

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 730 767**

51 Int. Cl.:

C05B 17/00 (2006.01)

C05F 11/08 (2006.01)

A01C 1/06 (2006.01)

A01N 63/04 (2006.01)

A01P 15/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.10.2009 E 16183156 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.03.2019 EP 3121158**

54 Título: **Métodos y composiciones para aumentar las cantidades de fósforo disponible para su absorción por las plantas a partir de los suelos**

30 Prioridad:

01.10.2008 EP 08165591

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

12.11.2019

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 730 767 T3

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

DESCRIPCIÓN

Métodos y composiciones para aumentar las cantidades de fósforo disponible para su absorción por las plantas a partir de los suelos

Referencia a un depósito de material biológico

[0001] Esta solicitud contiene una referencia a depósitos de material biológico, depósitos que se incorporan a la presente por referencia. Para información completa, véase las 2 últimas páginas de la descripción.

CAMPO DE LA INVENCIÓN

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

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

[0003] Para mantener un crecimiento saludable, las plantas deben extraer una variedad de elementos del suelo donde crecen. Estos elementos incluyen fósforo y los denominados micro-nutrientes (por ejemplo cobre, hierro y zinc), pero muchos suelos son deficitarios de tales elementos o los contienen solo en formas que no se pueden absorber fácilmente por las plantas (se cree generalmente que los elementos esenciales no se pueden absorber fácilmente por las plantas a menos que estén presentes en forma disuelta en el suelo).

[0004] Para contrarrestar tales deficiencias, es común aplicar fuentes de los elementos deficitarios a los suelos para mejorar los índices de crecimiento y los productos obtenidos de las plantas de cultivo. Por ejemplo, los fosfatos son frecuentemente añadidos al suelo para contrarrestar una falta del fósforo disponible.

El fosfato añadido al suelo como un fertilizante comercial (por ejemplo, fosfato de monoamonio o superfosfato triple) está fácilmente disponible para las plantas, pero en el suelo se convierte rápidamente en formas relativamente indisponibles. Se ha estimado que la planta solo usa del 10 al 30% del fertilizante de fosfato en el año en que se aplicó, y de un tercio a una mitad del fertilizante de fosfato aplicado puede no ser nunca recuperado por la planta.

[0005] Se ha intentado en el pasado usar microorganismos para mejorar la disponibilidad de elementos esenciales en sistemas de suelos. En particular se han utilizado especies del hongo *Penicillium* para este propósito.

US 5,026,417 describe una cepa aislada de *P. bilaiae* que es capaz de mejorar la absorción de fósforo por las plantas cuando se aplica al suelo. EP 0 284 236 A divulga un método y una composición para aumentar las cantidades de fósforo disponible para la absorción por las plantas del suelo que consisten en la introducción en el suelo de un inóculo de *Penicillium Bilaji*, en particular una cepa identificada como ATCC 20851.

A Pandey et al, World Journal of microbiology and Biotechnology, Kluwer Academic Publishers Co. vol 24, nº 5, junio de 2007, páginas 97-102; y Barroso et al, Applied Soil Ecology, Elsevier, Amsterdam NL, vol. 29, no. 1, mayo de 2005 páginas 73-83 divulgan que varias especies de *Penicillium* son útiles para solubilizar fósforo y hacerlo disponible para las plantas, en particular *P. rugulosum*, *P. radicum*, *P. pinophilum*, *P. citrinum*, *P. simplicissimus*, *P. griseofulvum* y *P. radicum*.

[0006] Todavía hay, sin embargo, una necesidad de sistemas para mejorar las condiciones de cultivo para las plantas, particularmente mediante el aumento de los niveles de fósforo disponible en los sistemas de suelo.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

[0007] La presente invención se basa en la constatación de que especies diferentes de *Penicillium*, que cuando se aplican solas pueden tener capacidad variable para mejorar la disponibilidad de fósforo tanto de fosfatos insolubles como de fertilizantes artificiales, pueden dar lugar cuando se combinan a un efecto sinérgico que traspasa lo que podría ser previsto a partir de los resultados individuales.

[0008] En particular, esto es cierto para especies de *Penicillium* de *P. bilaiae*.

[0009] La invención proporciona en un primer aspecto un método para aumentar la disponibilidad de fósforo para la absorción por la planta del suelo, este método comprende la introducción en el suelo de los inóculos de al menos dos cepas diferentes de *Penicillium* seleccionadas del grupo consistente en ATCC 18309, ATCC 20851, ATCC 22348, NRRL 50162, NRRL 50169 y NRRL 50170, para liberar fósforo para su absorción por las plantas a partir de una fuente seleccionada del grupo consistente en las fuentes presentes originalmente en el suelo, fuentes añadidas al suelo como modificaciones o combinaciones de estas, siempre que el

método no comprenda introducir en el suelo inóculos de las dos cepas del hongo *Penicillium* NRRL 50169 y NRRL 50162.

[0010] En un segundo aspecto, la invención se refiere a un método de mejora de las condiciones de cultivo de las plantas, que incluye el cultivo de las plantas en suelo que contiene, cerca de las raíces de la planta, tanto una fuente de fósforo como al menos dos cepas diferentes de *Penicillium* seleccionadas del grupo consistente en ATCC 18309, ATCC 20851, ATCC 22348, NRRL 50162, NRRL 50169 y NRRL 50170, siempre que el método no comprenda cultivar las plantas en un suelo que contenga, cerca de las raíces de las plantas, tanto una fuente de fósforo como las dos cepas del hongo *Penicillium* NRRL 50169 y NRRL 50162.

En un tercer aspecto, la invención se refiere a una composición para aplicación al suelo, que comprende: i) inóculos de al menos dos cepas diferentes de *Penicillium* seleccionadas del grupo consistente en ATCC 18309, ATCC 20851, ATCC 22348, NRRL 50162, NRRL 50169 y NRRL 50170; y ii) un portador compatible con el suelo, siempre que la composición no comprenda i) inóculos de las dos cepas del hongo *Penicillium* NRRL 50169 y NRRL 50162 y ii) un portador compatible con el suelo para el hongo.

En un siguiente aspecto, la invención se refiere a una semilla de planta que tiene un recubrimiento que comprende un portador compatible con el suelo e inóculos de al menos dos cepas diferentes de *Penicillium* seleccionadas del grupo consistente en ATCC 18309, ATCC 20851, ATCC 22348, NRRL 50162, NRRL 50169 y NRRL 50170, siempre que el recubrimiento no comprenda inóculos de las dos cepas del hongo *Penicillium*, *bilaiae* NRRL 50169 y NRRL 50162 y por lo tanto un portador compatible con el suelo sólido.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0011]

La Fig. 1 muestra el efecto de inoculación con microorganismos de solubilización de fosfato en el rendimiento de maíz. *P. bilaiae* (Novozymes P-201) corresponde a la cepa NRRL 50169, y *P. bilaiae* (Australia; P-208) corresponde a NRRL 50162.

La Fig. 2 muestra la solubilización de hidroxipatita en el cultivo líquido por las cepas de *P. bilaiae* individualmente y en combinación. Los números entre corchetes indican el índice de incubación (esporas por matraz).

La Fig. 3 muestra el efecto de la inoculación con microorganismos de solubilización de fosfato en el peso seco del brote de semilla de soja cultivada bajo condiciones ambiente de cultivo. *P. bilaiae* (Novozymes) corresponde a la cepa NRRL 50169, *P. bilaiae* (Australia) corresponde a NRRL 50162, y la mezcla de *P. bilaiae* corresponde a una mezcla 1:1 de las dos cepas.

La Fig. 4 muestra el efecto de la inoculación con microorganismos de solubilización de fosfato en peso seco del brote de maíz cultivado bajo condiciones ambiente de cultivo. *P. bilaiae* (Novozymes) corresponde a la cepa NRRL 50169, *P. bilaiae* (Australia) corresponde a NRRL 50162, y la mezcla de *P. bilaiae* corresponde a una mezcla 1:1 de las dos cepas.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0012] El hongo *Penicillium bilaiae* es un microorganismo conocido que ha sido depositado previamente en la American Type Culture Collection en Rockville, Md., EE.UU bajo el número de depósito ATCC 22348 (1974 edición del catálogo de ATCC). En el catálogo de 1984, el mismo número de depósito se usa para *P. bilaji* y otra cepa se identifica por el número de depósito 18309.

[0013] Otros aislados de este hongo han sido descubiertos en el suelo de una ubicación (latitud 49.grados. 48' N, longitud 113.grados. 6' W) en Southern Alberta, Canada. Se ha demostrado previamente que esta cepa mejora la actividad de solubilización de P en comparación con las cepas anteriores depositadas en el ATCC. Un depósito de esta cepa mejorada fue hecho en el ATCC bajo el número de depósito 20851 conforme a los términos del tratado de Budapest. En este depósito el hongo fue denominado *P. bilaji* y los detalles taxonómicos y su uso ha sido descrito en US 5,026,417. Esta cepa ha sido ahora redepositada como NRRL 50169. Para información completa del depósito ver última página de la descripción.

[0014] El nombre de esta especie ha sido nuevamente cambiado posteriormente y es ahora reconocido como *P. bilaiae*. Este nombre se usará en consecuencia en toda la especificación.

[0015] Un nuevo aislado de *P. bilaiae* ha sido descubierto en Australia. Fue originalmente aislado en 2002 a partir de raíces de trigo y cultivado en las muestras de suelo recogidas por Coonaplyn en Australia del Sur (Wakelin et al., 2004. Biol Fertl Soils 40:36-43). Un depósito de esta cepa mejorada fue hecho como depósito número NRRL 50162.

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

nombre de CSIRO.

[0016] Otras especies de *Penicillium* particularmente útiles según la presente invención son cepas de *P. Gaestrivorus*. Una cepa de ese tipo se aisló en 2012 a partir de raíces de trigo cultivado en muestras de suelo recogidas de New South Wales, Australia (Wakelin et al., 2004. Biol Fertil Soils 40:36-43), y se depositó como NRRL 50170. Para una información completa del depósito, véase la última página de la descripción.

[0017] Según un aspecto, la invención se refiere a un método de mejora de las condiciones de cultivo de las plantas, que comprende cultivar las plantas en suelo que contiene, cerca de las raíces de la planta, tanto una fuente de fósforo como al menos dos cepas del hongo *Penicillium*. En particular, el hongo *Penicillium* se selecciona de *P. Bilaiae* o *P. Gaestrivorus*. En particular, el crecimiento mejorado se proporciona mejorando la disponibilidad del fósforo para su absorción por las plantas a partir del suelo.

[0018] El uso de una combinación de al menos dos cepas de *Penicillium* diferentes tiene las ventajas siguientes.

Cuando se aplica a un suelo que ya contiene fosfatos insolubles (o difícilmente solubles), el uso de las cepas fúngicas combinadas dará lugar a un aumento en la cantidad de fósforo disponible para absorción por la planta en comparación con el uso de solo una cepa de *Penicillium*. Esto sucesivamente puede suponer un aumento en la absorción de fosfato y/o un aumento en el rendimiento de las plantas cultivadas en el suelo en comparación con el uso de cepas individuales solo. Si, por ejemplo, el fósforo no es un factor de limitación, un aumento del rendimiento puede no seguir necesariamente como resultado de la disponibilidad aumentada. La combinación de cepas también permite usar fosfatos de rocas insolubles como un fertilizante eficaz para suelos que tienen cantidades inadecuadas de fósforo disponible.

[0019] Según un aspecto, la invención se refiere por lo tanto a un método para aumentar la disponibilidad de fósforo para su absorción por las plantas a partir de los suelos, este método comprende la introducción en el suelo de los inóculos de al menos dos cepas diferentes de *Penicillium* seleccionadas del grupo consistente en ATCC 18309, ATCC 20851, ATCC 22348, NRRL 50162, NRRL 50169 y NRRL 50170, para liberar fósforo para su absorción por las plantas a partir de una fuente del mismo seleccionada del grupo consistente en fuentes presentes originalmente en el suelo, fuentes añadidas al suelo como modificaciones y combinaciones de estas, siempre que el método no comprenda introducir en el suelo inóculos de las dos cepas del hongo *Penicillium* NRRL 50169 y NRRL 50162.

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

[0020] Dicho fósforo se puede proporcionar de una fuente seleccionada del grupo consistente en fuentes originalmente presentes en el suelo, fuentes añadidas al suelo como modificaciones y combinaciones de las mismas.

[0021] El término "inóculo" como se usa en esta especificación se destina a significar cualquier forma de células fúngicas, micelio o esporas, que es capaz de propagarse sobre o en la tierra cuando las condiciones de temperatura, humedad, etc., son favorables para el crecimiento fúngico.

[0022] Por "fuente" de un elemento particular queremos decir un compuesto de este elemento que, al menos en las condiciones de suelo en consideración, no hace que el elemento esté completamente disponible para la absorción de la planta.

[0023] En particular, el hongo *Penicillium* se selecciona del grupo que consiste en *P. bilaiae*, *P. albidum*, *P. aurantiogriseum*, *P. chrysogenum*, *P. citreonigrum*, *P. citrinum*, *P. digitatum*, *P. frequentas*, *P. fuscum*, *P. gaestrivorus*, *P. glabrum*, *P. griseofulvum*, *P. implicatum*, *P. janthinellum*, *P. lilacinum*, *P. minioluteum*, *P. montanense*, *P. nigricans*, *P. oxalicum*, *P. pinetorum*, *P. pinophilum*, *P. purpurogenum*, *P. radicans*, *P. radicum*, *P. raistrickii*, *P. rugulosum*, *P. simplicissimum*, *P. solitum*, *P. variabile*, *P. velutinum*, *P. viridicatum*, *P. glaucum*, *P. fussiporus* y *P. Expansum*.

[0024] En una forma de realización particular, la especie de *Penicillium* es *P. bilaiae*. En otra forma de realización particular, la especie de *Penicillium* es *P. gaestrivorus*. En una forma de realización particular adicional, las al menos dos cepas son una cepa de *P. bilaiae* y una cepa de *P. gaestrivorus*.

[0025] En otra forma de realización particular, las cepas de *P. bilaiae* se seleccionan del grupo que consiste en ATCC 20851, NRRL 50169, ATCC 22348, ATCC 18309, NRRL 50162. En una forma de realización adicional más, las al menos dos cepas son NRRL 50169 y NRRL 50170.

[0026] En otra forma de realización adicional, las al menos dos cepas son NRRL 50162 y NRRL 50170.

[0027] El hongo *Penicillium* según la invención y en particular las cepas específicas ATCC20854, NRRL 50169, NRRL 50170 y NRRL 50162 se pueden cultivar usando la fermentación en estado sólido o líquido y

una fuente de carbono adecuada. Los aislados de *Penicillium* se pueden cultivar utilizando cualquier método adecuado conocido por el experto en la técnica. Por ejemplo, el hongo se puede cultivar en un medio de cultivo sólido tal como agar de dextrosa y patata o agar de extracto de malta, o en matraces que contienen medios líquidos adecuados tal como medio Czapek-Dox o caldo de dextrosa y patata. Estos métodos de cultivo se pueden utilizar en la preparación de un inóculo de *Penicillium spp.* para el revestimiento de semillas y/o aplicación al portador para aplicarse al suelo.

[0028] La producción de estado sólido de esporas de *Penicillium* se puede conseguir mediante la inoculación de un medio sólido tal como una turba o sustrato a base de vermiculita, o granos incluyendo, pero sin limitarse a, avena, trigo, cebada, o arroz. El medio esterilizado (conseguido a través de autoclave o irradiación) se inocula con una suspensión de esporas (1×10^2 - 1×10^7 cfu / ml) de la especie de *Penicillium* apropiada y la humedad se ajusta del 20 al 50%, dependiendo del sustrato.

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

Las esporas también se pueden producir por fermentación líquida (Cunningham et al., 1990. Can J Bot 68:2270-2274). La producción líquida se puede conseguir por el cultivo del hongo en cualquier medio adecuado, tal como caldo de dextrosa y patata o medios de extracto de levadura de sacarosa, bajo pH apropiado y condiciones de temperatura (como podrían ser realizados por un experto en la técnica).

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

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

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

Alternativamente, una suspensión de esporas de la *Penicillium spp.* apropiada se puede aplicar a un portador compatible con el suelo adecuado (por ejemplo, polvo a base de turba o gránulo) hasta un contenido de humedad final apropiado.

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

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

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

[0031] En una forma de realización dicha fuente es fosforita. En otra forma de realización dicha fuente es un fertilizante artificial.

[0032] Los fertilizantes de fosfato artificiales disponibles comercialmente son de muchos tipos. Algunos comunes son aquellos que contienen fosfato de monoamonio (MAP), superfosfato triple (TSP), fosfato de diamonio, superfosfato ordinario y polifosfato de amonio. Todos estos fertilizantes se producen por la elaboración química de fosfatos de roca natural insolubles en las instalaciones de fabricación de abono a gran escala y el producto es costoso. Mediante la presente invención es posible reducir la cantidad de estos fertilizantes aplicados al suelo mientras se sigue manteniendo la misma cantidad de absorción de fósforo del suelo.

[0033] En otra forma de realización particular la fuente o fósforo es orgánico. Un fertilizante orgánico se refiere a una modificación del suelo derivado de fuentes naturales que garantiza, al menos, los porcentajes mínimos de nitrógeno, fosfato, y potasa. Los ejemplos incluyen productos derivados de plantas y animales, polvos de roca, alga, inoculantes, y acondicionadores. Estos están disponibles frecuentemente en centros de jardinería y a través de compañías de suministro hortícola. En particular, dicha fuente orgánica de fósforo es harina de huesos, harina de carne, estiércol animal, compost, lodo residual, o guano.

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

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

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

5 [0036] La cantidad del inóculo que se debe aplicar al suelo no está limitada en ningún aspecto particular. Claramente, si se usa una cantidad insuficiente, no se obtendrá un efecto perceptible. Por otro lado, el uso de cantidades grandes del inóculo será excesivo debido a que las cantidades de fósforo y/o micronutrientes hechos disponibles en la tierra alcanzan un máximo a un cierto índice de aplicación y otras adiciones más allá de este índice no dan beneficios adicionales. Los índices de aplicación adecuados varían según el tipo de
10 suelo, el tipo de plantas de cultivo, las cantidades de la fuente de fósforo y/o los micronutrientes presentes en el suelo o añadidos al mismo, etc. y un índice adecuado puede ser encontrado sin dificultad por experimentos de tanteo simples para cada caso particular. Normalmente, el índice de aplicación cae en la gama de 0.001-1.0 Kg esporas fúngicas y micelio (peso fresco) por hectárea, o 10^2 - 10^6 unidades formadoras de colonias (cfu) por semilla (cuando se usan semillas recubiertas), o en un portador granuloso aplicando entre 1×10^6 y
15 1×10^{11} unidades formadoras de colonias por hectárea. Aunque los inóculos usados según la presente invención están compuestos de una mezcla/combinación de inóculos de al menos dos cepas diferentes de *Penicillium* es a la cantidad total de esporas o unidades formadoras de colonias en la mezcla combinada a la que se hace referencia en toda la especificación.

20 [0037] Las células fúngicas en forma de, por ejemplo, esporas y opcionalmente un portador se pueden añadir a una fila de semillas del suelo a nivel de la raíz o pueden utilizarse para revestir semillas antes de la siembra. Cuando las esporas se agregan a la tierra, será preferible una formulación granulosa. Formulaciones como líquido, turba, o polvo humedecible serán adecuadas para el revestimiento de semillas. Cuando se usa para revestir semillas, el material puede mezclarse con agua, aplicarse a las semillas y dejarse secar.

[0038] Otros portadores para las esporas pueden utilizarse para revestir semillas. Por ejemplo, las esporas se pueden hacer cultivar en salvado humedecido, secar, tamizar y aplicar a semillas previamente recubiertas con un adhesivo, por ejemplo goma arábica.

30 [0039] El portador debería ser preferiblemente un portador compatible con el suelo. El término "compatible con el suelo" significa cualquier material que se puede añadir al suelo sin que tenga un efecto adverso en el crecimiento de las plantas, estructura del suelo, drenaje del suelo o similar. Los portadores adecuados comprenden, pero de forma no limitativa, paja de trigo, salvado, paja de trigo molida, polvos a base de turba o gránulos, gránulos a base de yeso, y arcillas (por ejemplo, caolín, bentonita, montmorillonita).

[0040] En otro aspecto, la presente invención se refiere a una composición que comprende al menos dos cepas del hongo *Penicillium* según la invención, y un portador. Los portadores adecuados incluyen agua, soluciones acuosas, suspensiones acuosas, sólidos (por ejemplo turba, trigo, salvado, vermiculita, y tierra
40 pasteurizada) o polvos secos.

[0041] La composición según la invención puede aplicarse adecuadamente en el método de la invención para aumentar la disponibilidad de fósforo para la absorción por las plantas a partir de los suelos.

45 [0042] En una forma de realización particular, las al menos dos cepas de *Penicillium* comprendidas en la composición se seleccionan del grupo que consiste en *Penicillium bilaiae* y *Penicillium gaestrivorus*. Más particularmente, las cepas de *Penicillium* se seleccionan del grupo que consiste en NRRL 50169, NRRL 50162, NRRL 50170. En una forma de realización específica adicional, las dos cepas son NRRL 50162 y NRRL 50170.

50 [0043] Particularmente, el portador puede en una forma de realización comprender un líquido con un nutriente para el hongo.

[0044] En otra forma de realización, la presente invención se refiere a una semilla de planta que tiene un recubrimiento que comprende inóculos de al menos dos cepas del hongo *Penicillium*, en particular, *P. bilaiae* y/o *P. gaestrivorus*, y por lo tanto un portador sólido compatible con el suelo. Más particularmente, las cepas de *Penicillium* se seleccionan del grupo que consiste en NRRL 50169, NRRL 50162, NRRL 50170. En otra forma de realización, las dos cepas son NRRL 50162 y NRRL 50170.

60 [0045] La composición puede contener aditivos adicionales incluyendo agentes tampón, agentes humectantes, agentes de recubrimiento, y agentes de abrasión.

[0046] Los métodos según la invención son útiles potencialmente para mejorar las condiciones del cultivo que resultan en un aumento de la absorción y/o rendimiento de fósforo para cualquier tipo de planta.

65 En una forma de realización particular, la planta se selecciona del grupo consistente en cereales, legumbres, *Brassica* spp., frutas, verduras, frutos secos, flores, y turba. Particularmente, los cereales son trigo, maíz,

arroz, avena, centeno, cebada. Particularmente, las legumbres son lenteja, garbanzos, alubias, semillas de soja, guisantes, y alfalfa.

[0047] En otra forma de realización particular las plantas son seleccionadas del grupo consistente en alfalfa, arroz, trigo, cebada, centeno, avena, algodón, girasol, cacahuete, maíz, patata, batata, judía, guisante, garbanzos, lenteja, achicoria, lechuga, endibia, repollo, coles de Bruselas, remolacha, chirivía, nabo, coliflor, brécol, nabo, rábano, espinaca, cebolla, ajo, berenjena, pimienta, apio, zanahoria, calabacín, calabaza, zapallo, pepino, manzana, pera, melón, cítrico, fresa, uva, frambuesa, piña, semilla de soja, tabaco, tomate, sorgo, y caña de azúcar.

EJEMPLOS

Ejemplo 1. Caracterización de aislados

[0048] El análisis genético de la región D2 de 28S ADNr ha confirmado que las dos cepas ATCC 20851 (cepa P-201; igual que NRRL 50169) y NRRL 50162 (cepa P-208) son *P. bilaiae*, con trabajo adicional en CSIRO (Australia) que demuestra que son cepas diferentes. Se secuenciaron cepas de *P. bilaiae* por MIDI Labs en Newark, DE usando cebadores universales a la región D2 del gen de ADNr 28S.

Se realizaron cálculos de comparación filogenética utilizando el programa CLUSTAX para alinear la secuencia con otras especies cercanamente relacionadas indicadas por un análisis BLAST inicial de la secuencia.

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

Toda alineación y operaciones filogenéticas relacionadas se hicieron en Mega 4.0. Las secuencias se importaron en Alignment Explorer en Mega, y luego se alinearon usando ClustalW. Un árbol filogenético se construyó usando bootstrapping para probar la robustez.

[0049] Identificaciones de las dos cepas se confirmaron como *Penicillium bilaiae* según la clasificación siguiente:

Reino	Hongos
Subreino	Dikarya
Filo	Ascomycota
Subfilo	Pezizomycotina
Clase	Eurotiomycetes
Subclase	Eurotiomycetidae
Orden	Eurotiales
Familia	Trichocomaceae
Subfamilia	Trichocomaceae mitospórico (anamórfico)
Género	Penicillium
Especie	bilaiae

Ejemplo 2. Ensayos de campo del tratamiento de combinación (no forman parte de la invención)

[0050] Se establecieron ensayos de campo en 2007 en cuatro lugares de EE.UU para filtrar el efecto de la inoculación con cepas de solubilización de fosfato de *P. bilaiae* en el rendimiento cosechado de maíz. Los tratamientos incluyeron dos cepas de *P. bilaiae* individualmente y en combinación al igual que un control no inoculado. Los ensayos se establecieron en cuatro lugares de EE.UU como bloques completos aleatorizados con 6 réplicas por ensayo. Los ensayos de EE.UU los llevaron a cabo cuatro empresas de investigación independientes que cubrieron cuatro estados de EE.UU. Los proveedores y lugares de la investigación fueron Viger Ag Research (Fergus Falls, MN), Benson Research (York, NE), Northern Plains Ag (Gardner, ND), y South Dakota Ag Research (Centerville, SD). El ensayo estaba compuesto por cuatro tratamientos que incluyeron dos tratamientos de la única cepa de *Penicillium* NRRL 50169 (cepa P-201 de Novozymes) y NRRL 50162 (cepa P-208 de Australia), un tratamiento de cepa doble, y un control no inoculado. Todas las cepas de *Penicillium* fueron formuladas como gránulos de turba.

[0051] La producción de gránulos de turba fue conseguida por la inoculación del sustrato con una suspensión de esporas líquida. Los cultivos de *Penicillium* se sacaron del almacenamiento a -80 °C y se cultivaron en agar de dextrosa y patata. Se recogieron esporas usando una varilla de vidrio para raspar la superficie de un cultivo de esporulación (obtenido después dos semanas de incubación a temperatura ambiente) en agua esterilizada modificada con 0.1 % v/v de Tween 80. La suspensión de esporas de la *Penicillium* spp. apropiada se añadió a gránulos de turba, que fueron luego mezclados íntegramente para conseguir una inoculación constante, almacenados en bolsas de papel revestidas de plástico, e incubados durante 2 a 8 semanas a temperatura ambiente (aproximadamente 22 a 27 °C). Se tomaron muestras de las bolsas y se analizaron de forma aleatoria para aproximar las unidades formadoras de colonias fúngicas a cada grupo de gránulos inoculados.

Brevemente, se realizó una serie de dilución utilizando agua estéril modificada con 0.1% v/v de Tween 80. Partes alícuotas de las diluciones se colocaron en placas en el agar de dextrosa y patata suplementado con Rosa de Bengala y clorotetraciclina. Las colonias fúngicas se contaron después de 3 a 5 días de incubación a aproximadamente 25 °C. Para tratamientos de combinación, se mezclaron gránulos inoculados para conseguir una mezcla 1:1 de los aislados de *P. bilaiae* por título.

[0052] El establecimiento de una parcela de campo fue específico para cada sitio (ver tabla 1). El espaciado de fila de semilla fue 30 pulgadas, con 2 filas de maíz por parcela más dos filas de dispositivo de seguridad. La fertilización incluyó un programa de fertilidad de nitrógeno estándar (sitio específico), más 10 kg ha⁻¹ P₂O₅ aplicado con la semilla. Cepas de *Penicillium* fueron formuladas como gránulos de turba y aplicadas en el surco a razón de 4.5 kg ha⁻¹ (2.07 a 2.17E+10 unidades formadoras de colonias ha⁻¹).

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

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

[0053] El análisis del ensayo combinado muestra un rendimiento del maíz significativamente más alto en el tratamiento de combinación de *P. bilaiae* en comparación con el control no inoculado (figura 1). La combinación de *P. bilaiae* produjo en exceso cualquiera de las cepas de *P. bilaiae* cuando se usaron como un tratamiento separado. La combinación de cepas de *P. bilaiae* fue el tratamiento más impactante en el rendimiento de maíz en estos estudios.

Ejemplo 3. Solubilización de fosfatos insolubles

[0054] Se han incluido cepas de solubilización de fosfato de *P. bilaiae* en experimentos de laboratorio que examinan la capacidad de estos organismos para solubilizar fosfatos de calcio insolubles. El experimento consistió en dos cepas de *P. bilaiae* individualmente y en la combinación en dos concentraciones diferentes, al igual que un control no inoculado.

[0055] Se pesó hidroxiapatita en matraces de Erlenmeyer de 300-mL a razón de 100 mg de P por matraz. Se prepararon medios de sales mínimas de la siguiente manera (g L⁻¹): 0.1 NaCl, 0.4 NH₄Cl, 0.78 KNO₃, 0.1 CaCl₂·2H₂O, 1.0 MgSO₄·7H₂O, 10.0 sacarosa. 100 mL de medio se añadió a cada matraz, y los matraces se taparon con un tapón de espuma y se sometieron a autoclave (121 °C y 1.2 atm durante 30 min). Se inocularon matraces triples con caldos de esporas líquidos a un índice de inoculación objetivo de 4.00E+06 esporas por matraz. Para los tratamientos de combinación de *P. bilaiae*, los matraces fueron inoculados bien con 4.00E+06 esporas de cada cepa por matraz, o a una concentración de espora total de 4.00E+06 esporas por matraz (es decir, 2.00E+06 esporas por matraz de cada cepa). Los matraces fueron incubados a temperatura ambiente en una coctelera giratoria ajustada a 175 r.p.m. Se recogieron submuestras asépticamente a 3, 5, 7, y 10 días después de la inoculación y se analizaron para detectar fosfato soluble utilizando un método con verde de malaquita.

[0056] La combinación de cepas de *P. bilaiae* fue capaz de solubilizar significativamente más hidroxiapatita que cualquier cepa sola, como se indica por los niveles de fosfato soluble aumentados, cuyo índice de inoculación tiene poco o ningún efecto (figura 2).

Ejemplo 4. Ensayos en cámaras de cultivo del tratamiento de combinación (no forma parte de la invención)

[0057] Se establecieron ensayos en cámaras de cultivo en 2009 para filtrar el efecto de la inoculación con cepas de solubilización de fosfato de *P. bilaiae* en la acumulación de sustancia seca de semilla de soja y maíz.

Los tratamientos incluyeron dos cepas de *P. bilaiae* individualmente y en combinación al igual que un control no inoculado.

[0058] Los ensayos se establecieron como factoriales aleatorizados con 8 réplicas por ensayo. Los dos factores fueron fertilizante de fosfato e inoculante. Los niveles de fertilizante fueron equivalentes a 0, 20, 40, y 80 lb P₂O₅ ac⁻¹ para semilla de soja, y 0, 40, 80, y 160 lb P₂O₅ ac⁻¹ para maíz. Los tratamientos con inoculante estaban compuestos por un control no inoculado, dos tratamientos de la cepa única de *Penicillium* [NRRL 50169 (cepa P-201 de Novozymes) y NRRL 50162 (cepa P-208 de

Australia)], y un tratamiento de cepa doble implicando cantidades iguales de ambas cepas de *Penicillium*.

[0059] Se marcaron tarros de plástico según el tratamiento y un cuadrado estéril de tejido liso negro se colocó en el fondo de cada uno para evitar que la mezcla de los tarros se filtrara a través de los agujeros de drenaje. Los tarros se llenaron con una mezcla 1:1 de arena de cuarzo industrial y vermiculita molida fina. Cada tarro fue tratado con el índice apropiado de suspensión de fosfato preparada usando hidroxipatita, se selló dentro de una bolsa Ziploc, y se dejó equilibrar durante 7 días antes de su siembra.

[0060] Se aplicaron tratamientos con inoculantes como un tratamiento de semilla líquida.

Se sacaron cultivos de *Penicillium* del almacenamiento a -80 °C y se cultivaron en agar de dextrosa y patata. Se recogieron usando una varilla de vidrio para raspar la superficie de un cultivo de esporulación (obtenido después de dos semanas de incubación a temperatura ambiente) en agua esterilizada modificada con 0.1% v/v Tween 80.

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

Para tratamientos de combinación, una mezcla 1:1 de aislados de *P. bilaiae* fue conseguida reduciendo a la mitad el volumen de suspensión de esporas requerido para alcanzar el índice de inoculación objetivo para cada cepa (es decir, el índice de inoculación final se mantuvo 1.50E+05). Los tratamientos de control no inoculados fueron tratados con agua esterilizada. Las bolsas de plástico fueron selladas y agitadas enérgicamente durante 1 a 2 min para revestir uniformemente las semillas. Las bolsas fueron reabiertas, y las semillas se dejaron secar durante 20 a 30 min antes de la siembra.

[0061] Se plantaron semillas de soja y semillas de maíz a razón de 5 por tarro. La solución de nutriente sin fosfato se añadió a los tarros en el momento de la siembra, y cada dos semanas para la duración del experimento.

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

Los tarros fueron reducidos a tres semillas una a dos semanas después de la siembra.

Las plantas fueron cosechadas aproximadamente 7 y 6 semanas después de la siembra para semilla de soja y maíz, respectivamente. Los brotes se retiraron por encima de la línea de tierra, se colocaron dentro de bolsas de papel prepesadas, y se secaron durante 10 d a 72 °C para determinar el peso del brote seco.

[0062] A través de todos los niveles fertilizantes, la semilla de soja mostró mayor acumulación de sustancia seca de brote en el tratamiento de la mezcla de *P. bilaiae* en comparación con el control no inoculado (figura 3).

El tratamiento de la mezcla de *P. bilaiae* también se realizó mejor que cualquiera de las cepas de *P. bilaiae* solas.

[0063] El maíz mostró mayor acumulación de sustancia seca de brote en el tratamiento de la mezcla de *P. bilaiae* que el control no inoculado para todos los niveles fertilizantes (figura 4). El tratamiento de combinación de *P. bilaiae* también se realizó mejor que cualquiera de las cepas de *P. bilaiae* solas en los índices de fertilizante 40 y 80 lb P₂O₅ ac-1.

Depósito de Material biológico

[0064]

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

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

[0065] El siguiente material biológico ha sido depositado según las condiciones del tratado de Budapest con la Agricultural Research Service Patent Culture Collection, (NRRL) Northern Regional Research Center, 1815 N. University Street, Peoria, Illinois, 61604, USA, y se le dio el número de acceso:

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

[0066] El siguiente material biológico ha sido depositado según las condiciones del tBudapest Treaty with Agricultural Research Service Patent Culture Collection (NRRL), Northern Regional Research Center, 1815 N. University Street, Peoria, Illinois, 61604, USA y se le dio el siguiente número de acceso:

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

[0067] Las cepas han sido depositadas bajo condiciones que aseguran que el acceso al cultivo esté disponible durante la pendency de esta solicitud de patente para quienes tengan derecho según determinen las leyes de patentes extranjeras. El depósito representa un cultivo sustancialmente puro de la cepa depositada.

5

El depósito está disponible según lo establezcan las leyes de patentes extranjeras en países en los que se soliciten duplicados de la solicitud en cuestión, o patentes de la misma familia.

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

10

REIVINDICACIONES

1. Método para aumentar la disponibilidad de fósforo para su absorción por las plantas a partir del suelo, método que comprende la introducción en el suelo de inóculos de al menos dos cepas diferentes de *Penicillium* seleccionadas del grupo que consiste en ATCC 18309, ATCC 20851, ATCC 22348, NRRL 50162, NRRL 50169 y NRRL 50170, para liberar fósforo para su absorción por las plantas a partir de una fuente de este seleccionada del grupo que consiste en las fuentes presentes originalmente en el suelo, fuentes agregadas al suelo como modificaciones y combinaciones de las mismas, siempre que el método no incluya la introducción en el suelo de inóculos de las dos cepas del hongo *Penicillium* NRRL 50169 y NRRL 50162.
2. Método según la reivindicación 1, donde dicha fuente de fósforo comprende una fuente de fósforo nativa a dicho suelo.
3. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde dicha fuente de fósforo comprende una fuente de fósforo añadida a dicho suelo como modificación, opcionalmente una fosforita y/o un fertilizante artificial.
4. Método según la reivindicación 3, donde dicha modificación es un fertilizante artificial seleccionado del grupo consistente en fosfato de monoamonio, superfosfato triple, fosfato de diamonio, superfosfato ordinario y polifosfato de amonio.
5. Método según la reivindicación 3, donde dicha modificación es orgánica.
6. Método según la reivindicación 5, donde dicha fuente orgánica de fósforo es de harina de huesos, harina de carne, estiércol animal, compost, lodo residual, o guano.
7. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde dichos inóculos se agregan al suelo en una cantidad de 10^6 a 10^{11} unidades formadoras de colonias por hectárea.
8. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde dichos inóculos se introducen como un recubrimiento de semillas que comprenden 10^1 - 10^8 , más preferiblemente 10^2 - 10^6 unidades formadoras de colonias por semilla.
9. Método de mejora de las condiciones de cultivo de plantas, que comprende el cultivo de las plantas en suelo que contiene, en proximidad a las raíces de la planta, tanto una fuente de fósforo como al menos dos cepas de *Penicillium* seleccionadas del grupo que consiste en ATCC 18309, ATCC 20851, ATCC 22348, NRRL 50162, NRRL 50169 y NRRL 50170, siempre que el método no incluya el cultivo de las plantas en un suelo que contenga, cerca de las raíces de la planta, una fuente de fósforo y las dos cepas del hongo *Penicillium* NRRL 50169 y NRRL 50162.
10. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde dichas al menos diferentes cepas de *Penicillium* comprenden al menos dos de NRRL 50162, NRRL 50169 y NRRL 50170.
11. Composición para su aplicación al suelo, que comprende:
 - i) inóculos de al menos dos cepas diferentes de *Penicillium* seleccionadas del grupo que consiste en ATCC 18309, ATCC 20851, ATCC 22348, NRRL 50162, NRRL 50169 y NRRL 50170; y ii) un portador compatible con el suelo, siempre que la composición no comprenda i) inóculos de las dos cepas del hongo *Penicillium* NRRL 50169 y NRRL 50162 y ii) un portador compatible con el suelo para el hongo.
12. Composición según la reivindicación 11, donde dichas al menos diferentes cepas de *Penicillium* comprenden al menos dos de NRRL 50162, NRRL 50169 y NRRL 50170.
13. Composición según la reivindicación 11 o la reivindicación 12, en forma de un recubrimiento para semillas de plantas.
14. Semilla de planta que tiene un recubrimiento que comprende un portador compatible con el suelo e inóculos de al menos dos cepas diferentes de *Penicillium* seleccionadas del grupo que consiste en ATCC 18309, ATCC 20851, ATCC 22348, NRRL 50162, NRRL 50169 y NRRL 50170, siempre que el recubrimiento no comprenda inóculos de las dos cepas del hongo *Penicillium* NRRL 50169 y NRRL 50162 y, por lo tanto, un portador sólido compatible con el suelo.
15. Semilla de planta según la reivindicación 14, donde dichas al menos dos cepas diferentes de *Penicillium* comprenden al menos dos de NRRL 50162, NRRL 50169 y NRRL 50170.

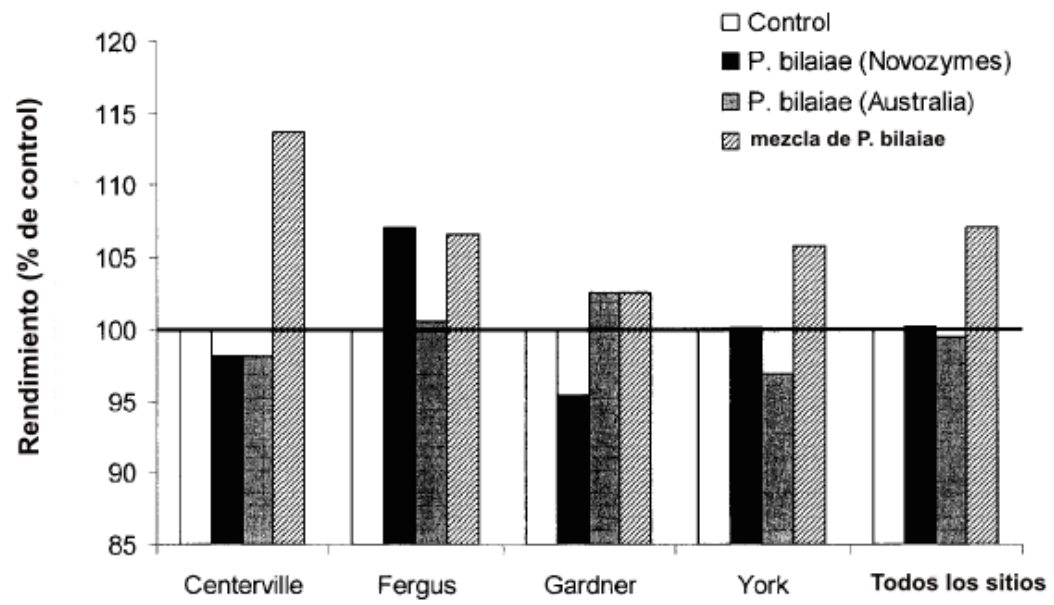


Figura 1

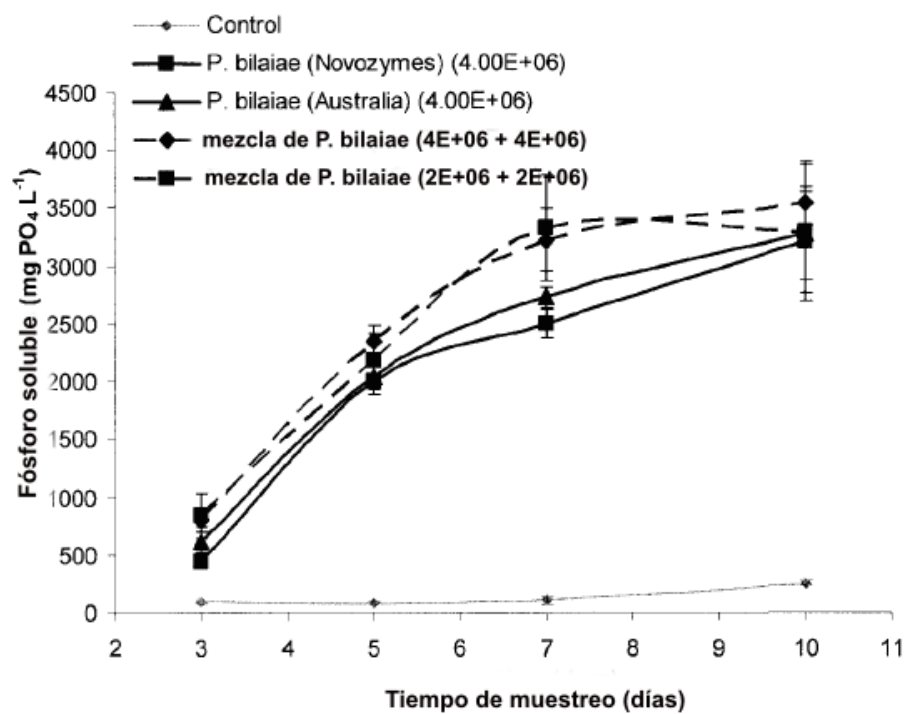


Figura 2

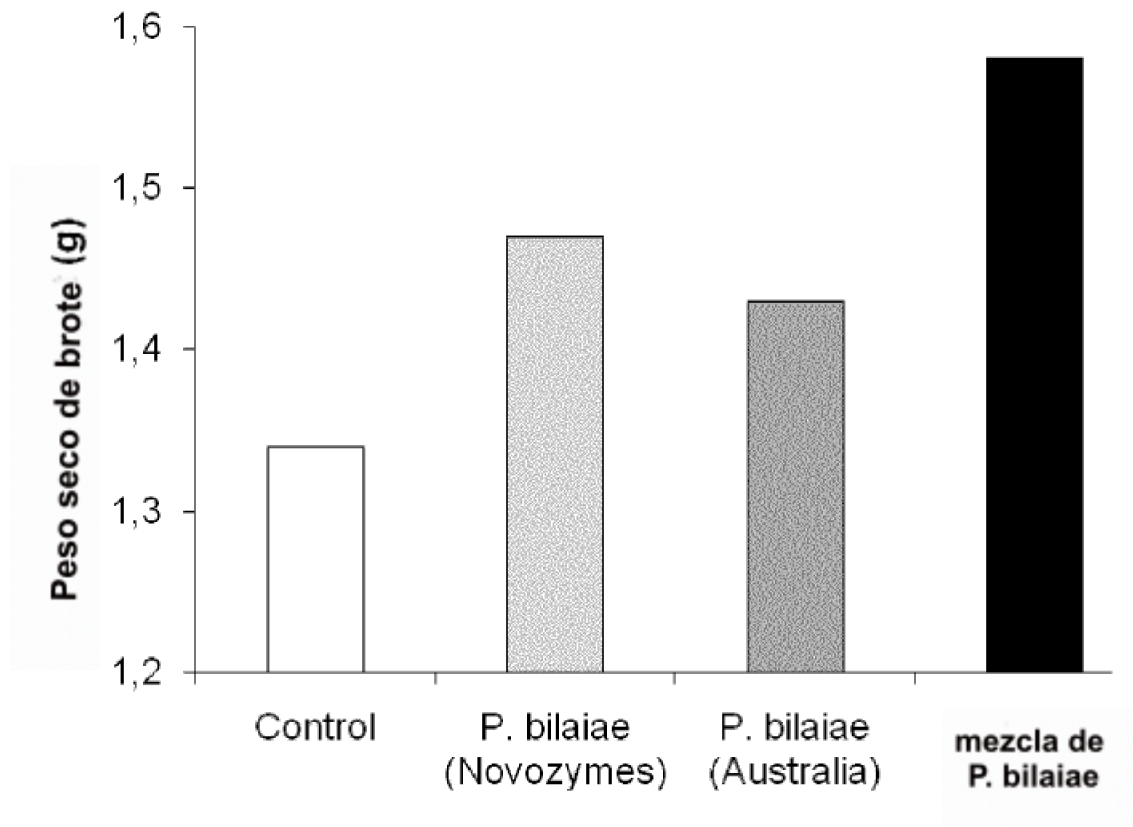


Figura 3

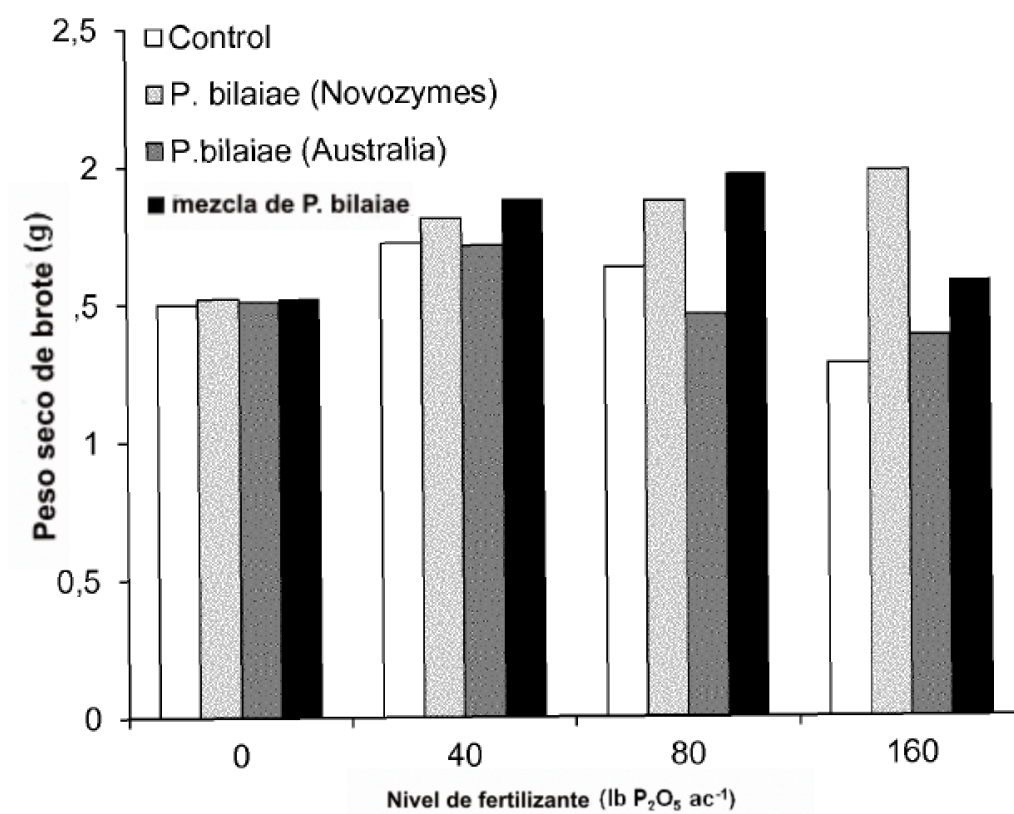


Figura 4