

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 760 009**

51 Int. Cl.:

C12N 1/14 (2006.01)

C05F 11/08 (2006.01)

C12R 1/80 (2006.01)

A01N 63/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.11.2013 PCT/US2013/070285**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.05.2014 WO14078647**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.11.2013 E 13855020 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.09.2019 EP 2920293**

54 Título: **Cepas microbianas, composiciones y métodos para aumentar el fosfato disponible para las plantas**

30 Prioridad:

16.11.2012 US 201261727300 P

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

12.05.2020

73 Titular/es:

**NOVOZYMES BIO AG A/S (100.0%)
Krogshoejvej 36
2880 Bagsvaerd, DK**

72 Inventor/es:

**FRODYMA, MICHAEL;
GREENSHIELDS, DAVID;
STECKLER, SHELAGH;
PRIEST, KARI y
CALDWELL, CARESSA**

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 760 009 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

Cepas microbianas, composiciones y métodos para aumentar el fosfato disponible para las plantas

CAMPO DE LA INVENCION

5 [0001] Se describe en la presente la cepa de *Penicillium bilaiae* aislada con el número de registro de depósito NRRL B-50788. Se describen además composiciones que comprenden la novedosa cepa microbiana y métodos para usar la novedosa cepa microbiana, particularmente composiciones y métodos para aumentar el fosfato disponible para las plantas.

ANTECEDENTES DE LAS INVENCIONES

10 [0002] Para mantener un crecimiento sano, las plantas deben extraer una variedad de elementos del suelo donde crecen. Estos elementos incluyen fósforo y los denominados micronutrientes (por ejemplo, cobre, hierro, zinc, etc.), pero muchos suelos son deficitarios en tales elementos o los contienen solo en formas que no pueden ser fácilmente absorbidas por las plantas (por lo general se cree que los elementos esenciales no pueden ser fácilmente absorbidos por las plantas a menos que estén presentes en una forma disuelta en el suelo).

15 [0003] Para contrarrestar tales deficiencias, comúnmente se aplican fuentes de los elementos deficitarios a los suelos para mejorar los rendimientos y las tasas de crecimiento obtenidos de las plantas de cultivo. Por ejemplo, a menudo se añaden fosfatos al suelo para contrarrestar una falta de fósforo disponible. El fosfato añadido al suelo como un fertilizante comercial (por ejemplo, fosfato de monoamonio, superfosfato triple, etc.) está fácilmente disponible para las plantas, pero se convierte rápidamente en el suelo en formas relativamente no disponibles. Se ha estimado que solo del 10 al 30% del fertilizante de fosfato es usado por la planta en el año en que se aplica, y
20 de un tercio a una mitad del fertilizante de fosfato aplicado puede que nunca sea recuperado por la planta.

[0004] En el pasado se han hecho intentos para usar microorganismos para mejorar la disponibilidad de los elementos esenciales en sistemas de suelo. En particular se han usado especies del hongo *Penicillium* para este fin.

25 [0005] Por ejemplo, la patente de EE.UU. n.º: 5,026,417 divulga cepas aisladas de *P. bilaii* que son capaces de mejorar la absorción de fósforo por las plantas cuando se aplican al suelo.

[0006] La publicación de solicitud de patente de EE.UU. n.º: 2010/0099560 divulga un método de mejora de las condiciones de crecimiento para las plantas cultivando las plantas en un suelo que contiene, en proximidad a las raíces de las plantas, tanto una fuente de fósforo como al menos dos cepas del hongo *Penicillium*.

30 [0007] La patente de EE.UU. n.º: 5,484,464 Métodos y composiciones para aumentar la disponibilidad del fosfato soluble y el nitrógeno fijado para simbiosis leguminosa: *Rhizobium* que implican la coinoculación de semillas de leguminosas con un hongo de suelo que solubiliza fosfato, *Penicillium bilaii*, y *Rhizobium* spp. antes de sembrar.

[0008] Todavía hay, sin embargo, una necesidad de sistemas para mejorar las condiciones de crecimiento para las plantas, particularmente mediante el aumento de los niveles de fósforo disponible en los sistemas de suelo.

RESUMEN DE LAS INVENCIONES

35 [0009] Se describe en la presente la cepa de *Penicillium bilaiae* aislada con el número de registro de depósito NRRL B-50788 que solubiliza fósforo.

40 [0010] También se describen en la presente composiciones que comprenden un portador y la cepa de *Penicillium bilaiae* aislada con el número de registro de depósito NRRL B-50788. Las composiciones pueden comprender además una fuente de fósforo, tal como fosfato de roca o un fertilizante que contiene fósforo, para la solubilización de fósforo por la cepa de *Penicillium bilaiae* aislada de las composiciones. La fuente de fósforo o los fertilizantes que contienen fósforo se pueden usar como parte de la misma composición o a través de un proceso de tratamiento separado.

45 [0011] En otra forma de realización, la composición comprende una o más moléculas de señalización de plantas. En una forma de realización, la composición comprende al menos un lipo-quitooligosacárido (LCO). En otra forma de realización, la composición comprende al menos un quitooligosacárido (CO). En otra forma de realización más,

la composición comprende al menos un flavonoide. En otra forma de realización más, la composición comprende ácido jasmónico o un derivado del mismo. En otra forma de realización, la composición comprende ácido linoleico o un derivado del mismo. En otra forma de realización más, la composición comprende ácido linolénico o un derivado del mismo. En otra forma de realización más, la composición comprende una karrikina.

5 [0012] Además se describe en la presente un método para aumentar la disponibilidad del fósforo para la absorción por las plantas del suelo. El método comprende la introducción en el suelo de un inóculo de la cepa de *Penicillium bilaiae* aislada con el número de registro de depósito NRRL B-50788. En otra forma de realización, el método puede comprender además la adición de una fuente de fósforo al suelo. En otra forma de realización más, el método
10 comprende la introducción en el suelo de un inóculo de la cepa de *Penicillium bilaiae* aislada con el número de registro de depósito NRRL B-50788 como un recubrimiento de semillas.

[0013] También se describe en la presente un método para aumentar la absorción de fósforo en una planta(s) que comprende el cultivo de una planta(s) en un suelo que contiene una fuente de fósforo y la cepa de *Penicillium bilaiae* aislada con el número de registro de depósito NRRL B-50788. En una forma de realización, la(s) planta(s) es una
15 planta(s) leguminosa(s), planta(s) no leguminosa(s) o combinaciones de las mismas. En otra forma de realización, la planta es una planta seleccionada del grupo que consiste en soja, judía, alfalfa, trébol, maíz, tomates, lechuga, patatas, pepinos y combinaciones de las mismas.

[0014] Además se describen en la presente semillas recubiertas con la cepa de *Penicillium bilaiae* aislada con el número de registro de depósito NRRL B-50788.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

20 [0015] La cepa fúngica descrita se ha aislado y se ha evaluado su capacidad para solubilizar fósforo. Esto se describe en detalle en la sección de "ejemplos" proporcionada a continuación. Las formas de realización descritas se refieren además a composiciones, recubrimientos de semillas, métodos para aumentar la disponibilidad del fósforo para la absorción por las plantas del suelo, y métodos para aumentar la absorción de fósforo en plantas que comprenden el cultivo de las plantas en un suelo que contiene una fuente de fósforo.

25 Definiciones:

[0016] Como se utiliza en la presente, las formas singulares "una", "un", "la" y "el" pretenden incluir las formas plurales también, a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

[0017] Como se utiliza en la presente, el término "cultivo biológicamente puro" pretende significar un cultivo esencialmente libre de contaminación biológica y con una uniformidad genética tal que diferentes subcultivos
30 tomados del mismo mostrarán genotipos y fenotipos sustancialmente idénticos (por ejemplo, cultivos con una pureza de al menos el 60%, de al menos el 65%, al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 91%, al menos el 92%, al menos el 93%, al menos el 94%, al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98%, al menos el 99%, hasta el 100% puros).

[0018] Como se utiliza en la presente, el término "aislar, aísla, aislando y/o aislado, etc." pretende significar que el material referenciado se elimina del entorno donde se encuentra normalmente.
35

[0019] Como se utiliza en la presente, el término "inóculo" pretende significar cualquier forma de células, micelio o esporas fúngicas, que es capaz de propagarse sobre o en el suelo cuando las condiciones de temperatura, humedad, etc., son favorables para el crecimiento fúngico.

[0020] Como se utiliza en la presente, el término "espora" tiene su significado normal que es bien conocido y entendido por las personas expertas en la técnica y generalmente se refiere a un microorganismo en su estado latente protegido.
40

[0021] Como se utiliza en la presente, el término "fuente" de un elemento particular pretende significar un compuesto de ese elemento que, al menos en las condiciones del suelo en consideración, no hace que el elemento esté completamente disponible para la absorción por las plantas.

45 [0022] Como se utiliza en la presente, los términos "cantidad eficaz", "concentración eficaz" o "dosificación eficaz" pretende significar la cantidad, concentración o dosificación del uno o más aislados fúngicos suficientes para causar la solubilización de una fuente de fósforo. La dosificación eficaz real en valor absoluto depende de los factores incluidos, pero de forma no limitativa, el tamaño (por ejemplo, el área, la extensión total, etc.) del terreno para la

- 5 aplicación con los aislados fúngicos, las interacciones sinérgicas o antagonistas entre los otros ingredientes activos o inertes que pueden aumentar o reducir la actividad de solubilización de fosfato de los aislados fúngicos, y la estabilidad de los aislados fúngicos en composiciones y/o como tratamientos de semillas. La "cantidad eficaz", "concentración eficaz" o "dosificación eficaz" del pesticida fúngico puede determinarse, por ejemplo, mediante un experimento rutinario de respuesta a la dosis.
- [0023] Como se utiliza en la presente, el término "portador" pretende referirse a un medio capaz de soportar uno o más de los aislados fúngicos como se describe en la presente.
- 10 [0024] Como se utiliza en la presente, el término "portador compatible con el suelo" pretende referirse a cualquier material que se pueda añadir a un suelo sin causar/tener un efecto adverso en el crecimiento de las plantas, la estructura del suelo, el drenaje del suelo, o similares.
- [0025] Como se utiliza en la presente, "al menos un ingrediente biológicamente activo" pretende significar ingredientes biológicamente activos (por ejemplo, moléculas de señalización, otros microorganismos, etc.) distintos al uno o más aislados fúngicos descritos en la presente.
- 15 [0026] Como se utiliza en la presente, los términos "molécula(s) de señalización" o "molécula(s) de señalización de plantas", que se pueden usar de forma intercambiable con "agente(s) de mejora del crecimiento de las plantas", se refiere en términos generales a cualquier agente, tanto de origen natural en plantas o microbios, como sintéticos (y que pueden ser de origen no natural) que directa o indirectamente activa o inactiva una ruta bioquímica de plantas, dando como resultado un crecimiento de las plantas aumentado o mejorado, en comparación con plantas no tratadas o plantas cosechadas a partir de semilla no tratada.
- 20 [0027] Como se utiliza en la presente, los términos "crecimiento de planta aumentado" o "crecimiento de planta mejorado" pretenden referirse a un rendimiento de las plantas aumentado (por ejemplo, biomasa aumentada, número de frutos aumentado, o una combinación de los mismos medidos en fanegas por acre), número de raíces aumentado, masa de raíces aumentada, volumen de raíces aumentado, área de hoja aumentada, soporte de las planta aumentado, vigor de las plantas aumentado, o combinaciones de los mismos.
- 25 [0028] Como se utiliza en la presente, los términos "planta(s)" y "parte(s) de planta(s)" pretenden referirse a todas las plantas y poblaciones de plantas, tales como plantas silvestres deseadas y no deseadas o plantas de cultivo (incluidas las plantas de cultivo de origen natural). Las plantas de cultivo pueden ser plantas que se pueden obtener por métodos de cultivo y optimización vegetal convencionales o por métodos de ingeniería genética y biotecnológicos o por combinaciones de estos métodos, incluidas las plantas transgénicas e incluidos los cultivos de plantas protegibles o no protegibles por los derechos de obtención vegetal. Se debe entender que partes de plantas significan todas las partes y órganos de plantas por encima y por debajo del suelo, tales como brote, hoja, flor y raíz, de las que ejemplos que se pueden mencionar son hojas, agujas, cañas, tallos, flores, cuerpos frutales, frutas, semillas, raíces, tubérculos y rizomas. Las partes de plantas incluyen también material cosechado y material de propagación vegetativa y generativa (por ejemplo, esquejes, tubérculos, rizomas, brotes y semillas, etc.).
- 30 [0029] Como se utiliza en la presente, los términos "solubilización de fosfato" o "que solubiliza fosfato", etc. pretenden significar la conversión de fosfato insoluble (por ejemplo, fosfato de roca, etc.) en una forma de fosfato soluble.
- 35 [0030] Como se utiliza en la presente, el término "organismo que solubiliza fosfato" pretende referirse a cualquier organismo capaz de convertir fosfato insoluble en una forma de fosfato soluble.
- 40 [0031] Como se utiliza en la presente, el término "micronutriente(s)" pretende referirse a nutrientes que se necesitan para el crecimiento de las plantas, la salud de las plantas y/o el desarrollo de las plantas.
- [0032] Como se utiliza en la presente, el término "bioestimulante(s)" pretende referirse a cualquier sustancia capaz de mejorar los procesos metabólicos o fisiológicos en las plantas y los suelos.
- 45 [0033] Como se utiliza en la presente, el término "agente(s) humectante(s)" pretende referirse a cualquier sustancia capaz de disminuir y/o reducir la tensión superficial del agua.

CEPAS

[0034] En una forma de realización, la(s) cepa(s) descrita(s) en la presente es una cepa(s) fúngica(s) que solubiliza fosfato. En otra forma de realización, la(s) cepa(s) es una cepa(s) de *Penicillium bilaiae*. Como se utiliza en la

presente, el nombre de la especie "*Penicillium bilaiae*" pretende incluir todas las iteraciones del nombre de la especie "*Penicillium bilaiae*", tales como los nombres de especies publicados en toda la bibliografía (por ejemplo, "*Penicillium bilajii*", "*Penicillium bilaii*", etc.).

5 [0035] En otra forma de realización, la(s) cepa(s) es la progenie de la cepa de *Penicillium bilaiae* con el número de registro de depósito V08/021001 (depositada con el National Measurement Institute). En otra forma de realización, la(s) cepa(s) es la progenie de la cepa de *Penicillium bilaiae* con el número de registro de depósito ATCC-20851 (depositada con la American Type Culture Collection). En otra forma de realización, la(s) cepa(s) es la progenie de la cepa de *Penicillium bilaiae* con el número de registro de depósito ATCC-22348 (depositada con la American Type Culture Collection). En otra forma de realización más, la(s) cepa(s) es la progenie de la cepa de *Penicillium bilaiae* con el número de registro de depósito V08/021001 y la cepa de *Penicillium bilaiae* con el número de registro de depósito ATCC-20851. En otra forma de realización más, la(s) cepa(s) es la progenie de la cepa de *Penicillium bilaiae* con el número de registro de depósito V08/021001 y la cepa de *Penicillium bilaiae* con el número de registro de depósito ATCC-22348. En otra forma de realización más, la(s) cepa(s) es la progenie de la cepa de *Penicillium bilaiae* con el número de registro de depósito ATCC-20851 y la cepa de *Penicillium bilaiae* con el número de registro de depósito ATCC-22348.

[0036] En otra forma de realización más, la cepa es una cepa de *Penicillium bilaiae* con el número de registro de depósito NRRL B-50788.

[0037] En una forma de realización, la cepa es la cepa con el número de registro de depósito NRRL B-50788.

20 [0038] En otra forma de realización, la(s) cepa(s) puede ser una progenie de una de las cepas depositadas. En otra forma de realización, la(s) cepa(s) depositada(s) es un cultivo biológicamente puro (por ejemplo, cultivos que tienen una pureza de al menos el 60%, de al menos el 65%, al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 91%, al menos el 92%, al menos el 93%, al menos el 94%, al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98%, al menos el 99%, hasta el 100% puros).

25 [0039] El cultivo fúngico depositado deriva de una cepa fúngica de origen natural aislada. La cepa depositada se recogió en Saskatoon, Canadá, en 2012. Los cultivos de la cepa depositada pueden consistir en esporas fúngicas latentes y/u hongos viables.

30 [0040] El hongo *Penicillium* descrito en la presente y, en particular, la cepa con el número de registro de depósito NRRL B-50788, se puede cultivar utilizando una fermentación en estado sólido o líquida y una fuente de carbono adecuada. Los aislados de *Penicillium* pueden cultivarse usando cualquier método adecuado conocido por la persona experta en la técnica. Por ejemplo, el hongo se puede cultivar en un medio de cultivo sólido tal como el agar de dextrosa y patata o el agar de extracto de malta, o en matraces que contienen medios líquidos adecuados tales como el medio Czapek-Dox o el caldo de dextrosa y patata. Estos métodos de cultivo se pueden usar en la preparación de un inóculo de *Penicillium* spp. para el recubrimiento de semillas y/o la aplicación a un portador que se vaya a aplicar en el suelo.

35 [0041] La producción en estado sólido de esporas de *Penicillium* se puede conseguir inoculando un medio sólido tal como una turba o un sustrato a base de vermiculita, o granos incluidos, pero de forma no limitativa, 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 ufc/ml) de la *Penicillium* spp. apropiada y la humedad se ajusta a de un 20 a un 50%, en función 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 cultivando el hongo en cualquier medio adecuado, tal como caldo de dextrosa y patata o medios de extracto de levadura y sacarosa, bajo un pH y las condiciones de temperatura apropiados (como podría realizar cualquier persona experta en la técnica).

45 [0042] El material resultante se puede usar directamente en una composición, como un tratamiento de semillas, o las esporas se pueden cosechar, concentrar por centrifugación, formular y luego secar usando técnicas de secado por aire, de liofilización o 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 humectable.

50 [0043] Las cepas depositadas mencionadas anteriormente se depositaron el 1 de octubre de 2012, como se indica con más detalle a continuación, en la sección "Materiales y métodos", según los términos del tratado de Budapest sobre el reconocimiento internacional del depósito de microorganismos a los fines del procedimiento en materia de patentes en la Agricultural Research Service Culture Collection, 1815 North University Street, Peoria, Illinois 61604, EE.UU.

COMPOSICIONES

5 [0044] En otro aspecto, la invención se refiere a una composición que comprende un portador y un inóculo de una o más de las cepas depositadas (ya sea en forma de esporas o cepas en un estado vegetativo) descritas en la presente. En determinadas formas de realización, la composición puede estar en forma de un líquido, una suspensión, un sólido o un polvo (polvo humectable o polvo seco). En otra forma de realización, la composición puede estar en forma de un recubrimiento de semillas. Las composiciones en forma líquida, en suspensión o en polvo (por ejemplo, polvo humectable) pueden ser adecuadas para recubrir semillas. Cuando se usa para revestir semillas, la composición se puede aplicar a las semillas y dejar que se seque. En formas de realización donde la composición es un polvo (por ejemplo, un polvo humectable), puede ser necesario añadir un líquido, tal como agua, al polvo antes de la aplicación a una semilla.

Portadores:

15 [0045] Los portadores descritos en la presente permitirán que la(s) cepa(s) fúngica(s) depositada(s) permanezca eficaz (por ejemplo, capaz de solubilizar fosfato) y viable una vez formulada. Los ejemplos no limitativos de portadores descritos en la presente incluyen líquidos, suspensiones o sólidos (incluidos polvos humectables o polvos secos). En una forma de realización, el portador es un portador compatible con el suelo como se describe en la presente.

20 [0046] En una forma de realización, el portador es un portador líquido. Los ejemplos no limitativos de líquidos útiles como portadores para las composiciones descritas en la presente incluyen el agua, una solución acuosa o una solución no acuosa. En una forma de realización, el portador es agua. En otra forma de realización, el portador es una solución acuosa, tal como agua azucarada. En otra forma de realización, el portador es una solución no acuosa. Si se usa un portador líquido, el portador líquido (por ejemplo, agua) puede incluir además medios de cultivo para cultivar la cepa fúngica depositada. Los ejemplos no limitativos de medios de cultivo adecuados para la cepa fúngica depositada incluyen el medio Czapek-Dox o el caldo de dextrosa y patata, o cualquier medio que las personas expertas en la técnica sepan que es compatible con, y/o proporciona, nutrientes de crecimiento a la cepa fúngica depositada.

25 [0047] En otra forma de realización, el portador es una suspensión. En una forma de realización, la suspensión puede comprender un agente adhesivo, un líquido o una combinación de los mismos. Se prevé que el agente adhesivo puede ser cualquier agente capaz de adherir el inóculo (por ejemplo, una o más de las cepas depositadas) a un sustrato de interés (por ejemplo, una semilla). Los ejemplos no limitativos de agentes adhesivos incluyen alginato, aceite mineral, jarabe, goma arábica, miel, metilcelulosa, leche, pasta para empapelar y combinaciones de los mismos. Los ejemplos no limitativos de líquidos apropiados para una suspensión incluyen el agua o el agua azucarada.

30 [0048] En otra forma de realización, el portador es un sólido. En una forma de realización particular, el sólido es un polvo. En una forma de realización, el polvo es un polvo humectable. En otra forma de realización, el polvo es un polvo seco. En otra forma de realización, el sólido es un gránulo. Los ejemplos no limitativos de sólidos útiles como portadores para las composiciones descritas en la presente incluyen turba, trigo, paja de trigo molida, salvado, vermiculita, celulosa, almidón, suelo (pasteurizado o no pasteurizado), yeso, talco, arcillas (por ejemplo, caolín, bentonita, montmorillonita) y geles de sílice.

Ingredientes opcionales:

40 [0049] Las composiciones descritas en la presente pueden comprender uno o más ingredientes opcionales. Los ejemplos no limitativos de ingredientes opcionales incluyen una o más fuentes de fósforo, uno o más ingredientes biológicamente activos, micronutrientes, bioestimulantes, conservantes, polímeros, agentes humectantes, tensioactivos o combinaciones de los mismos.

Fuente(s) de fósforo:

45 [0050] Las composiciones descritas en la presente pueden comprender opcionalmente una o más fuentes de fósforo. Se puede usar cualquier fuente de fósforo que sea capaz de ser solubilizada por las cepas depositadas.

[0051] En una forma de realización, la una o más fuentes de fósforo son fosfato de roca.

[0052] En otra forma de realización, la una o más fuentes de fósforo son fertilizantes que comprenden una o más fuentes de fósforo. Hay fertilizantes de fosfato fabricados disponibles comercialmente de muchos tipos. Algunos

comunes son aquellos que contienen fosfato de roca, fosfato de monoamonio, fosfato diamónico, fosfato monocálcico, superfosfato, superfosfato triple y/o polifosfato de amonio. Todos estos fertilizantes se producen por procesamiento químico de fosfatos de roca naturales insolubles en instalaciones de fabricación de fertilizantes a gran escala y el producto es costoso. Por medio de la presente invención es posible reducir la cantidad de estos fertilizantes aplicados al suelo mientras todavía se mantiene la misma cantidad de absorción de fósforo del suelo.

[0053] En otra forma de realización más, la una o más fuentes de fósforo son fuentes de fósforo orgánico. En otra forma de realización particular, la fuente o el fósforo es un fertilizante orgánico. Un fertilizante orgánico se refiere a una enmienda de suelo derivada de fuentes naturales que garantiza, al menos, los porcentajes mínimos de nitrógeno, fosfato y potasa. Los ejemplos no limitativos de fertilizantes orgánicos incluyen productos derivados vegetales y animales, polvos de rocas, algas, inoculantes y acondicionadores. Estos están a menudo disponibles en centros de jardinería y a través de compañías de suministro hortícola. En particular, la fuente orgánica de fósforo es de harina de huesos, harina de carne, estiércol animal, compost, lodo de depuradora o guano, o combinaciones de los mismos.

[0054] En otra forma de realización más, la una o más fuentes de fósforo pueden ser una combinación de fuentes de fósforo, incluidas, pero de forma no limitativa, fosfato de roca, fosfato de monoamonio, fosfato diamónico, fosfato monocálcico, superfosfato, superfosfato triple, polifosfato de amonio, fertilizantes que comprenden una o más fuentes de fósforo, una o más fuentes de fósforo orgánico, y combinaciones de las mismas.

Ingrediente(s) biológicamente activo(s):

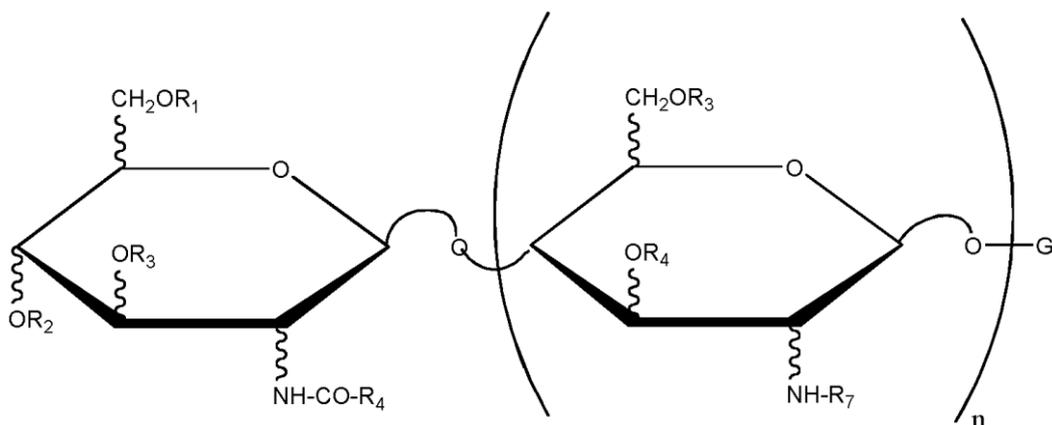
[0055] Las composiciones fúngicas descritas en la presente pueden incluir opcionalmente uno o más ingredientes biológicamente activos como se describe en la presente, distintos a los pesticidas fúngicos descritos en la presente. Los ejemplos no limitativos de ingredientes biológicamente activos incluyen moléculas de señalización (por ejemplo, lipo-quitooligosacáridos (LCO), quitooligosacáridos (CO), compuestos quitinosos, flavonoides, ácido jasmónico o derivados del mismo, ácido linoleico o derivados del mismo, ácido linolénico o derivados del mismo, kerrikinas, etc.) y microorganismos beneficiosos (por ejemplo, *Rhizobium spp.*, *Bradyrhizobium spp.*, *Sinorhizobium spp.*, *Azorhizobium spp.*, etc.).

Molécula(s) de señalización:

[0056] En una forma de realización, las composiciones descritas en la presente incluyen una o más moléculas de señalización. En una forma de realización, la una o más moléculas de señalización son uno o más LCO. En otra forma de realización, la una o más moléculas de señalización son uno o más compuestos quitinosos. En otra forma de realización más, la una o más moléculas de señalización son uno o más CO. En otra forma de realización, la una o más moléculas de señalización son uno o más flavonoides o derivados de los mismos. En otra forma de realización más, la una o más moléculas de señalización son uno o más inductores no flavonoides del gen nod (por ejemplo, el ácido jasmónico, el ácido linoleico, el ácido linolénico y derivados de los mismos). En otra forma de realización más, la una o más moléculas de señalización son una o más karrikinas o derivados de las mismas. En otra forma de realización más, la una o más moléculas de señalización son uno o más LCO, uno o más compuestos quitinosos, uno o más CO, uno o más flavonoides y derivados de los mismos, uno o más inductores no flavonoides del gen nod y derivados de los mismos, una o más karrikinas y derivados de las mismas, o cualquier combinación de moléculas de señalización derivada.

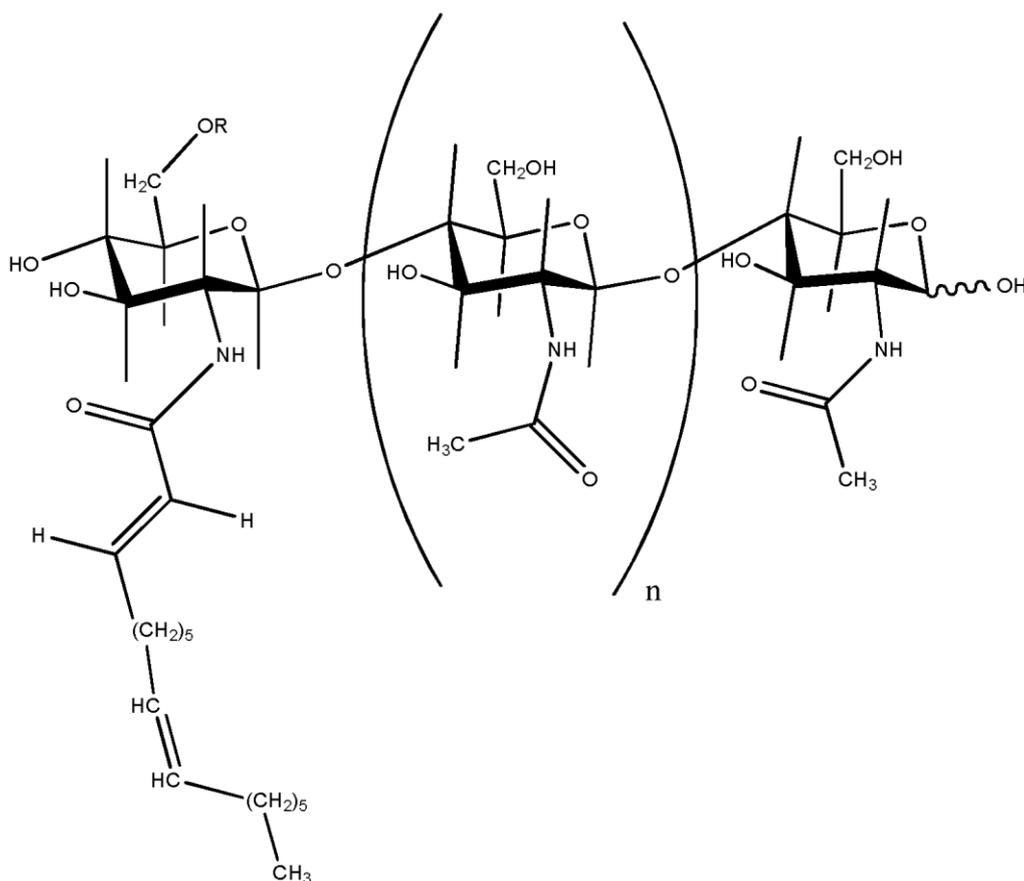
LCO:

[0057] Los compuestos de lipo-quitooligosacáridos (LCO), también conocidos en la técnica como señales Nod o factores Nod simbióticos, consisten en un esqueleto de oligosacárido de residuos *N*-acetil-D-glucosamina ("GlcNAc") unidos con enlace β -1,4 con una cadena de acilo graso unido a N condensada en el extremo no reductor. Los LCO difieren en el número de residuos GlcNAc en el esqueleto, en la longitud y el grado de saturación de la cadena de acilo graso, y en las sustituciones de residuos de azúcar reductores y no reductores. Un ejemplo de un LCO e presenta a continuación como la fórmula I:



donde:

- G es una hexosamina que puede ser sustituida, por ejemplo, por un grupo acetilo en el nitrógeno, un grupo sulfato, un grupo acetilo y/o un grupo éter en un oxígeno,
- 5 R₁, R₂, R₃, R₅, R₆ y R₇, que pueden ser idénticos o diferentes, representan H, CH₃ CO--, C_x H_yCO-- donde x es un número entero entre 0 y 17, e y es un número entero entre 1 y 35, o cualquier otro grupo acilo tal como, por ejemplo, un carbamilo,
- R₄ representa una cadena alifática mono-, di- o triinsaturada que contiene al menos 12 átomos de carbono, y n es un número entero entre 1 y 4.
- 10 [0058] Los LCO pueden obtenerse (aislarse y/o purificarse) de bacterias tales como *Rhizobia*, por ejemplo, *Rhizobium spp.*, *Bradyrhizobium spp.*, *Sinorhizobium spp.* y *Azorhizobium spp.* La estructura de LCO es característica para cada una de tales especies bacterianas, y cada cepa puede producir múltiples LCO con diferentes estructuras. Por ejemplo, en la patente de EE.UU. 5,549,718 se han descrito también LCO específicos de *S. meliloti* con la fórmula II:



donde R representa H o CH₃CO-- y n es igual a 2 o 3.

[0059] LCO aún más específicos incluyen NodRM, NodRM-1, NodRM-3. Cuando están acetilados (el R=CH₃CO--), se convierten en AcNodRM-1 y AcNodRM-3, respectivamente (patente de EE.UU. 5,545,718).

5 [0060] Los LCO de *Bradyrhizobium japonicum* se describen en las patentes de EE.UU. 5,175,149 y 5,321,011. En términos generales, son fitohormonas de pentasacáridos que comprenden metilfucosa. Una serie de estos LCO derivados de *B. japonicum* se describen: BjNod-V (C_{18:1}); BjNod-V (Ac, C_{18:1}), BjNod-V (C_{16:1}); y BjNod-V (Ac, C_{16:0}), donde "V" indica la presencia de cinco N-acetilglucosaminas; "Ac", una acetilación; donde el número que sigue a la "C" indica el número de carbonos en la cadena lateral de ácido graso; y el número que sigue a los ":", el número de enlaces dobles.

10 [0061] Los LCO usados en composiciones de la invención pueden obtenerse (es decir, aislarse y/o purificarse) de cepas bacterianas que producen LCO, tales como cepas de *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium* (incluido *B. japonicum*), *Mesorhizobium*, *Rhizobium* (incluido *R. leguminosarum*), *Sinorhizobium* (incluido *S. meliloti*), y cepas bacterianas genéticamente modificadas para producir LCO.

15 [0062] La presente invención también abarca las composiciones que usan los LCO obtenidos (es decir, aislados y/o purificados) de un hongo micorrízico, tal como hongos del grupo *Glomerocycota*, por ejemplo, *Glomus intraradicus*. Las estructuras de los LCO representativos obtenidos de estos hongos se describen en WO 2010/049751 y WO 2010/049751 (los LCO descritos en las mismas también son denominados "factores Myc").

20 [0063] Las composiciones de la presente invención abarcan además el uso de compuestos de LCO sintéticos, tales como los descritos en WO 2005/063784, y LCO recombinantes producidos a través de ingeniería genética. La estructura básica del LCO de origen natural puede contener modificaciones o sustituciones encontradas en los LCO de origen natural, tales como las descritas en Spaink, Crit. Rev. Plant Sci. 54: 257-288 (2000) y D'Haese, et al., Glycobiology 12: 79R-105R (2002). Moléculas de oligosacáridos precursoras (CO, que como se describe a continuación, son también útiles como moléculas de señalización de plantas en la presente invención) para la construcción de LCO también pueden ser sintetizadas por organismos genéticamente modificados, por ejemplo, como en Samain, et al., Carb. Res. 302: 35-42 (1997); Samain, et al., J. Biotechnol. 72: 33-47 (1999).

30 [0064] Los LCO se pueden utilizar en varias formas de pureza y se pueden usar solos o en forma de un cultivo de bacterias u hongos productores de LCO. Los métodos para proporcionar LCO sustancialmente puros incluyen sencillamente eliminar las células microbianas de una mezcla de LCO y el microbio, o continuar aislando y purificando las moléculas de LCO a través de la separación de la fase de solvente de LCO seguida de la cromatografía HPLC como se describe, por ejemplo, en la patente de EE.UU. 5,549,718. La purificación se puede mejorar por HPLC repetida, y las moléculas de LCO purificadas se pueden liofilizar para el almacenamiento a largo plazo.

CO:

35 [0065] Los quitooligosacáridos (CO) se conocen en la técnica como estructuras de N acil glucosamina con enlace β-1-4 identificadas como oligómeros de quitina, también como N-acetilquitooligosacáridos. Los CO tienen decoraciones de cadena lateral únicas y diferentes que los hacen diferentes a las moléculas de quitina [(C₈-H₁₃NO₅)_n, CAS n.º 1398-61-4] y las moléculas de quitosano [(C₅H₁₁NO₄)_n, CAS n.º 9012-76-4]. La bibliografía representativa que describe la estructura y la producción de CO es la siguiente: Van der Holst, et al., Current Opinion in Structural Biology, 11: 608-616 (2001); Robina, et al., Tetrahedron 58: 521-530 (2002); Hanel, et al., Planta 232: 787-806 (2010); Rouge, et al. Capítulo 27, "The Molecular Immunology of Complex Carbohydrates" en Advances in Experimental Medicine and Biology, Springer Science; Wan, et al., Plant Cell 21: 1053-69 (2009); PCT/F100/00803 (9/21/2000); y Demont-Caulet, et al., Plant Physiol. 120(1): 83-92 (1999). Los CO pueden ser sintéticos o recombinantes. Los métodos para la preparación de CO recombinantes se conocen en la técnica. Véase, por ejemplo, Samain, et al. (supra); Cottaz, et al., Meth. Eng. 7(4): 311-7 (2005) y Samain, et al., J. Biotechnol. 72: 33-47 (1999).

Compuestos quitinosos:

50 [0066] Las quitinas y los quitosanos, que son componentes principales de las paredes celulares de los hongos y los exoesqueletos de los insectos y los crustáceos, están también compuestos por residuos de GlcNAc. Los compuestos quitinosos incluyen la quitina, (IUPAC: N-[5-[[3-acetilamino-4,5-dihidroxi-6-(hidroximetil)oxan-2il]metoximetil]-2-[[5-acetilamino-4,6-dihidroxi-2-(hidroximetil)oxan-3-il]metoximetil]-4-hidroxi-6-(hidroximetil)oxan-3-is]etanamida), y el quitosano, (IUPAC: 5-amino-6-[5-amino-6-[5-amino-4,6-dihidroxi-2(hidroximetil)oxan-3-il]oxi-4-hidroxi-2-(hidroximetil)oxan-3-il]oxi-2(hidroximetil)oxano-3,4-diol).

[0067] Estos compuestos se pueden obtener comercialmente, por ejemplo, de Sigma-Aldrich, o prepararse a partir de insectos, caparazones de crustáceos o paredes celulares fúngicas. Se conocen métodos para la preparación de quitina y quitosano en la técnica y se han descrito, por ejemplo, en la patente de EE.UU. 4,536,207 (preparación a partir de caparazones de crustáceos), Pochanavanich, et al., Lett. Appl. Microbiol. 35: 17-21 (2002) (preparación a partir de paredes celulares fúngicas) y la patente de EE.UU. 5,965,545 (preparación a partir de caparazones de cangrejo e hidrólisis de quitosano comercial). Se pueden obtener quitinas y quitosanos desacetilados que varían de menos del 35% a más del 90% de desacetilación, y cubren un amplio espectro de pesos moleculares, por ejemplo, oligómeros de quitosano de bajo peso molecular de menos de 15 kD y oligómeros de quitina de 0,5 a 2 kD; quitosano de "calidad práctica" con un peso molecular de aproximadamente 15 kD; y quitosano de alto peso molecular de hasta 70 kD. También hay disponibles comercialmente composiciones de quitina y quitosano formuladas para el tratamiento de semillas. Los productos comerciales incluyen, por ejemplo, ELEXA® (Plant Defense Boosters, Inc.) y BEYOND™ (Agrihouse, Inc.).

Flavonoides:

[0068] Los flavonoides son compuestos fenólicos que tienen la estructura general de dos anillos aromáticos conectados por un puente de tres carbonos. Los flavonoides son producidos por plantas y tienen muchas funciones, por ejemplo, como moléculas de señalización beneficiosas y como protección contra insectos, animales, hongos y bacterias. Las clases de flavonoides incluyen las chalconas, las antocianidinas, las cumarinas, las flavonas, los flavanoles, los flavonoles, las flavanonas y las isoflavonas. Véase, Jain, et al., J. Plant Biochem. & Biotechnol. 11: 1-10 (2002); Shaw, et al., Environmental Microbiol. 11: 1867-80 (2006).

[0069] Los flavonoides representativos que pueden ser útiles en composiciones de la presente invención incluyen la luteolina, la apigenina, la tangeritina, la quercetina, el canferol, la miricetina, la fisetina, la isoramnetina, el paquipodol, la ramnacina, la hesperetina, la naringenina, la formononetina, el eriodictiol, el homoeriodictiol, la taxifolina, la dihidroquercetina, el dihidrocanferol, la genisteína, la daidzeína, la gliciteína, la catequina, la galocatequina, el 3-galato de catequina, el 3-galato de galocatequina, la epicatequina, la epigalocatequina, el 3-galato de epicatequina, el 3-galato de epigalocatequina, la cianidina, la delphinidina, la malvidina, la pelargonidina, la peonidina, la petunidina o los derivados de los mismos. Hay compuestos flavonoides disponibles comercialmente, por ejemplo, de Natland International Corp., Research Triangle Park, NC; MP Biomedicals, Irvine, CA; LC Laboratories, Woburn MA. Se pueden aislar compuestos flavonoides de plantas o semillas, por ejemplo, como se describe en las patentes de EE.UU. 5,702,752; 5,990,291; y 6,146,668. Los compuestos flavonoides también pueden ser producidos por organismos genéticamente modificados, tal como levadura, como se describe en Ralston, et al., Plant Physiology 137: 1375-88 (2005).

Inductor(es) no flavonoides del gen Nod:

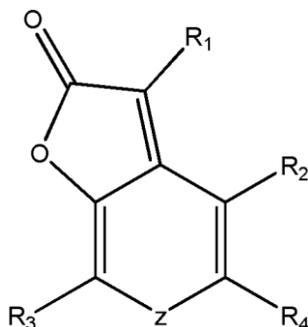
[0070] También se pueden usar en composiciones de la presente invención el ácido jasmónico (JA, ácido [1R-[1 α ,2 β (Z)]]-3-oxo-2-(pentenil)ciclopentanoacético) y sus derivados, el ácido linoleico (ácido (Z,Z)-9,12-octadecadienoico) y sus derivados, y el ácido linolénico (ácido (Z,Z,Z)-9,12,15-octadecatrienoico) y sus derivados. El ácido jasmónico y su éster metílico, el jasmonato de metilo (MeJA), colectivamente conocidos como jasmonatos, son compuestos a base de octadecanoides que ocurren naturalmente en las plantas. El ácido jasmónico es producido por las raíces de plántulas de trigo y por microorganismos fúngicos tales como *Botryodiplodia theobromae* y *Gibberella fujikuroi*, levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) y cepas patógenas y no patógenas de *Escherichia coli*. El ácido linoleico y el ácido linolénico se producen en el curso de la biosíntesis del ácido jasmónico. Se ha informado de que los jasmonatos, el ácido linoleico y el ácido linoleico (y sus derivados) son inductores de la expresión del gen nod o la producción de LCO por rizobacterias. Véase, por ejemplo, Mabood, Fazli, Jasmonates induce the expression of nod genes in Bradyrhizobium japonicum, 17 de mayo de 2001; y Mabood, Fazli, "Linoleic and linolenic acid induce the expression of nod genes in Bradyrhizobium japonicum", USDA 3, 17 de mayo de 2001.

[0071] Los derivados útiles del ácido linoleico, el ácido linolénico y el ácido jasmónico que pueden ser útiles en composiciones de la presente invención incluyen ésteres, amidas, glucósidos y sales. Ésteres representativos son compuestos donde el grupo carboxilo del ácido linoleico, el ácido linolénico o el ácido jasmónico se ha sustituido con un grupo --COR, donde R es un grupo --OR¹, donde R¹ es: un grupo alquilo, tal como un grupo alquilo C₁-C₈ no ramificado o ramificado, por ejemplo, un grupo metilo, etilo o propilo; un grupo alqueno, tal como un grupo alqueno C₂-C₈ no ramificado o ramificado; un grupo arilo con, por ejemplo, de 6 a 10 átomos de carbono; o un grupo heteroarilo con, por ejemplo, de 4 a 9 átomos de carbono, donde los heteroátomos en el grupo heteroarilo pueden ser, por ejemplo, N, O, P o S. Amidas representativas son compuestos donde el grupo carboxilo del ácido linoleico, el ácido linolénico o el ácido jasmónico se ha sustituido con un grupo --COR, donde R es un grupo NR²R³, donde R² y R³ son independientemente: hidrógeno; un grupo alquilo, tal como un grupo alquilo C₁-C₈ no ramificado o ramificado, por ejemplo, un grupo metilo, etilo o propilo; un grupo alqueno, tal como un grupo alqueno C₂-C₈ no ramificado o ramificado; un grupo alquino, tal como un grupo alquino C₂-C₈ no ramificado o ramificado; un grupo arilo con, por ejemplo, de 6 a 10 átomos de carbono; o un grupo heteroarilo con, por ejemplo, de 4 a 9 átomos de carbono, donde

los heteroátomos en el grupo heteroarilo pueden ser, por ejemplo, N, O, P o S. Se pueden preparar ésteres por métodos conocidos, tal como la adición nucleofílica catalizada por ácido, donde el ácido carboxílico se hace reaccionar con un alcohol en presencia de una cantidad catalítica de un ácido mineral. Las amidas también se pueden preparar por métodos conocidos, tal como haciendo reaccionar el ácido carboxílico con la amina apropiada en presencia de un agente de acoplamiento tal como la dicitohexilcarbodiimida (DCC), bajo condiciones neutras. Las sales adecuadas del ácido linoleico, el ácido linolénico y el ácido jasmónico incluyen, por ejemplo, sales de adición de bases. Las bases que se pueden usar como reactivos para preparar sales básicas metabólicamente aceptables de estos compuestos incluyen aquellas derivadas de cationes tales como cationes de metales alcalinos (por ejemplo, potasio y sodio) y cationes de metales alcalinotérreos (por ejemplo, calcio y magnesio). Estas sales se pueden preparar fácilmente mezclando una solución de ácido linoleico, ácido linolénico o ácido jasmónico con una solución de la base. La sal se puede precipitar a partir de una solución y recogerse por filtración o se puede recuperar por otros medios tales como por evaporación del solvente.

Karrikina(s):

[0072] Las karrikinas son 4H-pironas vinílogas, por ejemplo, 2H-furo[2,3-c]piran-2-onas, incluidos sus derivados y análogos. Ejemplos de estos compuestos se representan mediante la estructura siguiente:



donde; Z es O, S o NR₅; R₁, R₂, R₃ y R₄ son cada uno independientemente H, alquilo, alquenoilo, alquinilo, fenilo, bencilo, hidroxilo, hidroxialquilo, alcoxi, feniloxi, benziloxi, CN, COR₆, COOR₇ o NO₂; y R₅, R₆ y R₇ son cada uno independientemente H, alquilo o alquenoilo, o una sal derivada biológicamente aceptable. Los ejemplos de sales biológicamente aceptables de estos compuestos pueden incluir sales de adición de ácido formadas con ácidos biológicamente aceptables, los ejemplos de los cuales incluyen hidrocloreuro, hidrobromuro, sulfato o bisulfato, fosfato o hidrógeno de fosfato, acetato, benzoato, succinato, fumarato, maleato, lactato, citrato, tartrato, gluconato; metanosulfonato; benzenosulfonato y ácido p-toluenosulfónico. Sales de metales biológicamente aceptables adicionales pueden incluir sales de metales alcalinos, con bases, los ejemplos de las cuales incluyen las sales de sodio y potasio. Los ejemplos de compuestos abarcados por la estructura y que pueden ser adecuados para usar en la presente invención incluyen los siguientes: 3-metil-2H-furo[2,3-c]piran-2-ona (donde R₁=CH₃, R₂, R₃, R₄=H), 2H-furo[2,3-c]piran-2-ona (donde R₁, R₂, R₃, R₄=H), 7-metil-2H-furo[2,3-c]piran-2-ona (donde R₁, R₂, R₄=H, R₃=CH₃), 5-metil-2H-furo[2,3-c]piran-2-ona (donde R₁, R₂, R₃=H, R₄=CH₃), 3,7-dimetil-2H-furo[2,3-c]piran-2-ona (donde R₁, R₃=CH₃, R₂, R₄=H), 3,5-dimetil-2H-furo[2,3-c]piran-2-ona (donde R₁, R₄=CH₃, R₂, R₃=H), 3,5,7-trimetil-2H-furo[2,3-c]piran-2-ona (donde R₁, R₃, R₄=CH₃, R₂=H), 5-metoximetil-3-metil-2H-furo[2,3-c]piran-2-ona (donde R₁=CH₃, R₂, R₃=H, R₄=CH₂OCH₃), 4-bromo-3,7-dimetil-2H-furo[2,3-c]piran-2-ona (donde R₁, R₃=CH₃, R₂=Br, R₄=H), 3-metilfuro[2,3-c]piridin-2(3H)-ona (donde Z=NH, R₁=CH₃, R₂, R₃, R₄=H), 3,6-dimetilfuro[2,3-c]piridin-2(6H)-ona (donde Z=N-CH₃, R₁=CH₃, R₂, R₃, R₄=H). Véase, la patente de EE.UU. 7,576,213. Estas moléculas se conocen también como karrikinas. Véase, Halford, "Smoke Signals", in Chem. Eng. News (12 de abril de 2010), en las páginas 37-38 (que informa de que las karrikinas o butenolidas que están contenidas en el humo actúan como estimulantes del crecimiento y estimulan la germinación de semillas después de un incendio forestal, y pueden revigorizar semillas tales como de maíz, tomates, lechuga y cebollas que se habían almacenado). Estas moléculas son el objeto de la patente de EE.UU. 7,576,213.

Microorganismo(s) beneficioso(s):

[0073] En una forma de realización, las composiciones descritas en la presente pueden comprender uno o más microorganismos beneficiosos. El uno o más microorganismos beneficiosos pueden tener una o más propiedades beneficiosas (por ejemplo, producir una o más de las moléculas de señalización descritas en la presente, mejorar la absorción de nutrientes y agua, promover y/o mejorar la fijación de nitrógeno, mejorar el crecimiento, mejorar la germinación de semillas, mejorar la emergencia de plántulas, romper el letargo o la quiescencia de una planta, etc.).

[0074] En una forma de realización, el/los microorganismo(s) beneficioso(s) es una o más bacterias. En otra forma de realización, las bacterias son diazótrofos (es decir, bacterias que son bacterias de fijación de nitrógeno simbióticas). En otra forma de realización más, las bacterias son bacterias de los géneros *Rhizobium spp.* (por ejemplo, *R. cellulosilyticum*, *R. daejeonense*, *R. etli*, *R. galegae*, *R. gallicum*, *R. giardinii*, *R. hainanense*, *R. huautlense*, *R. indigoferae*, *R. leguminosarum*, *R. loessense*, *R. lupini*, *R. lusitanum*, *R. meliloti*, *R. mongolense*, *R. miluonense*, *R. sullae*, *R. tropici*, *R. undicola* y/o *R. yanglingense*), *Bradyrhizobium spp.* (por ejemplo, *B. bete*, *B. canariense*, *B. elkanii*, *B. iriomotense*, *B. japonicum*, *B. jicamae*, *B. liaoningense*, *B. pachyrhizi* y/o *B. yuanmingense*), *Azorhizobium spp.* (por ejemplo, *A. caulinodans* y/o *A. doebereineriae*), *Sinorhizobium spp.* (por ejemplo, *S. abri*, *S. adhaerens*, *S. americanum*, *S. aboris*, *S. fredii*, *S. indiaense*, *S. kostiense*, *S. kummerowiae*, *S. medicae*, *S. meliloti*, *S. mexicanus*, *S. morelense*, *S. sahelii*, *S. terangaie* y/o *S. xinjiangense*), *Mesorhizobium spp.* (*M. albiziae*, *M. amorphae*, *M. chacoense*, *M. ciceri*, *M. huakuii*, *M. loti*, *M. mediterraneum*, *M. pluifarium*, *M. septentrionale*, *M. temperatum* y/o *M. tianshanense*) y combinaciones de los mismos. En una forma de realización particular, el microorganismo beneficioso se selecciona del grupo que consiste en *B. japonicum*, *R. leguminosarum*, *R. meliloti*, *S. meliloti* y combinaciones de los mismos. En otra forma de realización, el microorganismo beneficioso es *B. japonicum*. En otra forma de realización, el microorganismo beneficioso es *R. leguminosarum*. En otra forma de realización, el microorganismo beneficioso es *R. meliloti*. En otra forma de realización, el microorganismo beneficioso es *S. meliloti*.

[0075] En otra forma de realización, el microorganismo beneficioso es una o más micorrizas. En particular, la una o más micorrizas es una endomicorriza (también llamadas micorrizas vesículo-arbusculares, VAM, micorrizas arbusculares o AM), una ectomicorriza o una combinación de las mismas.

[0076] En una forma de realización, la una o más micorrizas es una endomicorriza del filo *Glomeromycota* y los géneros *Glomus* y *Gigaspora*. En otra forma de realización más, la endomicorriza es una cepa de *Glomus aggregatum*, *Glomus brasilianum*, *Glomus clarum*, *Glomus deserticola*, *Glomus etunicatum*, *Glomus fasciculatum*, *Glomus intraradices*, *Glomus monosporum* o *Glomus mosseae*, *Gigaspora margarita*, o una combinación de las mismas.

[0077] En otra forma de realización, la una o más micorrizas es una ectomicorriza del filo *Basidiomycota*, *Ascomycota* y *Zygomycota*. En otra forma de realización más, la ectomicorriza es una cepa de *Laccaria bicolor*, *Laccaria laccata*, *Pisolithus tinctorius*, *Rhizopogon amylopogon*, *Rhizopogon fulvigleba*, *Rhizopogon luteolus*, *Rhizopogon villosuli*, *Scleroderma cepa*, *Scleroderma citrinum* o una combinación de las mismas.

[0078] En otra forma de realización más, la una o más micorrizas es una micorriza ericoide, una micorriza arbutoide o una micorriza monotropoide. Las arbusculares y las ectomicorrizas forman una micorriza ericoide con muchas plantas pertenecientes al orden Ericales, mientras que algunas Ericales forman micorrizas arbutoides y monotropoides. Todas las orquídeas son micoheterotróficas en alguna fase durante su ciclo vital y forman micorrizas de orquídeas con una variedad de hongos basidiomicetos. En una forma de realización, la micorriza puede ser una micorriza ericoide, preferiblemente del filo *Ascomycota*, tal como *Hymenoscyphous ericae* u *Oidiodendron* sp. En otra forma de realización, la micorriza también puede ser una micorriza arbutoide, preferiblemente del filo *Basidiomycota*. En otra forma de realización, la micorriza puede ser una micorriza monotropoide, preferiblemente del filo *Basidiomycota*. En otra forma de realización más, la micorriza puede ser una micorriza de orquídea, preferiblemente del género *Rhizoctonia*.

40 Micronutriente(s):

[0079] En otra forma de realización más, las composiciones descritas en la presente pueden comprender uno o más micronutrientes beneficiosos. Los ejemplos no limitativos de micronutrientes para usar en las composiciones descritas en la presente incluyen vitaminas, (por ejemplo, vitamina A, complejo de vitamina B (es decir, vitamina B₁, vitamina B₂, vitamina B₃, vitamina B₅, vitamina B₆, vitamina B₇, vitamina B₈, vitamina B₉, vitamina B₁₂, colina), vitamina C, vitamina D, vitamina E, vitamina K, carotenoides (α-caroteno, β-caroteno, criptoxantina, luteína, licopeno, zeaxantina, etc.), macrominerales (por ejemplo, calcio, magnesio, potasio, sodio, hierro, etc.), oligoelementos (por ejemplo, boro, cobalto, cloruro, cromo, cobre, fluoruro, yodo, hierro, manganeso, molibdeno, selenio, zinc, etc.), ácidos orgánicos (por ejemplo, ácido acético, ácido cítrico, ácido láctico, ácido málico, taurina, etc.) y combinaciones de los mismos.

50 [0080] En una forma de realización particular, las composiciones comprenden boro, cloro, cobre, hierro, manganeso, molibdeno, zinc o combinaciones de los mismos.

Bioestimulante(s):

[0081] En una forma de realización, las composiciones descritas en la presente pueden comprender uno o más bioestimulantes beneficiosos. Los bioestimulantes pueden mejorar los procesos metabólicos o fisiológicos tales

como la respiración, la fotosíntesis, la absorción de ácidos nucleicos, la absorción de iones, el suministro de nutrientes o una combinación de los mismos. Los ejemplos no limitativos de bioestimulantes incluyen extractos de algas (por ejemplo, *Ascophyllum nodosum*), ácidos húmicos (por ejemplo, humato de potasio), ácidos fúlvicos, mioinositol, glicina y combinaciones de los mismos. En otra forma de realización, las composiciones comprenden extractos de algas, ácidos húmicos, ácidos fúlvicos, mioinositol, glicina y combinaciones de los mismos.

Polímero(s):

[0082] En una forma de realización, las composiciones descritas en la presente pueden comprender además uno o más polímeros. Los usos no limitativos de polímeros en la industria agrícola incluyen el suministro agroquímico, la eliminación de metales pesados, la retención de agua y/o el suministro de agua, y combinaciones de los mismos. Pouci, et al., Am. J. Agri. & Biol. Sci., 3(1): 299-314 (2008). En una forma de realización, el uno o más polímeros es un polímero natural (por ejemplo, agar, almidón, alginato, pectina, celulosa, etc.), un polímero sintético, un polímero biodegradable (por ejemplo, policaprolactona, polilactida, poli(alcohol de vinilo), etc.), o una combinación de los mismos.

[0083] Para una lista no limitativa de polímeros útiles para las composiciones descritas en la presente, véase Pouci, et al., Am. J. Agri. & Biol. Sci., 3(1): 299-314 (2008). En una forma de realización, las composiciones descritas en la presente comprenden celulosa, derivados de la celulosa, metilcelulosa, derivados de la metilcelulosa, almidón, agar, alginato, pectina, polivinilpirrolidona y combinaciones de los mismos.

Agente(s) humectante(s):

[0084] En una forma de realización, las composiciones descritas en la presente pueden comprender además uno o más agentes humectantes. Los agentes humectantes se usan comúnmente en suelos, particularmente suelos hidrofóbicos, para mejorar la infiltración y/o la penetración de agua en un suelo. El agente humectante puede ser un adyuvante, un aceite, un tensioactivo, un tampón, un acidificante o una combinación de los mismos. En una forma de realización, el agente humectante es un tensioactivo. En una forma de realización, el agente humectante es uno o más tensioactivos no iónicos, uno o más tensioactivos aniónicos o una combinación de los mismos. En otra forma de realización, el agente humectante es uno o más tensioactivos no iónicos.

[0085] Se proporcionan tensioactivos adecuados para las composiciones descritas en la presente en la sección de "tensioactivos".

Tensioactivo(s):

[0086] Los tensioactivos adecuados para las composiciones descritas en la presente pueden ser tensioactivos no iónicos (por ejemplo, semipolares y/o aniónicos y/o catiónicos y/o zwitteriónicos). Se prevé que el/los tensioactivo(s) provocará el menor daño posible a la actividad de la una o más cepas depositadas y/o el uno o más microorganismos beneficiosos. Los tensioactivos pueden humedecer y emulsionar suelo(s) y/o suciedad(es). Se prevé que los tensioactivos usados en la composición descrita tengan una baja toxicidad para los microorganismos contenidos en la formulación. Se prevé además que los tensioactivos usados en la composición descrita tengan una baja fitotoxicidad (es decir, el grado de toxicidad que una sustancia o combinación de sustancias tiene en una planta). Puede usarse un único tensioactivo o una mezcla de varios tensioactivos.

Tensioactivos aniónicos

[0087] También se pueden usar en las composiciones tensioactivos aniónicos o mezclas de tensioactivos no iónicos y aniónicos. Los tensioactivos aniónicos son tensioactivos que tienen una fracción hidrofílica en un estado aniónico o cargado negativamente en solución acuosa. Las composiciones descritas en la presente pueden comprender uno o más tensioactivos aniónicos. El/los tensioactivo(s) aniónico(s) pueden ser tensioactivos aniónicos hidrosolubles, tensioactivos aniónicos insolubles en agua o una combinación de tensioactivos aniónicos hidrosolubles y tensioactivos aniónicos insolubles en agua. Los ejemplos no limitativos de tensioactivos aniónicos incluyen ácidos sulfónicos, ésteres de ácido sulfúrico, ácidos carboxílicos y sales derivadas. Los ejemplos no limitativos de tensioactivos aniónicos hidrosolubles incluyen alquilsulfatos, alquil éter sulfatos, sulfatos de alquilamidoéter, sulfatos de alquilarilpoliéter, alquilarilsulfatos, alquilarilsulfonatos, sulfatos de monoglicérido, alquilsulfonatos, alquilamidasulfonatos, alquilarilsulfonatos, bencenosulfonatos, toluenosulfonatos, xilenosulfonatos, cumenosulfonatos, alquilbencenosulfonatos, alquil difenil óxido sulfonato, sulfonatos de alfa-olefinas, alquilnaftalenosulfonatos, sulfonatos de parafina, sulfonatos de lignina, alquil sulfosuccinatos, sulfosuccinatos etoxilados, alquil éter sulfosuccinatos, sulfosuccinatos de alquilamida, alquilsulfosuccinamato, alquilsulfoacetatos, fosfatos de alquilo, éster de fosfato, alquil éter fosfatos, acilsarconinatos, acilisetionatos, N-acil tauratos, N-acil-N-alquiltauratos, alquilcarboxilatos o una combinación de los mismos.

Tensioactivos no iónicos

[0088] Los tensioactivos no iónicos son tensioactivos que no tienen carga eléctrica cuando están disueltos o dispersados en un medio acuoso. En al menos una forma de realización de la composición descrita en la presente, se usan uno o más tensioactivos no iónicos, dado que proporcionan las acciones de humectación y de emulsión deseadas y no inhiben significativamente la estabilidad y la actividad de las esporas. El/los tensioactivo(s) no iónico(s) pueden ser tensioactivos no iónicos hidrosolubles, tensioactivos no iónicos insolubles en agua o una combinación de tensioactivos no iónicos hidrosolubles y tensioactivos no iónicos insolubles en agua.

Tensioactivos no iónicos insolubles en agua

[0089] Los ejemplos no limitativos de tensioactivos no iónicos insolubles en agua incluyen de alquilo y arilo: éteres de glicerol, éteres de glicol, etanolamidas, sulfoanilamidas, alcoholes, amidas, alcoholes etoxilados, ésteres de glicerol, ésteres de glicol, etoxilatos de éster de glicerol y ésteres de glicol, alquilpoliglicósidos a base de azúcar, ácidos grasos polioxietilenados, condensados de alcanolamina, alcanolamidas, glicoles acetilénicos terciarios, mercaptanos polioxietilenados, ésteres de ácido carboxílico, polioxiproilenoglicoles polioxietilenados, ésteres grasos de sorbitán o combinaciones de los mismos. También están incluidos los copolímeros en bloque de EO/PO (EO es óxido de etileno, PO es óxido de propileno), polímeros y copolímeros de EO, poliaminas y polivinilpirlidonas.

Tensioactivos no iónicos hidrosolubles

[0090] Los ejemplos no limitativos de tensioactivos no iónicos hidrosolubles incluyen alcoholes etoxilados de ácidos grasos de sorbitán y etoxilatos de ésteres de ácidos grasos de sorbitán.

20 Combinación de tensioactivos no iónicos

[0091] En una forma de realización, las composiciones descritas en la presente comprenden al menos uno o más tensioactivos no iónicos. En una forma de realización, las composiciones comprenden al menos un tensioactivo no iónico insoluble en agua y al menos un tensioactivo no iónico hidrosoluble. En otra forma de realización más, las composiciones comprenden una combinación de tensioactivos no iónicos con cadenas de hidrocarburos de sustancialmente la misma longitud.

Otros tensioactivos

[0092] En otra forma de realización, las composiciones descritas en la presente también pueden comprender tensioactivos de organosilicona, antiespumantes a base de silicona usados como tensioactivos a base de silicona y antiespumantes a base de aceite mineral. En otra forma de realización, las composiciones descritas en la presente también pueden comprender sales de metales alcalinos de ácidos grasos (por ejemplo, sales de metales alcalinos hidrosolubles de ácidos grasos y/o sales de metales alcalinos insolubles en agua de ácidos grasos).

Herbicida(s):

[0093] En una forma de realización, las composiciones descritas en la presente pueden comprender además uno o más herbicidas. En una forma de realización particular, el herbicida puede ser un herbicida preemergente, un herbicida postemergente o una combinación de los mismos.

[0094] Los herbicidas adecuados incluyen herbicidas químicos, herbicidas naturales (por ejemplo, bioherbicidas, herbicidas orgánicos, etc.) o combinaciones de los mismos. Los ejemplos no limitativos de herbicidas adecuados incluyen bentazona, acifluorfen, clorimurón, lactofeno, clomazona, fluazifop, glufosinato, glifosato, setoxidim, imazetapir, imazamox, fomesafén, flumiclorac, imazaquin, cletodim, pendimetalina; 3,4-dimetil-2,6-dinitro-*N*-pentan-3-il-anilina; *N*-(1-etilpropil)-2,6-dinitro-3,4-xilidina; pronamida; propizamida; 3,5-dicloro-*N*-(1,1-dimetilpropinil)benzamida; 3,5-dicloro-*N*-(1,1-dimetil-2-propinil)benzamida; *N*-(1,1-dimetilpropinil)-3,5-diclorobenzamida; *S*-etil *N*-etiltiociclohexanocarbamato; trifluralina; 2,6-dinitro-*N,N*-dipropil-4-(trifluorometil)anilina; glifosato; *N*-(fosfonometil)glicina; y derivados de los mismos. En una forma de realización, el uno o más herbicidas para el uso conforme a esta divulgación incluyen pronamida (comercialmente denominado Kerb®); propizamida; 3,5-dicloro-*N*-(1,1-dimetilpropinil)benzamida; 3,5-dicloro-*N*-(1,1-dimetil-2-propinil)benzamida; *N*-(1,1-dimetilpropinil)-3,5-diclorobenzamida; cicloato, *S*-etil *N*-etiltiociclohexanocarbamato (comercialmente denominado Ro-Neet®); trifluralina; 2,6-dinitro-*N,N*-dipropil-4-(trifluorometil)anilina; glifosato; *N*-(fosfonometil)glicina; y derivados de los mismos. Productos comerciales que contienen cada uno de estos compuestos están fácilmente disponibles.

Por lo general, la concentración de herbicida en la composición corresponderá al índice de utilización marcado para un herbicida particular.

Fungicida(s):

5 [0095] En una forma de realización, las composiciones descritas en la presente pueden comprender además uno o más fungicidas. Los fungicidas útiles para las composiciones descritas en la presente presentarán adecuadamente actividad contra una amplia variedad de patógenos, incluidos, pero de forma no limitativa, *Phytophthora*, *Rhizoctonia*, *Fusarium*, *Pythium*, *Phomopsis* o *Sclerotinia* y *Phakopsora* y combinaciones de los mismos.

10 [0096] Los ejemplos no limitativos de fungicidas comerciales que pueden ser adecuados para las composiciones descritas en la presente incluyen PROTÉGÉ, RIVAL o ALLEGIANCE FL o LS (Gustafson, Plano, TX), WARDEN RTA (Agrilance, St. Paul, MN), APRON XL, APRON MAXX RTA o RFC, MAXIM 4FS o XL (Syngenta, Wilmington, DE), CAPTAN (Arvesta, Guelph, Ontario) y PROTREAT (Nitragin Argentina, Buenos Aires, Argentina). Los ingredientes activos en estos y otros fungicidas comerciales incluyen, pero de forma no limitativa, fludioxonil, mefenoxam, azoxistrobin y metalaxil. Los fungicidas comerciales son más adecuadamente utilizados de acuerdo con las instrucciones del fabricante en las concentraciones recomendadas.

15 Insecticida(s):

[0097] En una forma de realización, las composiciones descritas en la presente pueden comprender además uno o más insecticidas. Los insecticidas útiles para las composiciones descritas en la presente presentarán adecuadamente actividad contra una amplia variedad de insectos incluidos, pero de forma no limitativa, gusanos de alambre, gusanos cortadores, larvas, gusano de la raíz del maíz, moscas del maíz, escarabajos pulga, chinches de los cereales, pulgones, crisomélidos, chinches apestosas y combinaciones de los mismos.

20

[0098] Los ejemplos no limitativos de insecticidas comerciales que pueden ser adecuados para las composiciones descritas en la presente incluyen CRUISER (Syngenta, Wilmington, DE), GAUCHO y PONCHO (Gustafson, Plano, TX). Los ingredientes activos en estos y otros insecticidas comerciales incluyen tiametoxam, clotianidina e imidacloprid. Los insecticidas comerciales son más adecuadamente utilizados de acuerdo con las instrucciones del fabricante en las concentraciones recomendadas.

25

MÉTODOS

[0099] En otro aspecto, se describen métodos para usar las cepas depositadas y las composiciones descritas en la presente.

30 [0100] En una forma de realización se describe un método para aumentar la disponibilidad del fósforo para la absorción por las plantas del suelo. El método comprende la introducción en el suelo de la cepa de *Penicillium bilaiae* aislada con el número de registro de depósito NRRL B-50788.

[0101] En una forma de realización particular, el método comprende introducir un inóculo de la cepa de *Penicillium bilaiae* aislada con el número de registro de depósito NRRL B-50788.

35 [0102] En otra forma de realización más, la etapa de introducción en el suelo de un inóculo de la cepa de *Penicillium bilaiae* aislada con el número de registro de depósito NRRL B-50788 comprende la introducción en el suelo de una o más de las composiciones descritas en la presente. El/los inóculo(s) o composiciones se pueden introducir en el suelo según métodos conocidos por las personas expertas en la técnica. Los ejemplos no limitativos incluyen la introducción en surco, la pulverización, el recubrimiento de semillas, la introducción foliar, etc. En una forma de realización particular, la etapa de introducción comprende la introducción en surco del inóculo o las composiciones descritas en la presente.

40

[0103] En algunas formas de realización, la etapa de introducción en el suelo de la cepa de *Penicillium bilaiae* aislada con el número de registro de depósito NRRL B-50788 comprende introducir una cantidad eficaz de la cepa de *Penicillium bilaiae* aislada con el número de registro de depósito NRRL B-50788. En determinadas formas de realización, la etapa de introducción en el suelo de un inóculo de la cepa de *Penicillium bilaiae* aislada con el número de registro de depósito NRRL B-50788 comprende introducir el inóculo en el suelo en una cantidad de 1×10^1 - 1×10^8 , más preferiblemente 1×10^6 - 1×10^{12} unidades formadoras de colonias por hectárea. En otras formas de realización determinadas, la etapa de introducción en el suelo de un inóculo de la cepa de *Penicillium bilaiae* aislada con el número de registro de depósito NRRL B-50788 comprende introducir la cepa fúngica depositada como una semilla recubierta con 1×10^1 - 1×10^8 , más preferiblemente 1×10^2 - 1×10^6 unidades formadoras de colonias por semilla.

45

50

- 5 [0104] Además, el método puede comprender poner en contacto la cepa de *Penicillium bilaiae* aislada con el número de registro de depósito NRRL B-50788 con una o más fuentes de fósforo, por ejemplo, añadiendo una o más fuentes de fósforo al suelo. La etapa de adición de una fuente de fósforo puede ocurrir antes, después o durante la etapa de introducción de un inóculo en el suelo. En otra forma de realización más, la una o más fuentes de fósforo pueden ser un ingrediente en una composición descrita en la presente. Según el método descrito en la presente, se puede usar cualquier fuente de fósforo que sea capaz de ser solubilizada por las cepas depositadas.
- [0105] En una forma de realización, la una o más fuentes de fósforo son fosfato de roca.
- 10 [0106] En otra forma de realización, la una o más fuentes de fósforo son fertilizantes que comprenden una o más fuentes de fósforo. Los fertilizantes de fosfato fabricados disponibles comercialmente son de muchos tipos. Algunos comunes son aquellos que contienen fosfato de roca, fosfato de monoamonio, fosfato diamónico, fosfato monocálcico, superfosfato, superfosfato triple y/o polifosfato de amonio. Todos estos fertilizantes se producen por procesamiento químico de fosfatos de roca naturales insolubles en instalaciones de fabricación de fertilizantes a gran escala y el producto es costoso. Por medio de la presente invención es posible reducir la cantidad de estos fertilizantes aplicados al suelo mientras todavía se mantiene la misma cantidad de absorción de fósforo del suelo.
- 15 [0107] En otra forma de realización más, la una o más fuentes de fósforo son fuentes de fósforo orgánico. En otra forma de realización particular, la fuente o fósforo es un fertilizante orgánico. Un fertilizante orgánico se refiere a una enmienda de suelo derivada de fuentes naturales que garantiza, al menos, los porcentajes mínimos de nitrógeno, fosfato y potasa. Los ejemplos no limitativos de fertilizantes orgánicos incluyen productos derivados vegetales y animales, polvos de roca, algas, inoculantes y acondicionadores. Estos están a menudo disponibles en centros de jardinería y a través de compañías de suministro hortícola. En particular, la fuente orgánica de fósforo es de harina de huesos, harina de carne, estiércol animal, compost, lodo de depuradora o guano, o combinaciones de los mismos.
- 20 [0108] En otra forma de realización más, la una o más fuentes de fósforo pueden ser una combinación de fuentes de fósforo, incluidas, pero de forma no limitativa, fosfato de roca, fosfato de monoamonio, fosfato diamónico, fosfato monocálcico, superfosfato, superfosfato triple, polifosfato de amonio, fertilizantes que comprenden una o más fuentes de fósforo, una o más fuentes de fósforo orgánico, y combinaciones de las mismas.
- 25 [0109] En otro aspecto, el método comprende cultivar plantas en un suelo que comprende una o más fuentes de fósforo y la cepa de *Penicillium bilaiae* aislada con el número de registro de depósito NRRL B-50788.
- 30 [0110] En una forma de realización particular, el método comprende un inóculo de la cepa de *Penicillium bilaiae* aislada con el número de registro de depósito NRRL B-50788.
- 35 [0111] En una forma de realización particular, la etapa de introducción en el suelo de la cepa de *Penicillium bilaiae* aislada con el número de registro de depósito NRRL B-50788 comprende la introducción en el suelo de una o más de las composiciones descritas en la presente. En algunas formas de realización, la composición comprende una cantidad eficaz de la cepa de *Penicillium bilaiae* aislada con el número de registro de depósito NRRL B-50788. En determinadas formas de realización, la etapa de introducción en el suelo de un inóculo de la cepa de *Penicillium bilaiae* aislada con el número de registro de depósito NRRL B-50788 comprende introducir el inóculo en el suelo en una cantidad de 1×10^1 - 1×10^8 , más preferiblemente 1×10^6 - 1×10^{12} unidades formadoras de colonias por hectárea. En otras determinadas formas de realización, la etapa de introducción en el suelo de un inóculo de la cepa de *Penicillium bilaiae* aislada con el número de registro de depósito NRRL B-50788 comprende introducir la cepa fúngica depositada como una semilla recubierta con 1×10^1 - 1×10^8 , más preferiblemente 1×10^2 - 1×10^6 unidades formadoras de colonias por semilla.
- 40 [0112] En una forma de realización, el método además incluye las etapas de introducir la una o más fuentes de fósforo antes o durante la etapa de crecimiento e introducir el inóculo de la cepa de *Penicillium bilaiae* aislada con el número de registro de depósito NRRL B-50788 antes o durante la etapa de crecimiento. La introducción de la una o más fuentes de fósforo y la introducción del inóculo de la cepa de *Penicillium bilaiae* aislada con el número de registro de depósito NRRL B-50788 puede ocurrir al mismo tiempo, sustancialmente al mismo tiempo o en tiempos diferentes. En otra forma de realización, las etapas de introducción se pueden repetir según sea necesario.
- 45 [0113] En una forma de realización, la una o más fuentes de fósforo son fosfato de roca.
- 50 [0114] En otra forma de realización, la una o más fuentes de fósforo son fertilizantes que comprenden una o más fuentes de fósforo. Los fertilizantes de fosfato fabricados disponibles comercialmente son de muchos tipos. Algunos comunes son aquellos que contienen fosfato de roca, fosfato de monoamonio, fosfato diamónico, fosfato monocálcico, superfosfato, superfosfato triple y/o polifosfato de amonio. Todos estos fertilizantes se producen por

procesamiento químico de fosfatos de roca naturales insolubles en instalaciones de fabricación de fertilizantes a gran escala y el producto es costoso. Por medio de la presente invención es posible reducir la cantidad de estos fertilizantes aplicados al suelo mientras todavía se mantiene la misma cantidad de absorción de fósforo del suelo.

5 [0115] En otra forma de realización más, la una o más fuentes de fósforo son fuentes de fósforo orgánico. En otra forma de realización particular, la fuente o fósforo es un fertilizante orgánico. Un fertilizante orgánico se refiere a una enmienda de suelo derivada de fuentes naturales que garantiza, al menos, los porcentajes mínimos de nitrógeno, fosfato y potasa. Los ejemplos no limitativos de fertilizantes orgánicos incluyen productos derivados vegetales y animales, polvos de roca, algas, inoculantes y acondicionadores. Estos están a menudo disponibles en centros de jardinería y a través de compañías de suministro hortícola. En particular, la fuente orgánica de fósforo es de harina de huesos, harina de carne, estiércol animal, compost, lodo de depuradora o guano, o combinaciones de los mismos.

15 [0116] En otra forma de realización más, la una o más fuentes de fósforo pueden ser una combinación de fuentes de fósforo, incluidas, pero de forma no limitativa, fosfato de roca, fosfato de monoamonio, fosfato diamónico, fosfato monocálcico, superfosfato, superfosfato triple, polifosfato de amonio, fertilizantes que comprenden una o más fuentes de fósforo, una o más fuentes de fósforo orgánico, y combinaciones de las mismas.

20 [0117] Los métodos descritos en la presente son potencialmente útiles para mejorar las condiciones de crecimiento dando como resultado mayor absorción de fósforo y/o rendimiento para cualquier tipo de planta. En una forma de realización particular, la planta se selecciona del grupo que consiste en no leguminosas, leguminosas, *Brassica* spp., cereales, frutas, verduras, frutos secos, flores y césped. En particular, los cereales son trigo, maíz, arroz, avena, centeno, cebada. En particular, las leguminosas son lenteja, garbanzos, judías, semillas de soja, guisantes y alfalfa.

25 [0118] En otra forma de realización particular, las plantas se seleccionan del grupo que consiste 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, brócoli, nabo, rábano, espinaca, cebolla, ajo, berenjena, pimienta, apio, zanahoria, zapallo, calabaza, calabacín, pepino, manzana, pera, melón, cítrico, fresa, uva, frambuesa, piña, soja, tabaco, tomate, sorgo y caña de azúcar.

RECUBRIMIENTOS DE SEMILLAS

[0119] En otro aspecto, las semillas se recubren con la cepa de *Penicillium bilaiae* aislada con el número de registro de depósito NRRL B-50788.

30 [0120] En una forma de realización, las semillas se pueden tratar con una composición o composiciones descrita(s) en la presente de varias maneras, pero preferiblemente mediante pulverización o goteo. El tratamiento por pulverización y goteo se puede realizar formulando composiciones descritas en la presente y pulverizando o haciendo gotear la composición o las composiciones sobre una semilla(s) mediante un sistema de tratamiento continuo (que se calibra para aplicar el tratamiento con una velocidad predefinida en proporción al flujo continuo de semilla), tal como una tratadora de tipo tambor. También pueden emplearse sistemas por lotes, en los que se suministran a un mezclador un tamaño de lote predeterminado de semilla y una composición o composiciones como se describe en la presente. Los sistemas y aparatos para realizar estos procesos están disponibles comercialmente de numerosos proveedores, por ejemplo, Bayer CropScience (Gustafson).

40 [0121] En otra forma de realización, el tratamiento implica recubrir semillas. Un tal proceso implica recubrir la pared interna de un recipiente redondo con la composición o las composiciones descrita(s) en la presente, añadir semillas, luego girar el recipiente para hacer que las semillas contacten con la pared y la composición o las composiciones, un proceso conocido en la técnica como "recubrimiento del recipiente". Las semillas pueden recubrirse por combinaciones de métodos de recubrimiento. Normalmente, el remojo implica usar formas líquidas de las composiciones descritas. Por ejemplo, las semillas se pueden remojar durante de aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 24 horas (por ejemplo, durante al menos 1 min, 5 min, 10 min, 20 min, 40 min, 80 min, 3 h, 6 h, 12 h, 24 h).

45 [0122] En determinadas formas de realización, una semilla(s) recubierta(s) con una o más de las composiciones descritas en la presente comprenderá(n) 1×10^1 - 1×10^8 , más preferiblemente 1×10^2 - 1×10^6 unidades formadoras de colonias de la cepa de *Penicillium bilaiae* aislada por semilla.

EJEMPLOS

[0123] Los ejemplos siguientes se proporcionan para uso ilustrativo y no pretenden limitar el ámbito de la invención como se reivindica en la presente.

Materiales y métodos

Depósito de material biológico

- 5 [0124] El siguiente material biológico se ha depositado según los términos del tratado de Budapest en la Agricultural Research Service Culture Collection, 1815 North University Street, Peoria, Illinois 61604, EE.UU., y se les ha dado los siguientes números:

Identificación	Número de registro	Fecha de depósito
<i>Penicillium bilaiae</i>	NRRL B-50776	01 de octubre de 2012
<i>Penicillium bilaiae</i>	NRRL B-50777	01 de octubre de 2012
<i>Penicillium bilaiae</i>	NRRL B-50778	01 de octubre de 2012
<i>Penicillium bilaiae</i>	NRRL B-50779	01 de octubre de 2012
<i>Penicillium bilaiae</i>	NRRL B-50780	01 de octubre de 2012
<i>Penicillium bilaiae</i>	NRRL B-50781	01 de octubre de 2012
<i>Penicillium bilaiae</i>	NRRL B-50782	01 de octubre de 2012
<i>Penicillium bilaiae</i>	NRRL B-50783	01 de octubre de 2012
<i>Penicillium bilaiae</i>	NRRL B-50784	01 de octubre de 2012
<i>Penicillium bilaiae</i>	NRRL B-50785	01 de octubre de 2012
<i>Penicillium bilaiae</i>	NRRL B-50786	01 de octubre de 2012
<i>Penicillium bilaiae</i>	NRRL B-50787	01 de octubre de 2012
<i>Penicillium bilaiae</i>	NRRL B-50788	01 de octubre de 2012

- 10 [0125] La cepa se ha depositado bajo condiciones que aseguran que el acceso al cultivo estará disponible durante la pendency de esta solicitud de patente a uno determinado por el Comisionado de patentes y marcas registradas autorizado a ello bajo 37 C.F.R. §1.14 y 35 U.S.C. §122. El depósito representa un cultivo puro de la cepa depositada. El depósito está disponible según sea requerido por las leyes de patentes extranjeras en países donde se solicitan equivalentes de la solicitud objeto o su progenie. Sin embargo, debe entenderse que la disponibilidad de un depósito no constituye una licencia para practicar la invención objeto en derogación de los derechos de patente otorgados por acción gubernamental.

15 Ejemplo 1: ensayos de solubilización de fosfato

- 20 [0126] Se efectuó un cultivo fúngico para ensayos de solubilización de fosfato en placas de microbiorreactor de 96 pocillos (EnzyScreen, Países Bajos) en 1,5 ml de medio mínimo de sales libre de nitrato (tabla 1). Las placas se inocularon a partir de placas madre de suspensión de esporas en glicerol almacenadas a 80 °C usando un replicador criogénico de 96 puntas que se esterilizó por calor y se enfrió antes de la transferencia. Las placas se cultivaron a temperatura ambiente (20-25 °C) y 300 r.p.m. durante 14 días. Después de 14 días, la placa se centrifugó durante 5 minutos a 5100 r.p.m. y se transfirió 1 ml del sobrenadante a una placa de filtración de 96 pocillos (placa de filtración multipocillo de 96 AcroPrep Advance, fibra de vidrio de 1µm, Pall Life Sciences n.º 8231). La placa de filtración se colocó sobre una placa receptora de 2 ml (Whatman Uniplate de 96 pocillos de fondo redondo, Whatman n.º 7701-5200) y las muestras se filtraron al vacío usando un colector a vacío de placas multipocillo (Pall Life Sciences n.º 5017). Los sobrenadantes filtrados se diluyeron 100X con agua estéril y el fosfato soluble se midió usando un espectrofotómetro de lectura de placas (Biotek, Winooski, VT) con el kit BioVision Phosphate Colorimetric Assay Kit (BioVision Research Products, Mountain View, CA) y las instrucciones que lo acompañan. Cada aislado se cultivó y se evaluó la solubilización de fosfato por triplicado y se calcularon el promedio y las desviaciones estándar. Los resultados se proporcionan en la tabla 2.

30 **Tabla 1:** medios mínimos de sales libres de nitrato (NFMSM).

Componente	g/L
NaCl	0,1
NH ₄ Cl	0,4
CaCl ₂ *2H ₂ O	0,1

MgSO ₄ *7H ₂ O	1,0
sacarosa	10,0
hidroxiapatita	5,41

Tabla 2. Solubilización de fosfato a partir de hidroxiapatita por híbridos y sus progenitores. Los números representan el promedio \pm desviación típica de 3 réplicas.

Aislado	Promedio de P ₂ O ₅ solubilizado
ATCC 20851 (progenitor)	883 \pm 92
V08/021001 (progenitor)	849 \pm 52
ATCC 22348 (progenitor)	1047 \pm 115
NRRL B-50776	1174 \pm 210
NRRL B-50777	1089 \pm 95
NRRL B-50778	1066 \pm 172
NRRL B-50779	1108 \pm 99
NRRL B-50780	892 \pm 101
NRRL B-50781	870 \pm 43
NRRL B-50782	1009 \pm 100
NRRL B-50783	1228 \pm 294
NRRL B-50784	886 \pm 56
NRRL B-50785	881 \pm 174
NRRL B-50786	961 \pm 97
NRRL B-50787	976 \pm 116
NRRL B-50788	1085 \pm 72

[0127] Los resultados indican que todos los aislados solubilizaron más fosfato que la cepa parental V08/021001. Los resultados indican además que 11 de 13 aislados solubilizaron más fosfato que la cepa parental ATCC 20851. 5 aislados solubilizaron más fosfato que la cepa parental ATCC 22348.

Ejemplo 2: producción de ácido glucónico de híbridos

[0128] La producción de ácido orgánico está correlacionada con la capacidad para solubilizar fosfato. Algunos ácidos orgánicos, sin embargo, pueden ser tóxicos para las plantas (J.A.L. van Kan, Trends in Plant Science 11: 247-253 (2006)). El ácido glucónico no es tóxico para las plantas y su producción por *P. bilaiae* muestra una fuerte correlación con la solubilización de fosfato. La producción de ácido glucónico por 5 de los aislados y sus respectivos progenitores se estudió usando la cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC). Veinte μ l del sobrenadante del ejemplo 1 se corrieron a través de una columna de HPLC (columna Restek Allure Organic Acids (250 x 4,6 mm; 5 μ m)) a 15 °C. La fase móvil consistió en tampón fosfato 25 mM (ajustado a pH 2,5 con ácido fosfórico) corriendo a 1 ml/min en una Agilent Infinity 1260 HPLC equipada con un detector de red de diodos (DAD). El pico de ácido glucónico se identificó por comparación con un estándar de ácido glucónico puro. El área bajo el pico de ácido glucónico se midió y se promedió a través de tres réplicas del experimento. Los resultados se proporcionan en la tabla 3.

Tabla 3. Producción de ácido glucónico de 5 híbridos y sus progenitores. Los números representan el promedio \pm la desviación típica del área bajo el pico de ácido glucónico de 3 réplicas independientes.

Aislado	Ácido glucónico (unidades arbitrarias)
ATCC 20851 (progenitor)	1984 \pm 65
V08/021001 (progenitor)	1691 \pm 93
ATCC 22348 (progenitor)	2252 \pm 33
NRRL B-50776	2156 \pm 60
NRRL B-50777	2261 \pm 25

ES 2 760 009 T3

NRRL B-50779	2252 ± 48
NRRL B-50783	2245 ± 58
NRRL B-50788	2228 ± 45

[0129] Los resultados indican que todos los aislados produjeron más ácido glucónico que al menos un progenitor y 3 de 5 aislados produjeron más ácido glucónico que su progenitor.

REIVINDICACIONES

1. Cepa de *Penicillium bilaiae* aislada con el número de registro de depósito NRRL B-50788.
2. Composición que comprende un portador y la cepa de *Penicillium bilaiae* aislada con el número de registro de depósito NRRL B-50788.
- 5 3. Composición según la reivindicación 2, donde la composición comprende además una fuente de fósforo.
4. Composición según la reivindicación 2, donde la composición comprende además una o más moléculas de señalización de plantas.
5. Composición según la reivindicación 4, donde la una o más moléculas de señalización de plantas es un lipoquitooligosacárido (LCO).
- 10 6. Composición según la reivindicación 4, donde la una o más moléculas de señalización de plantas es un compuesto quitinoso.
7. Composición según la reivindicación 6, donde el compuesto quitinoso es un quitooligómero (CO).
8. Composición según la reivindicación 4, donde la molécula de señalización de plantas es un flavonoide.
- 15 9. Composición según la reivindicación 8, donde el flavonoide es luteolina, apigenina, tangeritina, quercetina, canferol, miricetina, fisetina, isoramnetina, paquipodol, ramnacina, hesperetina, naringenina, eriodictiol, homoeriodictiol, taxifolina, dihidroquercetina, dihidrocanferol, genisteína, daidzeína, gliciteína, catequina, galocatequina, 3-galato de catequina, 3-galato de galocatequina, epicatequina, epigalocatequina, 3-galato de epicatequina, 3-galato de epigalocatequina, cianidina, delfinidina, malvidina, pelargonidina, peonidina, petunidina, o un derivado de los mismos.
- 20 10. Método para aumentar la disponibilidad del fósforo para la absorción por las plantas del suelo, que comprende la introducción en el suelo de un inóculo de la cepa de *Penicillium bilaiae* aislada con el número de registro de depósito NRRL B-50788.
11. Método según la reivindicación 10, donde el método comprende además añadir una fuente de fósforo al suelo.
- 25 12. Método según la reivindicación 10, donde la etapa de adición de una fuente de fósforo al suelo ocurre antes, después o durante la etapa de introducción en el suelo del inóculo de la una o más cepas fúngicas según la reivindicación 1.
13. Método según la reivindicación 10, donde la etapa de introducción en el suelo del inóculo de la una o más cepas fúngicas según la reivindicación 1 comprende introducir el inóculo en el suelo en una cantidad de 1×10^1 - 1×10^8 , más preferiblemente 1×10^6 - 1×10^{12} unidades formadoras de colonias por hectárea.
- 30 14. Método según la reivindicación 10, donde la etapa de introducción en el suelo del inóculo de la una o más cepas fúngicas según la reivindicación 1 comprende introducir el inóculo como un recubrimiento de semillas.
15. Método según la reivindicación 14, donde el recubrimiento de semillas comprende 1×10^1 - 1×10^8 , más preferiblemente 1×10^2 - 1×10^6 unidades formadoras de colonias por semilla.
- 35 16. Método para aumentar la absorción de fósforo en plantas que comprende el cultivo de las plantas en un suelo que comprende una fuente de fósforo y la cepa de *Penicillium bilaiae* aislada con el número de registro de depósito NRRL B-50788.
17. Método según la reivindicación 16, donde la etapa de adición de una fuente de fósforo al suelo ocurre antes, después o durante la etapa de introducción en el suelo de la cepa de *Penicillium bilaiae* aislada con el número de registro de depósito NRRL B-50788.
- 40 18. Método según la reivindicación 16, donde las plantas son plantas leguminosas.

19. Método según la reivindicación 16, donde las plantas son plantas no leguminosas.

20. Semilla recubierta con la cepa de *Penicillium bilaiae* aislada con el número de registro de depósito NRRL B-50788.