* PsJN durante la transmisión de flores a semillas con tomate (*Solanum lycopersicum* cv. Micro Tom y Matina) y pimiento (*Capsicum annuum* cv. Feher). La presencia de PsJN se investigó en 3 puntos de tiempo diferentes. La detección de bacterias en el interior de la semilla de las muestras recolectadas se realizó mediante tinción con GUS y microscopía por un lado y PCR cuantitativa específica de la cepa por el otro. Para la detección por observación visual de la tinción y microscopía, la variante marcada con gusA de la cepa PsJN, *Burkholderia phytofirmans* PsJN::gusA110, se usó en paralelo con la cepa silvestre que se detectó mediante qPCR.

15 La capacidad de PsJN para sobrevivir en la semilla y proliferar con la plántula emergente se estudió en un experimento de germinación posterior. De este modo, las semillas cosechadas de las plantas tratadas previamente se sembraron y se cuidaron durante un período determinado. Posteriormente, se examinaron las plántulas con respecto a la presencia de PsJN mediante tinción con GUS y PCR cuantitativa de genes específicos de PsJN.

20 Las cepas bacterianas se cultivaron mediante inoculación con asa de una colonia única en caldo LB que contiene 0,1% del antibiótico espectinomicina en el caso de *B. phytofirmans* PsJN::gusA110 y sin antibióticos en el caso de la cepa de tipo silvestre y se incubaron a 28 °C en un agitador (160 rpm) durante la noche. El cultivo durante la noche se transfirió a matraces Erlenmeyer de 500 ml que contienen 250 ml de medio LB líquido. Se incubaron en un agitador (120 rpm) a 28 °C durante 2 días para permitir el crecimiento de bacterias. Posteriormente, se cargaron alícuotas de 40 ml del medio incubado que contiene el cultivo bacteriano en tubos de plástico de 50 ml y se centrifugaron a 4500 rpm y 4 °C durante 10 minutos (Megafuge 40R, Heraeus, Hanau, Alemania). Posteriormente, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento bacteriano mediante agitación en vórtex en 20 ml de PBS (KCl 0,2 g/l, Na₂HPO₄ 1,44 g/L y KH₂PO₄ 0,24 g/L, en dH₂O, pH 7,4, autoclavado. La suspensión de control se trató en consecuencia. Las alícuotas de cada suspensión bacteriana posteriormente se mezclaron en frascos de Schott de 500 ml. La concentración de las suspensiones se midió con ayuda de espectrofotometría (NanoDrop 1000 3.7.1, Wilmington, DE, USA) y se ajustó a 10⁸ Ufc/ml.

25 La inoculación específica de flores de tomate y pimiento se llevó a cabo cuando las plantas alcanzaron la etapa de crecimiento 61 - 63 en la escala BBCH (para tomate: primera inflorescencia: primera flor abierta - tercera inflorescencia: primera flor abierta; para pimiento: primera flor abierta - tercera flor abierta) (FELLER et al., 1995b).

30 Los inoculantes bacterianos y el tampón solo para el control se cargaron en un frasco de pulverización de vidrio de 50 ml previamente esterilizado con etanol 70%. Las plantas para inocular se separaron espacialmente de las otras para evitar la contaminación por deriva. Una flor única o 2 a 3 flores inmediatamente adyacentes se rociaron con 675 µl del inóculo. Se usó un papel de filtro para proteger las partes de la planta circundantes, tales como hojas y tallo de la deriva, y recoger el inóculo sobrante para evitar el goteo en el suelo. Las inflorescencias/flores tratadas se marcaron con un lazo retorcido para permitir su posterior identificación.

35 Se analizaron seis replicados de las plantas inoculadas en 3 etapas de desarrollo diferentes. Las muestras de pimiento se tomaron 3 días y 15 días después de la pulverización, así como en la madurez completa. El material vegetal (brotes, flores, flores fertilizadas, frutos en desarrollo, frutos inmaduros, frutos maduros y semillas) se cortó con un bisturí estéril y posteriormente se incubó en solución de tinción con GUS (EDTA 1 mM, ferricianuro de potasio 5 mM, ferrocianuro de potasio 5 mM, fosfato de sodio 100 mM, pH 7,0, Triton-X-100 1%, X-Gluc 0,1 mg/ml predisoluto en µl/mg de N, N-dimetilformamida, IPTG 0,1%) directamente después de la cosecha a 37 °C durante 20 horas. Posteriormente, se realizó la decoloración mediante el lavado de las muestras con etanol 70%. Luego se descartó el etanol y las muestras se fijaron en solución de paraformaldehído (paraformaldehído 4% disuelto en PBS a 60 °C con agitación constante hasta la clarificación de la solución) durante la noche a 4 °C. Finalmente, las muestras fijadas se lavaron 3 veces en PBS y se almacenaron en el último lavado a 4 °C hasta su posterior procesamiento.

40 El material de las plantas inoculadas con PsJN de tipo silvestre y las muestras de control se congelaron inmediatamente después de la recolección en nitrógeno líquido y se transfirieron para su almacenamiento a -80 °C. Posteriormente, se aisló el ADN usando procedimientos estándares y se usó como se describió anteriormente para el Ejemplo 2.

Resultados

Experimento A (1er año):

5 Después de la pulverización de flores, *B. phytofirmans* PsJN colonizó las semillas y pericarpio de frutos de tomate y pimiento (Figura 6). El proceso de colonización se controló mediante tinción con GUS y microscopía. El número de
10 células de la cepa *B. phytofirmans* PsJN durante la transmisión de las flores a las semillas se analizó mediante una PCR cuantitativa TaqMan usando cebadores y una sonda dirigida a un gen que codifica la glutamina sintetasa. La cantidad de células de *B. phytofirmans* PsJN aplicadas en una flor fue de aproximadamente 10^8 y el número de células calculado por mg de material de planta durante el proceso de colonización disminuyó de aproximadamente 3000 células por flores a unas pocas docenas de células en semillas. Los resultados se confirmaron mediante hibridación in situ con fluorescencia (Fig. 7).

Conclusiones

- *Burkholderia phytofirmans* PsJN se puede introducir en tomate y pimienta mediante la pulverización de células sobre las flores.

Tabla 1. Rendimiento comparativo de semillas colonizadas con PsJN e inoculación de PsJN (en forma exógena) Sobre la germinación del peso del maíz cv Peso (los datos son un promedio de tres repeticiones)

Tratamiento	Tiempo al inicio de la germinación	Tiempo a 50% de germinación (T50)	Tiempo de emergencia medio (MET)	Germinación final % (FGP)	Energía de germinación (GE)	Coefficiente de emergencia uniforme (CUE)	Índice de germinación (GI)	Asimetría
Control [†]	4a [†]	5,20b	6,74a	83,33bc	72,92ab	0,80NS	6,45bc	0,77bc
Inoculación de PsJN+	3,33ab	4,80c	6,55a	100a	85,42a	0,67	8,82a	0,73c
Control [§]	4a	5,60a	6,83a	77,08c	64,58b	0,85	5,45c	0,82a
Inoculaciones de PsJN§	3,33ab	5,30ab	6,73a	89,58b	68,75ab	0,74	6,85b	0,78ab
Semilla colonizada PsJN [#]	2,33bc	4,33d	5,49b	100a	69ab	0,77	8,75a	0,79ab

[†]Valores que comparten letras similares no difieren significativamente en $P < 0,05$, de acuerdo con la Prueba de rango múltiple de Duncan.

[#]Semillas preparadas por pulverización de inóculo de PsJN (10^9 ufc ml⁻¹)

[§] semilla progenitora usada para el primer año de experimento

[§] Semilla descendiente producida a partir del primer año de experimento

Tabla 2. Diferencia comparativa de PsJN inoculada y semilla colonizada por PsJN sobre la biomasa de maíz cv Peso en experimento de bandeja de plástico (los datos son un promedio de tres repeticiones)

Tratamiento	Biomasa de planta fresca (g)			Biomasa de planta seca (g)				Altura de la planta (cm)	Núm. de hojas por planta
	Tallo	Hojas	Raíces	Biomasa total	Tallo	Hojas	Raíces		
Control	79,37 ct	95,70 b	37,20 b	212,27 c	3,63 c	9,65 b	1,39 b	14,67 c	6,58 c
Inoculación de PsJN	93,77 b	111,03 a	38,4 ab	244,43 b	4,22 b	10,65 ab	1,73 a	16,90 b	7,04 b
Semilla colonizada PsJN [†]	99,70 b	113,33 a	39,63 a	251,43 ab	4,39 b	11,17 a	1,79 a	17,35 b	7,20 b

[†]Valores que comparten letras similares no difieren significativamente $enP < 0,05$, de acuerdo con la Prueba de rango múltiple de Duncan.

[‡]Semillas preparadas por pulverización de inóculo de PsJN (10^8-10^9 ufc ml^{-1})

ES 2 722 275 T3

Tabla 3. Rendimiento comparativo de semillas colonizadas con PsJN y la inoculación de PsJN (en forma exógena) en biomasa de planta de maíz cv Peso en condiciones de maceta (los datos son promedio de tres replicados).

Tratamiento	Ensayo de maceta I (Siembra directa)				Ensayo de maceta II (siembra en vivero)	
	Altura de planta (cm)	Núm. de hojas por planta	Biomasa de brotes	Biomasa de raíces	Biomasa de brotes	Biomasa de raíces
Control	96,42 c [†]	6,98 c	5,32 c	0,82 c	1,29 c	0,28 c
Inoculación de PsJN	108,01 ab	9,04 ab	8,80 ab	1,42 a	2,37 b	0,423 ab
Semilla colonizada PsJN [‡]	104,62 b	8,42 b	7,17 b	1,12 b	2,16 b	0,358 b

[†]Valores que comparten letras similares no difieren significativamente en $P < 0,05$, de acuerdo con la Prueba de rango múltiple de Duncan.

[‡]Semillas preparadas por pulverización de inóculo de PsJN (10^8 - 10^9 ufc ml⁻¹)

Tabla 4. Rendimiento comparativo de semillas colonizadas con PsJN y la inoculación de PsJN (en forma exógena) sobre la germinación de maíz cv Morignon (los datos son promedio de tres replicados).

Tratamiento	Tiempo al inicio de la germinación	Tiempo a 50% de germinación (T50)	Tiempo de emergencia medio (MET)	Germinación final %	Energía de germinación	Coefficiente de emergencia	Índice de germinación	Asimetría
Control [#]	4,33a†	4,98a	6,72a	85,42bc	79,17ab	0,81NS	6,66b	0,74NS
Inoculación de PsJN+	3,67a-c	4,96a	6,65a	95,83ab	89,58a	0,78	8,25a	0,75
Control [§]	4ab	5,02a	6,65a	79,17c	75b	0,74	6,65b	0,76
Inoculaciones de PsJN§	3,33bc	5,07a	6,59a	91,67ab	75b	0,65	7,88ab	0,77
Semilla colonizada PsJN‡	3c	4,10b	5,69b	100a	83,33ab	0,69	9,06a	0,72

†Valores que comparten letras similares no difieren significativamente $\text{en } P < 0,05$, de acuerdo con la Prueba de rango múltiple de Duncan.

#Semillas preparadas por pulverización de inóculo de PsJN (10^9 ufc ml^{-1})

semilla progenitora usada para el primer año de experimento

§ Semilla descendiente producida a partir del primer año de experimento

Tabla 5. Diferencia comparativa de semillas colonizadas con PsJN y la inoculación de PsJN sobre la biomasa de plántulas de maíz cv Morignon en experimento de bandeja de plástico (los datos son un promedio de tres repeticiones).

Tratamiento	Biomasa de planta fresca (g)			Biomasa de planta seca (g)				Altura de la planta (cm)	Núm. de hojas por planta	
	Tallo	Hojas	Raíces	Biomasa total	Tallo	Hojas	Raíces			Biomasa total
	Control	81,07 ct	97,70 b	38,43 b	215,93 c	3,83 c	9,67 c	1,76 b	15,26 c	94,76N S
Inoculación de PsJN	92,67 b	104,80 a	42,40 a	239,23 b	4,64 b	10,57 b	2,34 a	17,67 b	95	6,87 b
Semilla colonizada PsJN‡	92,90 b	105,07 a	41,93 a	240,13 b	4,66 b	11,25 ab	2,35 a	18,24 ab	95,02	6,84 b

†Valores que comparten letras similares no difieren significativamente en $P < 0,05$, de acuerdo con la Prueba de rango múltiple de Duncan.

#Semillas preparadas por pulverización de inóculo de PsJN (10^8 - 10^9 ufc ml⁻¹)

Tabla 6. Rendimiento comparativo de semillas colonizadas con PsJN versus la inoculación de PsJN (en forma exógena) en biomasa de planta de maíz cv Morignon en condiciones de maceta (los datos son promedio de tres replicados)

Tratamiento	Ensayo de maceta I (Siembra directa)				Ensayo de maceta II (siembra en vivero)	
	Altura de planta (cm)	Núm. de hojas por planta	Altura de planta (cm)	Núm. de hojas por planta	Altura de planta (cm)	Núm. de hojas por planta
Control	101,42 c†	7,98 c	6,36 c	1,12 c	3,29 c	0,41 c
Inoculación de PsJN	110,67 b	9,47 b	8,17 b	1,42 b	4,37 b	0,623 ab
Semilla colonizada PsJN‡	113,01 ab	9,83 b	8,80 b	1,56 ab	4,26 b	0,558 b

†Valores que comparten letras similares no difieren significativamente en $P < 0,05$, de acuerdo con la Prueba de rango múltiple de Duncan.

‡Semillas preparadas por pulverización de inóculo de PsJN (10^8 - 10^9 ufc ml⁻¹)

Otras realizaciones de la presente descripción se describen a continuación y se denominan como E1 a E27.

E1. Procedimiento de producción de semillas de planta que contienen bacterias endófitas, caracterizado por las siguientes etapas:

poner en contacto una planta con flores en el curso de la fase de floración con una preparación de bacterias endófitas, por el cual las bacterias endófitas entran en la planta por medio de las flores y se transportan al interior de la semilla producida por la planta y

obtener las semillas de planta que contienen bacterias endófitas de la planta.

E2. Procedimiento de acuerdo con E 1, en el que la bacteria endófitas se selecciona de *Burkholderia*, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, y *Sinorhizobium*, *Herbaspirillum*, *Azospirillum*, *Acetobacter*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Streptomyces*, *Pantoea*, *Enterobacter*, y *Pseudomonas*, especialmente *Burkholderia phytofirmans*.

E3. Procedimiento de acuerdo con E 1, en el que la bacteria endófitas es un hongos endófitos, preferiblemente seleccionado de *Curvularia*, *Trichoderma*, *Piiformospora* y *Colletotrichum*.

E4. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de E 1 a E 3, en el que el contacto de la flor de una planta con una preparación de bacterias endófitas se realiza por medio de la pulverización de los microorganismos en el momento de floración.

E5. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de E 1 a E 4, en el que el contacto de la flor de una planta con una preparación de bacterias endófitas se realiza mediante la aplicación de los microorganismos en una suspensión de 10^6 a 10^{10} ufc/ml, preferiblemente de 10^7 a 10^9 ufc/ml, especialmente de 10^8 a 10^9 ufc/ml.

E6. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de E 1 a E 5, en el que la semilla de planta obtenida que contienen bacterias endófitas de la planta se almacena durante al menos 1 mes, preferiblemente durante al menos 3 meses, especialmente durante al menos 6 meses.

E7. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de E 1 a E 6, en el que la semilla de la planta obtenida que contiene bacterias endófitas de la planta se almacena durante al menos 12 meses, preferiblemente durante al menos 2 años, especialmente durante al menos 3 años.

E8. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de E 1 a E 7, en el que las bacterias endófitas son endófitos obtenibles naturalmente.

E9. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de E 1 a E 8, en el que las bacterias endófitas son bacterias producidas de forma recombinante.

E10. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de E 1 a E 9, en el que la semilla de la planta obtenida que contiene bacterias endófitas se somete a una etapa de impregnación de semilla.

E11. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de E 1 a E 10, en el que el contacto de la flor de una planta con una preparación de bacterias endófitas se realiza mediante el empleo de insectos que se alimentan de polen, preferiblemente abejorros, que transportan los microorganismos endófitos.

E12. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de E 1 a E 11, en el que la planta se selecciona del grupo de Graminae (pastos), preferiblemente pastos de los géneros *Agropyron*, *Agrostis*, *Andropogon*, *Anthoxanthum*, *Arrhenatherum*, *Avena*, *Brachypodium*, *Bromus*, *Chloris*, *Cynodon*, *Dactylis*, *Elymus*, *Eragrostis*, *Festuca*, *Glyceria*, *Hierochloe*, *Hordeum*, *Lolium*, *Oryza*, *Panicum*, *Paspalum*, *Phalaris*, *Phleum*, *Poa*, *Setaria*, *Sorghum*, *Triticum*, *Zea*, especialmente *Zea mays*, maíz cultivado y teosinte, *Zea diploperennis* Iltis et at., diploperennial teosinte, *Zea luxurians* (Durieu et Asch.) Bird; y *Zea perennis* (Hitchc.) Reeves et Mangelsd., teosinte perenne y *Zoysia*; trigos, preferiblemente *Triticum monococcum*, *Triticum turgidum*, *Triticum timopheevi* (trigo de timofevi) y *Triticum aestivum* (trigo harinero); preferiblemente pastos de centeno y pasto azul, especialmente pasto azul de Kentucky, pasto azul de Canadá, pasto de pradera rugoso, pasto de pradera bulboso, pasto de pradera alpino, pasto de pradera ondulado, pasto de pradera de madera, pasto de pradera de Balforth, pasto de pradera de pantano, pasto de pradera de hoja ancha, pasto de pradera de hoja estrecha, pasto de pradera liso, pasto de pradera extendido y pasto de pradera aplanado;; dicotiledóneas, preferiblemente eudicotiledóneas, especialmente tomate, sandía, calabaza, pepino, fresa, pimiento, soja, maní, Brassicaceae, especialmente colza, girasol, remolacha azucarera, algodón, alfalfa y arabidopsis.

E1 3. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de E 1 a E 12, en el que la planta es una planta transgénica.

E14. Preparación de semilla que se puede obtener por un procedimiento de acuerdo con cualquiera de E 1 a E 13.

E15. Preparación de semilla de acuerdo con E14 en el que más de 30%, preferiblemente más de 40%, especialmente más de 50%, de las bacterias endófitas representan la cepa inoculante.

E1 6. Preparación de semilla de acuerdo con E14 o E15 en el que más de 60%, preferiblemente más de 70%, especialmente más de 80%, de las bacterias endófitas representan la cepa inoculante.

E17. Preparación de semilla de acuerdo con cualquiera de E 14 a E 16, que contiene semillas que tienen más de 30%, preferiblemente más de 40%, especialmente más de 50%, de las bacterias endófitas son *Burkholderia phytofirmans*, especialmente *Burkholderia phytofirmans* PsJN, *Pantoea sp.* FD17 o *Paenibacillus sp.* S10., *Actinobacter sp.* S9, *Bradyrhizobium sp.* NC92 y *Bradyrhizobium japonicum* TAL379.

E18. Preparación de semilla de acuerdo con cualquiera de E 14 a E 17, que contiene semillas que tiene una población de bacterias endófitas en el que más de 70%, preferiblemente más de 80%, especialmente más de 90%, de las bacterias endófitas representan la cepa inoculante.

E19. Semilla de maíz que se puede obtener por un procedimiento de acuerdo con cualquiera de E 1 a E 13, en el que las bacterias endófitas están presentes en una densidad de población de 10^2 a 10^5 ufc/g peso fresco.

E20. Semilla de maíz que se puede obtener por un procedimiento de acuerdo con cualquiera de E 1 a E 13, preferiblemente en el que las bacterias endófitas son *Burkholderia phytofirmans*, especialmente *Burkholderia phytofirmans* en una densidad de población de 10^2 a 10^5 ufc/g de peso fresco.

E21. Producto de semilla de planta comercializable que contiene al menos 100 g de semillas, preferiblemente al menos 1 kg de semillas, más preferido al menos 5 kg de semillas, especialmente al menos 10 kg de semillas, que se puede obtener por un procedimiento de acuerdo con cualquiera de E1 a E13, en el que está contenido más de 30%, preferiblemente más de 40%, especialmente más de 50%, de una especie única de bacterias endofitadas.

E22. Producto de semilla de planta comercializable de acuerdo con E 21, que contiene al menos 100 g de semillas, preferiblemente al menos 1 kg de semillas, más preferido al menos 5 kg de semillas, especialmente al menos 10 kg de semillas, en el que está contenido más de 50%, preferiblemente más de 60%, especialmente más de 70%, de una especie única de bacterias endófitas.

E23. Producto de semilla de planta comercializable de acuerdo con E 21 or E 22, que contiene al menos 100 g de semillas, preferiblemente al menos 1 kg de semillas, más preferido al menos 5 kg de semillas, especialmente al menos 10 kg de semillas, en el que está contenido más de 75%, más preferiblemente más de 80%, especialmente más de 90%, de una especie única de bacterias endófitas.

E24. Producto de semilla de planta comercializable de acuerdo con cualquiera de E 21 a E 23, en el que la planta se selecciona del grupo de Graminae (pastos), preferiblemente pastos de los géneros *Agropyron*, *Agrostis*, *Andropogon*, *Anthoxanthum*, *Arrhenatherum*, *Avena*, *Brachypodium*, *Bromus*, *Chloris*, *Cynodon*, *Dactylis*, *Elymus*, *Eragrostis*, *Festuca*, *Glyceria*, *Hierochloe*, *Hordeum*, *Lolium*, *Oryza*, *Panicum*, *Paspalum*, *Phalaris*, *Phleum*, *Poa*, *Setaria*, *Sorghum*, *Triticum*, *Zea*, especialmente *Zea mays*, maíz cultivado y teosinte, maíz cultivado y teosinte, *Zea diploperennis* Iltis et at., diploperennial teosinte, *Zea luxurians* (Durieu et Asch.) Bird; y *Zea perennis* (Hitchc.) Reeves et Mangelsd., teosinte perenne y *Zoysia*; trigos, preferiblemente *Triticum monococcum*, *Triticum turgidum*, *Triticum timopheevi* (trigo de timofevi) y *Triticum aestivum* (trigo harinero); preferiblemente pastos de centeno y pasto azul, especialmente pasto azul de Kentucky, pasto azul de Canadá, pasto de pradera rugoso, pasto de pradera bulboso, pasto de pradera alpino, pasto de pradera ondulado, pasto de pradera de madera, pasto de pradera de Balforth, pasto de pradera de pantano, pasto de pradera de hoja ancha, pasto de pradera de hoja estrecha, pasto de pradera liso, pasto de pradera extendido y pasto de pradera aplanado;; dicotiledóneas, preferiblemente eudicotiledóneas, especialmente tomate, sandía, calabaza, pepino, fresa, pimiento, soja, maní, Brassicaceae, especialmente colza, girasol, remolacha

azucarera, algodón, alfalfa y arábidopsis.

E25. Producto de semilla de planta comercializable de acuerdo con cualquiera de E 21 a E 24, en el que la bacteria endófitas se selecciona de *Burkholderia*, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, y *Sinorhizobium*, *Herbaspirillum*, *Azospirillum*, *Acetobacter*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Streptomyces*, *Pantoea*, *Enterobacter*, y *Pseudomonas*, especialmente *Burkholderia phytofirmans*.

E26. Producto de semilla de planta comercializable de acuerdo con cualquiera de E 21 a E 25, en el que la bacteria endófitas es *Burkholderia phytofirmans*, especialmente *Burkholderia phytofirmans* PsJN, *Pantoea sp.* FD17 o *Paenibacillus sp.* S10., *Actinobacter sp.* S9, *Bradyrhizobium sp.* NC92 y *Bradyrhizobium japonicum* TAL379.

E27. Producto de semilla de planta comercializable de acuerdo con cualquiera de E 21 a E 26, en el que la planta es maíz.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de producción de semillas de planta que contienen bacterias endófitas, **caracterizado por** las siguientes etapas:
 - poner en contacto una planta con flores en el curso de la fase de floración con una preparación de bacterias endófitas, mediante lo cual las bacterias endófitas entran en la planta por medio de las flores y se transportan al interior de la semilla producida por la planta y
 - obtener las semillas de planta que contienen bacterias endófitas de la planta.
2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que las bacterias endófitas se seleccionan preferiblemente de *Burkholderia*, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, y *Sinorhizobium*, *Herbaspirillum*, *Azospirillum*, *Achromobacter*, *Acetobacter*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Streptomyces*, *Pantoea*, *Enterobacter*, *Xanthomonas*, *Azotobacter*, *Klebsiella*, *Micrococcus*, *Flavobacterium*, *Erwinia* y *Pseudomonas*, en especial *Burkholderia phytotirmans*.
3. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 o reivindicación 2, en el que el contacto de la flor de una planta con una preparación de bacterias endófitas se realiza por medio de pulverización de los microorganismos en el tiempo de la floración.
4. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el contacto de la flor de una planta con una preparación de bacterias endófitas se realiza mediante la aplicación de los microorganismos en una suspensión de 10^7 a 10^9 ufc/ml, preferiblemente de 10^8 a 10^9 ufc/ml.
5. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que además comprende cultivar una planta a partir de las semillas de planta, en el que al menos uno de crecimiento y rendimiento de planta está aumentado en la planta en comparación con las plantas de control no tratadas.
6. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que además comprende cultivar una planta a partir de las semillas de planta, en el que la tolerancia al estrés ambiental está aumentada en comparación con las plantas tipo silvestre.
7. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que además comprende cultivar una planta a partir de la semilla de la planta, en el que la adquisición de nutrientes; tolerancia a la sequía, metales, enfermedades y herbivoría, producción de fitohormonas, antibióticos, sideróforos o plaguicidas; promoción de la fijación biológica de nitrógeno; aumentan en la planta en comparación con el control no tratado.
8. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, e el que la planta se selecciona del grupo de *Graminae* (pastos), preferiblemente pastos de los géneros *Agropyron*, *Agrostis*, *Andropogon*, *Anthoxanthum*, *Arrhenatherum*, *Avena*, *Brachypodium*, *Bromus*, *Chloris*, *Cynodon*, *Dactylis*, *Elymus*, *Eragrostis*, *Festuca*, *Glyceria*, *Hierochloe*, *Hordeum*, *Lolium*, *Oryza*, *Panicum*, *Paspalum*, *Phalaris*, *Phleum*, *Poa*, *Setaria*, *Sorghum*, *Triticum*, *Zea*, especialmente *Zea mays*, maíz cultivado y teosinte, *Zea diploperennis* Iltis et at., diploperennial teosinte, *Zea luxurians* (Durieu et Asch.) Bird; y *Zea perennis* (Hitchc.) Reeves et Mangelsd., teosinte perenne y *Zoysia*; trigos, preferiblemente *Triticum monococcum*, *Triticum turgidum*, *Triticum timopheevi* (trigo de timofevi) y *Triticum aestivum* (trigo harinero); preferiblemente pastos de centeno y pasto azul, especialmente pasto azul de Kentucky, pasto azul de Canadá, pasto de pradera rugoso, pasto de pradera bulboso, pasto de pradera alpino, pasto de pradera ondulado, pasto de pradera de madera, pasto de pradera de Balforth, pasto de pradera de pantano, pasto de pradera de hoja ancha, pasto de pradera de hoja estrecha, pasto de pradera liso, pasto de pradera extendido y pasto de pradera aplanado; dicotiledóneas, preferiblemente eudicotiledóneas, especialmente tomate, sandía, calabaza, pepino, fresa, pimienta, soja, maní, Brassicaceae, especialmente colza, girasol, remolacha azucarera, algodón, alfalfa y arabidopsis.
9. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8, en el que la planta se selecciona del grupo de *Graminae*, preferiblemente pastos de los géneros *Agropyron*, *Agrostis*, *Andropogon*, *Anthoxanthum*, *Arrhenatherum*, *Avena*, *Brachypodium*, *Bromus*, *Chloris*, *Cynodon*, *Dactylis*, *Elymus*, *Eragrostis*, *Festuca*, *Glyceria*, *Hierochloe*, *Hordeum*, *Lolium*, *Oryza*, *Panicum*, *Paspalum*, *Phalaris*, *Phleum*, *Poa*, *Setaria*, *Sorghum*, *Triticum*, *Zea*, especialmente *Zea mays*, maíz cultivado y teosinte, *Zea diploperennis* Iltis et at., diploteosinte perenne, *Zea luxurians* (Durieu et Asch.) Bird; y *Zea perennis* (Hitchc.) Reeves et Mangelsd., teosinte perenne y *Zoysia*; trigos, preferiblemente *Triticum monococcum*, *Triticum turgidum*, *Triticum timopheevi* (trigo de Timofevi) y *Triticum aestivum* (trigo harinero).
10. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que la planta es una planta transgénica.
11. Preparación de semilla que se puede obtener por un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que las bacterias endófitas están presentes en el interior de la semilla.
12. Semillas que se pueden obtener por un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a

10, en el que las bacterias endófitas están presentes en el interior de la semilla.

13. Producto de semilla de planta comercializable que contiene al menos 100 g de semillas, preferiblemente al menos 1 kg de semillas, más preferido al menos 5 kg de semillas, especialmente al menos 10 kg de semillas, que se pueden obtener por un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que las bacterias endófitas están presentes en el interior de la semilla.
14. Preparación de semilla, semillas o producto de semilla de planta comercializable de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, en el que más de 30%, preferiblemente más de 40%, especialmente más de 50%, de las bacterias endófitas representan la cepa inoculante.
15. Preparación de semilla, semillas o producto de semilla de planta comercializable de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, en el que las bacterias endófitas están presentes en una densidad de población de 10^2 a 10^5 ufc/g de peso fresco.
16. Preparación de semilla, semillas o producto de semilla de planta comercializable de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 15, en el que la semilla se puede almacenar durante al menos 1 mes, preferiblemente durante al menos 3 meses, especialmente durante al menos 6 meses.
17. Preparación de semilla, semillas o producto de semilla de planta comercializable de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 16, en el que las semillas son semillas de maíz, trigo, cebada, pimiento o tomate.

Fig. 1

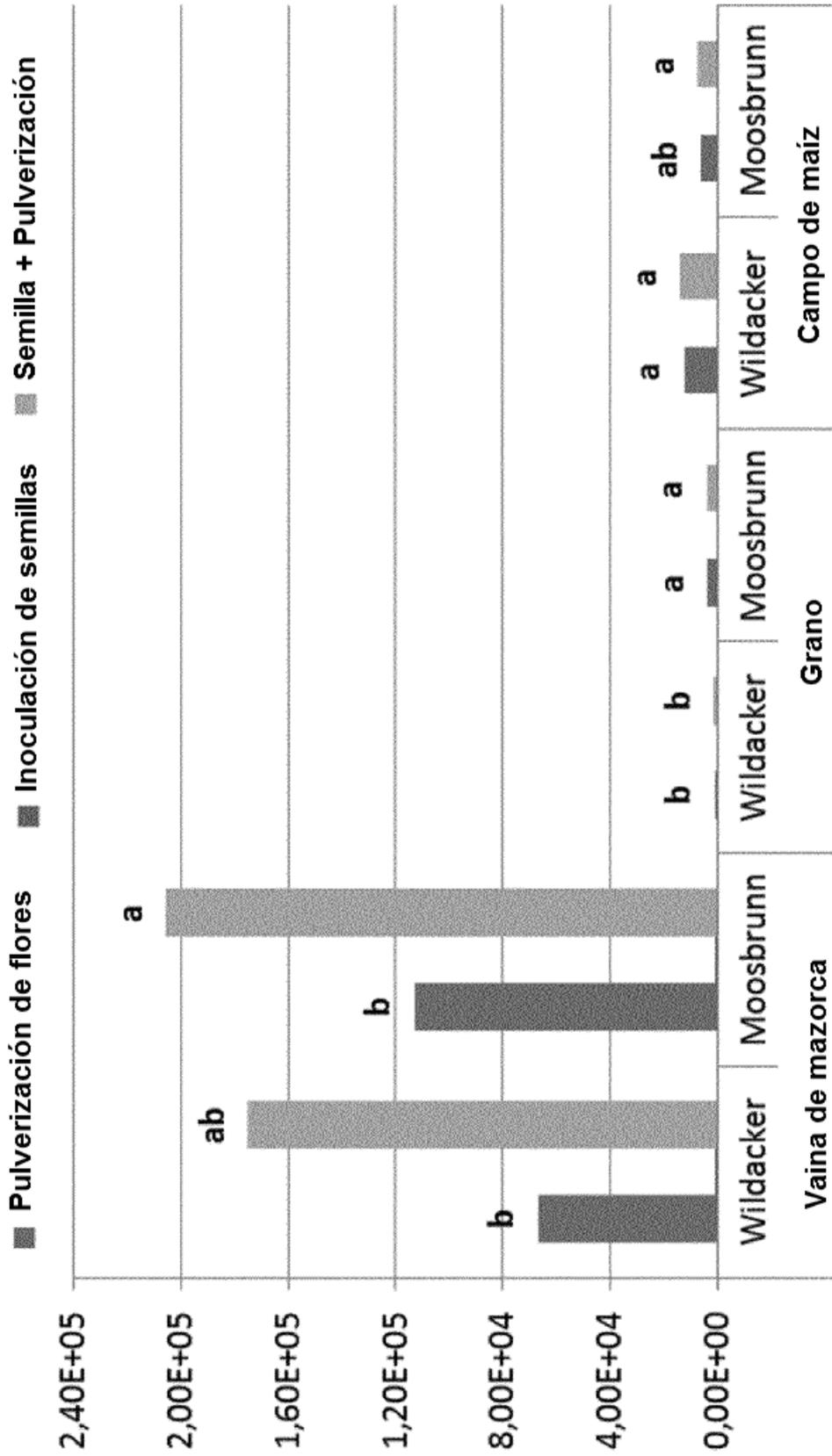


Fig. 2a

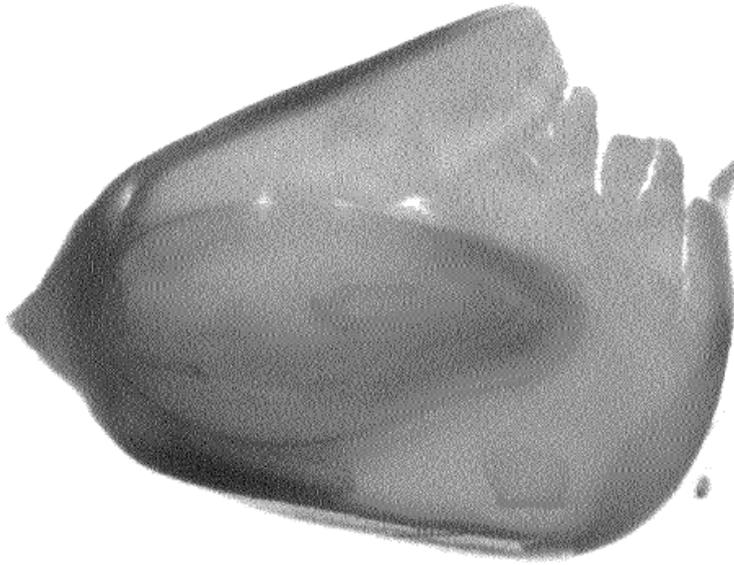


Fig. 2b

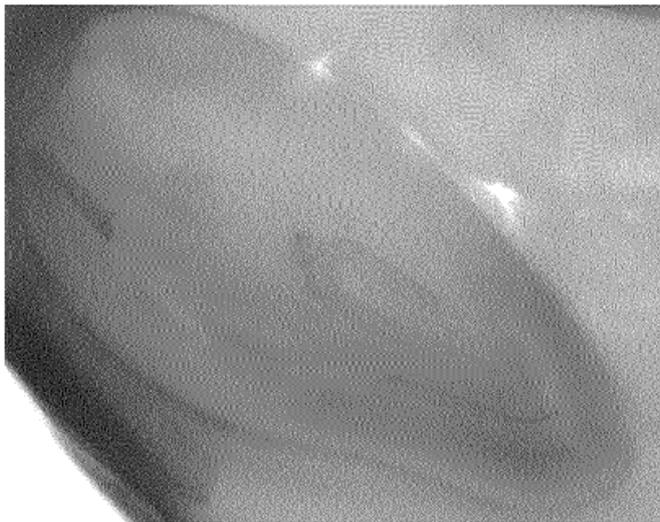
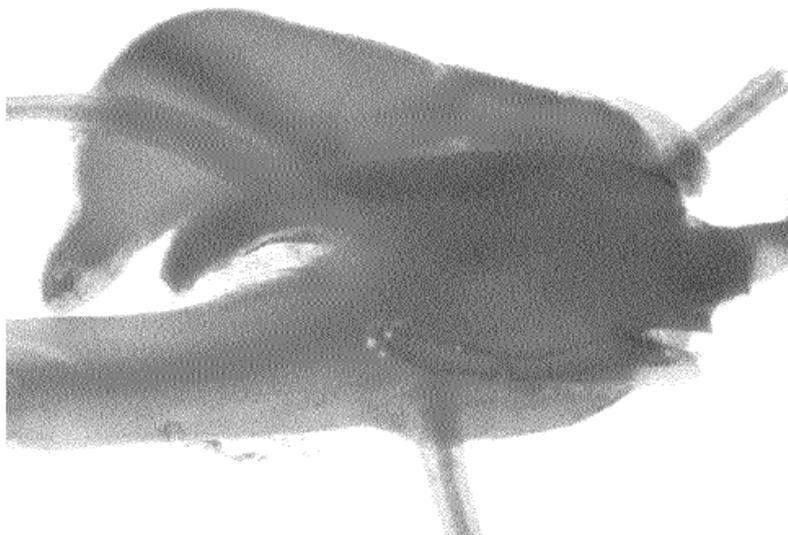


Fig. 2c



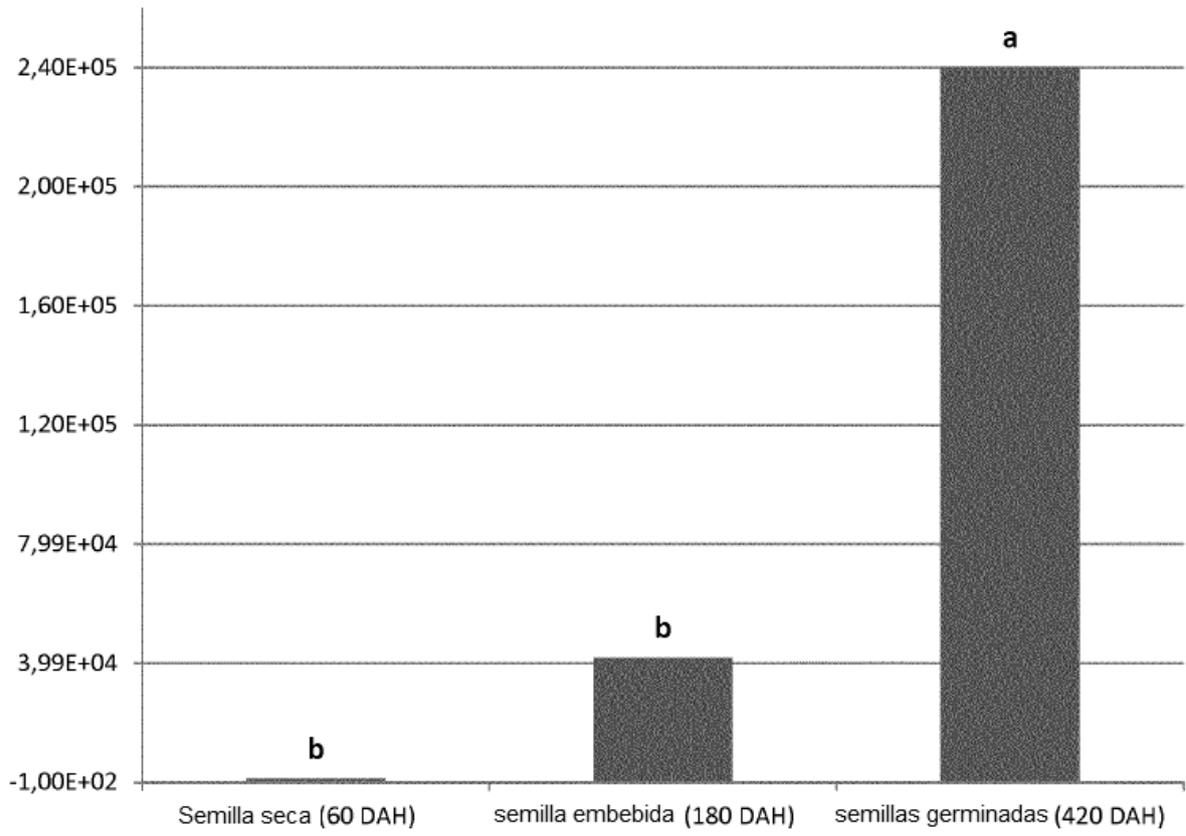


Fig. 3

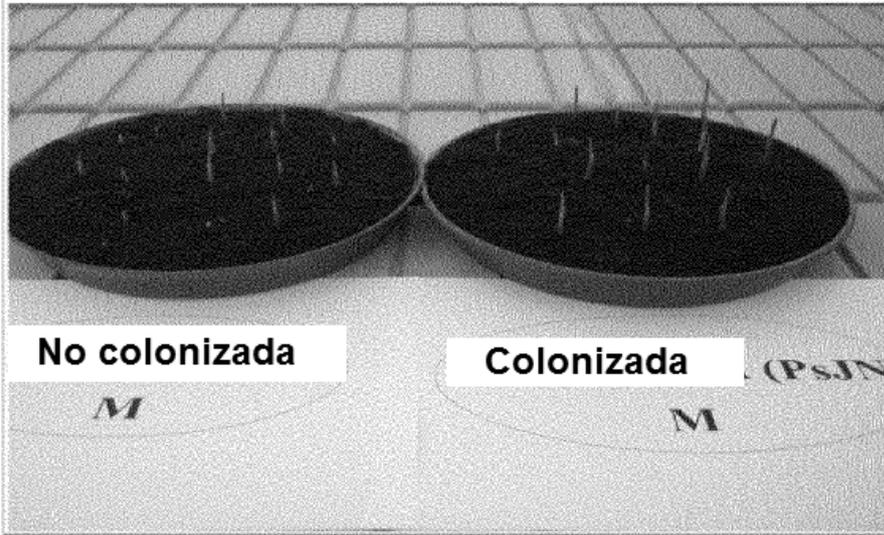


Fig. 4a

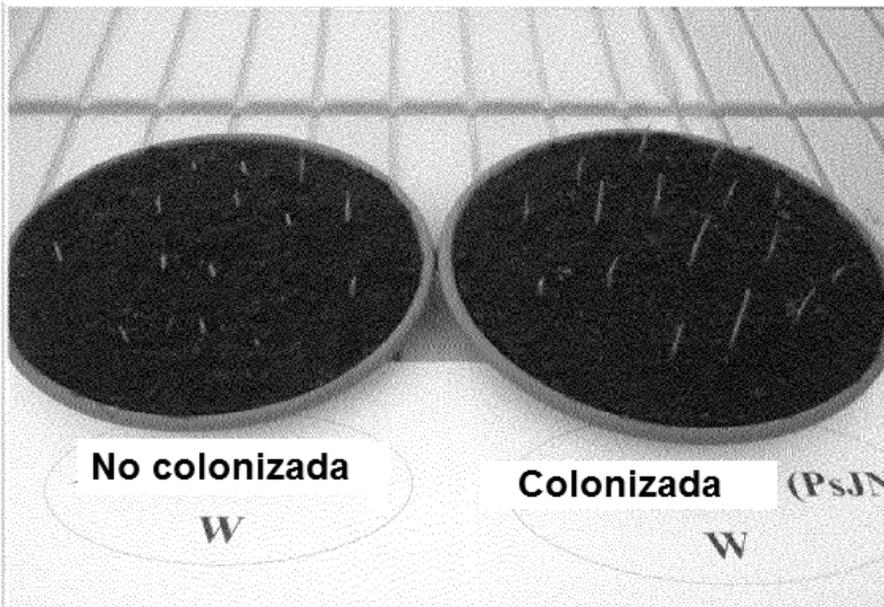


Fig. 4b

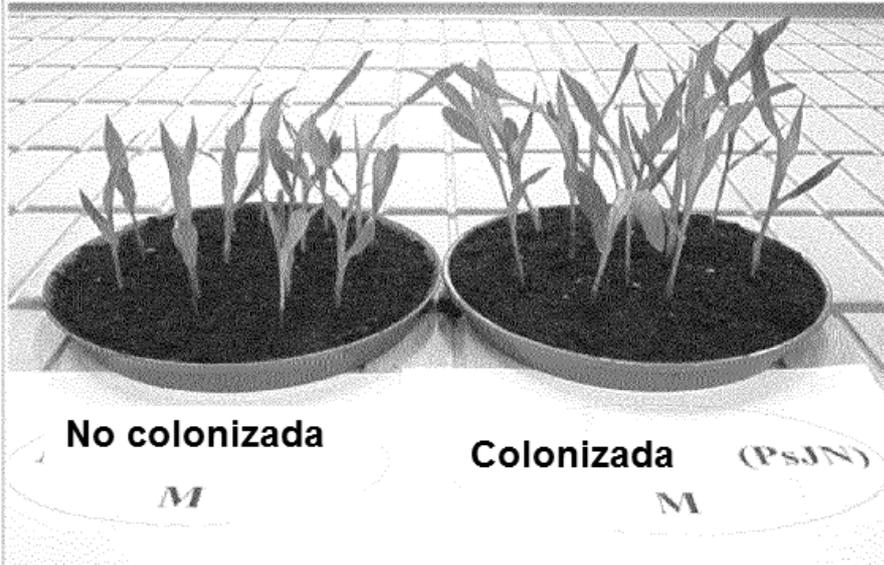


Fig. 4c



Fig. 5a



Fig. 5b



Fig. 5c



Fig. 6

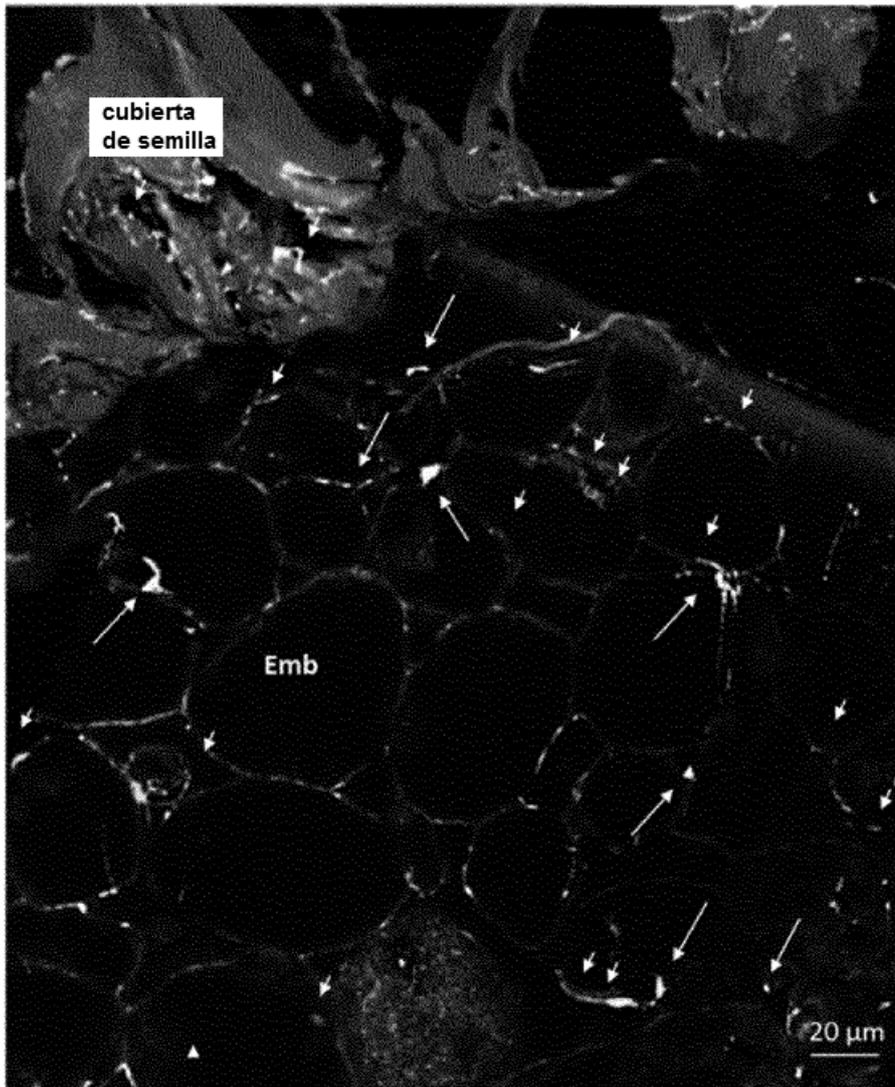


Fig. 7