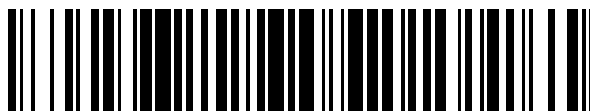


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 790 879**

51 Int. Cl.:

A01N 63/02 (2006.01)

A01P 21/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.12.2017** **PCT/FR2017/053865**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.07.2018** **WO18122541**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.12.2017** **E 17832311 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.02.2020** **EP 3422858**

54 Título: **Composición bioestimulante para el crecimiento de las plantas que contiene lipopéptidos**

30 Prioridad:

30.12.2016 FR 1663540

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

29.10.2020

73 Titular/es:

LIPOFABRIK (100.0%)
Université Lille 1 Batiment Polytech Lille Avenue
Paul Langevin
59655 Villeneuve D'Ascq, FR

72 Inventor/es:

COUTTE, FRANÇOIS;
DELECROIX, ARNAUD;
EL GHAZOUANI, ABDELNASSER y
JACQUES, PHILIPPE

74 Agente/Representante:

SÁNCHEZ SILVA, Jesús Eladio

ES 2 790 879 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

Composición bioestimulante para el crecimiento de las plantas que contiene lipopéptidos

5 Esta invención se refiere al campo de los bioestimulantes usados en la agricultura para promover el crecimiento de las plantas. En particular, la presente invención se refiere al uso de lipopéptidos como agentes bioestimulantes para el crecimiento de plantas.

Las semillas recubiertas con una composición bioestimulante son, además, parte de la invención.

10 Estado de la técnica

El aumento de la demanda de alimentos debido al aumento continuo de la población mundial es un verdadero desafío para el futuro. Los bioestimulantes pueden contribuir efectivamente a este desafío y se usan cada vez más en la producción agrícola global.

15 La velocidad con la que las raíces de una planta alcanzan los nutrientes es un parámetro clave en el desarrollo inicial de la planta y el éxito del crecimiento, usualmente en las primeras semanas. Los bioestimulantes hacen posible mejorar el crecimiento de las plantas al proporcionar nutrientes a base de productos naturales o al ayudar a las plantas a acceder a sus nutrientes.

Los bioestimulantes promueven el crecimiento y el desarrollo de las plantas a lo largo de todo el ciclo de vida del cultivo, desde la germinación de la semilla hasta la madurez de la planta, mejoran la eficiencia del metabolismo de las plantas y conducen a un aumento de la cosecha y una mejor calidad. Estos aumentan la tolerancia de las plantas al estrés abiótico y su capacidad para recuperarse de él. Estos facilitan la asimilación, paso y uso de nutrientes. Estos mejoran la calidad de la producción agrícola, que incluye el contenido de azúcar, color y el tamaño de la fruta. En adición, estos regulan y mejoran el contenido de agua de las plantas. Finalmente, estos aumentan ciertas propiedades fisicoquímicas del suelo y promueven el desarrollo de microorganismos en el campo.

30 El uso de microorganismos o cócteles de microorganismos para la bioestimulación de las plantas se conoce bien. Estos métodos se basan en la aplicación de composiciones que contienen un microorganismo purificado o una mezcla de microorganismos, tales composiciones que contienen cepas de *Bacillus* en particular.

35 Las composiciones bioestimulantes para el crecimiento de las plantas descritas en la literatura contienen cepas de *Bacillus* purificadas, solas o en combinación con otros componentes. Por ejemplo, la solicitud W02016/109332 describe composiciones que contienen un cultivo biológicamente puro de *Bacillus* sp. cepa D747 (presentada como FERM BP-8234). La solicitud W02016/108976 describe composiciones que contienen un cultivo biológicamente puro de *Bacillus pumilus* rti cepa279 (presentada después de la ATCC con el número PTA-121164) que puede aplicarse sola o en combinación con productos químicos u otros agentes microbianos, o ambos, para promover el crecimiento de las plantas y proporcionar protección y/o control contra las enfermedades de las plantas.

45 Sin embargo, existen desventajas para tales composiciones. Para que la composición sea activa, es deseable que el microorganismo esté vivo y sea capaz de multiplicarse en la planta; sin embargo, estas condiciones son difíciles de controlar. En adición, en un contexto agrícola en el que se promueven soluciones ecológicas, el uso de cepas de microorganismos modificados genéticamente es problemático. El documento núm. WO2016/109395 divulga el uso de extractos bacterianos, entre otros, para estimular el crecimiento de las plantas y divulga, además, la presencia de lipopéptidos en tales extractos. Pero el documento no menciona que tales lipopéptidos son responsables del efecto estimulante.

La presente invención proporciona una solución a este problema.

De hecho, los inventores demostraron sorprendentemente que una composición que contiene los lipopéptidos mencionados en la reivindicación 1 puede usarse para estimular el crecimiento de las plantas. Una preparación basada en lipopéptidos tiene la doble ventaja de ser activa por sí misma sin requerir de la producción *in situ* de moléculas bioestimulantes y de ser libre de GMO. Ninguno de los documentos de la técnica anterior describe el uso de tal preparación que contiene lipopéptidos para estimular el crecimiento de las plantas. Así, la presente invención propone un enfoque innovador para la bioestimulación del crecimiento de las plantas.

60 Descripción detallada de la invención

Un primer objeto de la invención se refiere al uso de al menos un lipopéptido como bioestimulante para el crecimiento de las plantas.

65

De hecho, los inventores, por primera vez, demostraron el efecto bioestimulante de los lipopéptidos sobre el crecimiento de las plantas al mostrar el efecto estimulante de una preparación de lipopéptidos purificados. Así, ellos proponen usar lipopéptidos como un agente bioestimulante. El agente bioestimulante puede ser una composición obtenida a partir de un sobrenadante de al menos una cepa de *Bacillus sp.*, una composición concentrada en lipopéptidos o una composición que comprende lipopéptidos purificados.

Los lipopéptidos pueden purificarse, concentrarse o contenerse en un sobrenadante de un cultivo de *Bacillus sp.* para la exclusión de las células productoras. En una modalidad preferida, la composición bioestimulante usada corresponde a una composición concentrada en lipopéptidos o una composición que comprende lipopéptidos purificados.

Como se usa aquí, el término "sobrenadante" se refiere al sobrenadante o extracto de sobrenadante de al menos una cepa de *Bacillus sp.*

Como se usa aquí, el término "composición concentrada de lipopéptidos" se refiere a una solución o composición obtenida mediante la concentración de un sobrenadante de cultivo de al menos una cepa de *Bacillus sp.*

Como se usa aquí, el término "composición que comprende lipopéptidos purificados" se refiere a una solución o composición obtenida mediante la purificación de lipopéptidos a partir de una solución que contiene lipopéptidos tal como un sobrenadante de cultivo de al menos una cepa de *Bacillus sp.* o una composición concentrada de lipopéptidos.

En estas diferentes composiciones, la naturaleza y cantidad y pureza de los lipopéptidos pueden variar.

Como se define aquí, una "composición bioestimulante" es una composición (o solución o preparación) que puede mejorar el crecimiento de las plantas. Los criterios de evaluación del crecimiento aplicables son múltiples; algunos criterios se describen en la parte experimental. Esto implica, por ejemplo, evaluar la ganancia en cuanto al tiempo de germinación, tamaño de la raíz, biomasa o altura de la planta atribuible a la aplicación de la composición bioestimulante. Para verificar si tal preparación tiene propiedades bioestimulantes, dicho sobrenadante puede aplicarse a las partes superiores de la planta mediante regado y/o a nivel de la raíz mediante regado y/o remojo o mediante el recubrimiento/inmersión de las semillas.

Las cepas de *Bacillus sp.* se conocen por su capacidad para producir lipopéptidos. Las cepas de *Bacillus* que pueden usarse en esta invención son cepas naturales o genéticamente modificadas.

En una modalidad particular, las cepas de *Bacillus sp.* se seleccionan de *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus licheniformis*, *Paenibacillus polymixa*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus sphaericus*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus velenzensis* y *Bacillus firmus*, *Bacillus methylotrophicus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus vallismortis*.

Ventajosamente, las cepas de *Bacillus* se eligen de *Bacillus subtilis* y *Bacillus amyloliquefaciens* (recientemente reconocido como *Bacillus velenzensis*). En una modalidad preferida, las cepas de *B. subtilis* se seleccionan de ATCC 6633, ATCC 21332, 168, ATCC 9943 y NCIB 3610 y sus derivados; las cepas de *B. amyloliquefaciens* se seleccionan de FZB42 y LMG S-29032 (conocida, además, como GA1) y sus derivados.

En otra modalidad particular, la composición bioestimulante se obtiene mediante la concentración del sobrenadante. Así, la composición concentrada puede corresponder a una concentración de al menos un factor 2, o incluso un factor 5 o 10 en relación con el sobrenadante recolectado, preferentemente, por al menos un factor 20, y aún con mayor preferencia por al menos un factor 50. La composición bioestimulante puede obtenerse, además, mediante la purificación de los lipopéptidos contenidos en el sobrenadante. Así, es posible proponer soluciones bioestimulantes que tengan una composición determinada, tanto cualitativamente (naturaleza de los lipopéptidos presentes) como cuantitativamente.

Una composición bioestimulante usada de acuerdo con la invención puede definirse, además, por su contenido de lipopéptidos. Así, en una modalidad preferida, una preparación de lipopéptidos de acuerdo con la invención puede contener lipopéptidos a una concentración de al menos 10 mg/L (0,001 %), 20 mg/L, 50 mg/L, 100 mg/L (0,01 %), 200 mg/L, 500 mg/L, 1 g/L (0,1 %), 2 g/L, 5 g/L (0,5 %), 10 g/L (1 %), 20 g/L, 50 g/L, preferentemente, entre 1 % y 7 %, en particular 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 % o 7 %, e incluso con mayor preferencia de al menos 10 %, o al menos 20 %, con el conocimiento de que una solución al 1 % corresponde a una concentración de 10 g/L.

Una composición concentrada en lipopéptidos o una composición que comprende lipopéptidos purificados puede contener entre 0,002 % y 15 % de lipopéptidos, cuya pureza puede variar. En particular, tales composiciones pueden tener una pureza de lipopéptidos mayor o igual al 10 %, preferentemente, mayor o igual al 15 %, 20 %, 30 %, 40 % o 50 %. En una modalidad particularmente preferida, estas composiciones tienen una pureza de

lipopéptidos mayor o igual al 60 %, preferentemente, mayor o igual al 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 % o incluso del 100 %.

Entre los lipopéptidos con propiedades bioestimulantes para el crecimiento de las plantas, los lipopéptidos de las familias de la iturina, surfactina, fengicina, kurstakina y locilomicina son particularmente interesantes en el contexto de esta invención.

La composición bioestimulante se define por su contenido de moléculas que pertenecen a la familia de la iturina y/o moléculas que pertenecen a la familia de la surfactina y/o moléculas que pertenecen a la familia de la fengicina y/o moléculas que pertenecen a la familia de la kurstakina y/o moléculas que pertenecen a la familia de la locilomicina (ver tabla en la Figura 1).

"Moléculas de la familia de la iturina" significa iturina A, mojavensina, micosubtilina, y bacilomicinas A, B, C, D, F y L.

"Moléculas de la familia de la surfactina" significa surfactinas A, B, C, liquenisina y pumilacidina.

"Moléculas de la familia de la fengicina" significa fengicinas A y B, plipastatinas A y B y agrastatina.

Así, por ejemplo, una composición bioestimulante usada, de acuerdo con la invención, puede contener entre 0,002 y 25 % de lipopéptidos, en particular entre 1 y 15 % de lipopéptidos.

En una primera modalidad, esta composición incluye entre 0,002 y 25 % de lipopéptidos en las siguientes proporciones: moléculas que pertenecen a la familia de la iturina 10-90 %, moléculas que pertenecen a la familia de la surfactina 10-90 %, moléculas que pertenecen a la familia de la fengicina 0-50 %.

En una segunda modalidad, esta composición comprende entre 0,002 y 25 % de lipopéptidos en las siguientes proporciones: moléculas que pertenecen a la familia de la iturina 0-100 %, moléculas que pertenecen a la familia de la surfactina 0-100 %, moléculas que pertenecen a la familia de la fengicina 0-100 %.

Otra composición bioestimulante usada de acuerdo con la invención puede contener entre 0,002 y 25 % de lipopéptidos, preferentemente, entre 1 y 15 % de lipopéptidos, en las siguientes proporciones:

- 100 % de surfactina
- 100 % de fengicina
- 100 % de iturina, especialmente micosubtilina
- una mezcla de iturina y surfactina
- una mezcla de micosubtilina y surfactina
- una mezcla de iturina y fengicina
- una mezcla de micosubtilina y fengicina
- una mezcla de surfactina y fengicina
- una mezcla de iturina, que incluye micosubtilina, surfactina y fengicina.

Una composición usada de acuerdo con la invención puede contener, además, metabolitos primarios producidos por dicha cepa, tales como acetoína, 2-3 butanodiol, precursores de auxina y/o enzimas solubilizantes de fosfato.

Ejemplos de composiciones usadas de acuerdo con la invención se describen en la parte experimental.

Las composiciones de lipopéptidos concentrados se describen en el Ejemplo 2. Las composiciones obtenidas por la concentración del sobrenadante de cultivo y que comprenden ya sea 175 mg/L de iturina, en particular iturina, en particular micosubtilina, y 75 mg/L de surfactina A, o 700 mg/L de iturina, en particular micosubtilina, y 300 mg/L de surfactina A, aumentan significativamente el tamaño de las plantas de tomate y la cantidad de biomasa fresca en las partes aéreas de tales plantas. Estas dos composiciones, además, aumentan significativamente la cantidad de biomasa fresca en las partes aéreas y radicales de las plantas de trigo. Otra composición que comprende 350 mg/L de iturina, en particular micosubtilina, y 150 mg/L de surfactina A aumenta significativamente la cantidad de biomasa fresca de las partes aéreas y radicales de las plantas de trigo y el contenido de clorofila de las partes aéreas de estas plantas.

Las composiciones usadas de lipopéptidos purificados de acuerdo con la invención se describen en los Ejemplos 3 y 4. Las composiciones que comprenden iturina purificada, que incluye micosubtilina purificada (99 %), o fengicina purificada (99 %) o una mezcla de iturina, que incluye micosubtilina, y surfactina (79 %) tienen un efecto significativo sobre el crecimiento de las raíces, particularmente después del tratamiento de semillas de tomate (ver Ejemplo 3).

Las composiciones que comprenden lipopéptidos purificados entre 30 % y 99 % en proporciones relativas de 80 % de iturina, en particular micosubtilina, y 20 % de surfactina mejoran la resistencia al estrés hídrico,

especialmente de plantas de tomate. Estos efectos bioestimulantes de las composiciones dan como resultado una ganancia en altura de las plantas de tomate entre el comienzo y el final del estrés hídrico, una mejor eficiencia fotosintética y una mejor conductancia estomática (ver el Ejemplo 4).

5 Para facilitar la penetración de la preparación en la planta, la composición usada de acuerdo con la invención puede contener, además, adyuvantes. Beneficiosamente, el adyuvante facilita la penetración de la composición bioestimulante en la planta. La elección del adyuvante se guía por el efecto deseado. Por ejemplo, los agentes humectantes aumentan la superficie de contacto entre la hoja y la gota mediante el esparcimiento del material bioestimulante y aseguran la retención del producto en la cutícula. Los aceites promueven la penetración de
10 materiales bioestimulantes al "romper" la barrera de las capas de cera epicuticulares de la planta; esto se convierte en una desventaja cuando se conoce que el aceite actuará de la misma manera en las cutículas de plantas cultivadas hasta el punto de debilitar sus defensas naturales contra hongos patógenos. Otros adyuvantes tales como los penetrantes son agentes humectantes que impregnan las cutículas cerosas mientras respetan su integridad. Las sales pueden usarse, además, como adyuvantes, en particular para absorber la humedad del aire y así combatir la desecación. Finalmente, los adhesivos fijan el material bioestimulante en las hojas y limitan la lixiviación y volatilización. Por lo tanto, los adyuvantes deben adaptarse a los modos de acción de los materiales bioestimulantes (raíz, contacto, sistémicos o penetrantes), a los tipos de formulaciones del producto y a los tipos de plantas objetivo (hojas sin pelos o peludas, grosor de la cutícula, etapas de la planta, posiciones de estomas, etc.).

20 Ventajosamente, los adyuvantes se eligen entre surfactantes poliméricos cargados o no cargados, ésteres de alquilpoliglucósidos y ésteres de alquilpoliglucósidos, derivados de sulfonato de naftaleno, derivados celulósicos, polisacáridos naturales, emulsiones a base de silicona...

25 La composición bioestimulante usada de acuerdo con la invención puede, en otra modalidad, contener, además, células, siempre que estas células no correspondan a la cepa o cepas particulares que produjeron el sobrenadante. Las células adicionadas a la preparación pueden tener propiedades específicas para mejorar el efecto bioestimulante de la preparación del sobrenadante o propiedades adicionales, que incluyen propiedades antifúngicas. Así, tales células pueden elegirse de una cepa de *Bacillus* sp. distinta de la usada para producir el
30 sobrenadante, particularmente de entre las cepas de *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus licheniformis*, *Paenibacillus polymixa*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus sphaericus*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus firmus*, *Bacillus velenzensis*, *Bacillus methylophilus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus vallismortis*. Tales células pueden no ser, además, cepas de tipo *Bacillus* sino de *Paenibacillus* sp., *Pseudomonas* sp. (*Pseudomonas cepacia*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas chioraphis*, *Pseudomonas syringae*), *Streptomyces* sp. (*Streptomyces griseoviridis*, *Streptomyces lydicus*). Tales células pueden ser, además, levaduras, hongos micorrícicos o *Trichoderma* sp. o *Pythium* sp....

Puede obtenerse una preparación bioestimulante para el crecimiento de las plantas a través de las etapas de (i) cultivar al menos una cepa de *Bacillus* sp., (ii) incubar en un medio de cultivo adecuado para la secreción de
40 moléculas en el sobrenadante y (iii) recolectar el sobrenadante. En este método, el sobrenadante o un extracto del sobrenadante puede usarse directamente como bioestimulante.

El tiempo de incubación y el medio de cultivo se eligen de acuerdo con las cepas a cultivar; el experto podrá adaptar estos parámetros.

45 En una modalidad particular, la(s) cepa(s) de *Bacillus* usada(s) en este método se eligen, preferentemente, de *Bacillus* sp. *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus licheniformis*, *Paenibacillus polymixa*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus sphaericus*, *Bacillus velenzensis*, *Bacillus firmus*, *Bacillus methylophilus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus vallismortis*. Ventajosamente, las cepas de *Bacillus* se eligen de las cepas de *Bacillus subtilis* y *Bacillus amyloliquefaciens*. En una modalidad preferida, las cepas de *B. subtilis* se seleccionan de ATCC 6633, ATCC 21332, 168, ATCC 9943 y NCIB 3610 y sus derivados; las cepas de *B. amyloliquefaciens* se seleccionan de FZB42 y LMG S-29032 y sus derivados.

55 En adición, este método puede incluir una etapa de concentración del sobrenadante. La concentración de la preparación puede obtenerse mediante el uso de una de las técnicas que se conocen bien por el experto. Por ejemplo, la preparación puede concentrarse mediante ultrafiltración de membrana, evaporación, extracción o precipitación fisicoquímica.

60 Alternativamente, este método puede incluir una etapa de purificación de lipopéptidos. La etapa de purificación produce lipopéptidos purificados ya sea para producir una solución que no contiene más de un tipo de lipopéptido o para producir una solución que contiene una combinación de diferentes lipopéptidos. La purificación de los lipopéptidos puede lograrse mediante el uso de una de las técnicas que se conocen bien por el experto. Por ejemplo, puede mencionarse la secuencia continua de etapas de ultrafiltración, diafiltración y purificación final mediante el uso de solventes orgánicos tales como metanol, etanol, butanol, acetato de etilo y cloroformo, solos o en combinación. Alternativamente, la purificación de los lipopéptidos puede llevarse a cabo mediante

precipitación ácida o mediante el uso de sales de cationes mono o divalentes (tales como sales de amonio, magnesio, calcio, sodio, etc.).

La composición bioestimulante así obtenida puede deshidratarse en forma de un polvo para facilitar su conservación, almacenamiento y transporte. Así puede obtenerse una composición bioestimulante como se definió anteriormente mediante la disolución de un polvo de sobrenadante para obtener la concentración deseada en moléculas de interés, en particular lipopéptidos.

En una modalidad particular, la preparación bioestimulante puede aplicarse mediante tratamiento foliar para obtener una ganancia significativa en materia foliar y/o de raíz y/o fruta y/o vegetales y/o cereales. Este tratamiento puede aplicarse, por ejemplo, mediante pulverización de la composición bioestimulante.

En otra modalidad particular, la composición bioestimulante puede aplicarse mediante tratamiento de la raíz para obtener una ganancia significativa de material foliar y/o de raíz y/o de fruta y/o vegetal y/o cereal. Este tratamiento puede aplicarse, por ejemplo, mediante el riego con la preparación bioestimulante.

En otra modalidad, la composición bioestimulante puede aplicarse mediante tratamiento de las semillas para obtener una ganancia significativa en material foliar y/o de raíz y/o fruta y/o vegetal y/o cereal. Este tratamiento puede aplicarse, por ejemplo, mediante el recubrimiento con la preparación bioestimulante.

Los bulbos ornamentales pueden tratarse con una composición bioestimulante usada en esta invención para obtener una ganancia significativa en el material de las hojas.

El recubrimiento de una semilla en particular pretende mejorar el crecimiento inicial de la planta.

Descripción de las figuras

Figura 1: Tabla descriptiva de las masas moleculares de los principales lipopéptidos producidos por *Bacillus sp.*

Figura 2: Medición de la altura de las plantas de tomate después de la aplicación de composiciones concentradas derivadas de *Bacillus sp.* Las alturas de las plantas se midieron después de la aplicación de composiciones que contienen: (modalidad 1) composición derivada de sobrenadante de *Bacillus amyloliquefaciens* que contiene concentraciones finales para el tratamiento con 90 mg/L de iturina A, 100 mg/L de fengicina A y B y 60 mg/L de surfactina A; (modalidad 2) composición de sobrenadante de *Bacillus subtilis* que contiene concentraciones finales para el tratamiento con 175 mg/L de micosubtilina y 75 mg/L de surfactina A; (modalidad 3) composición de sobrenadante de *Bacillus subtilis* que contiene concentraciones finales para el tratamiento con 700 mg/L de micosubtilina y 300 mg/L de surfactina A. El análisis reveló un efecto significativo del tratamiento en la altura de la planta ($P=0,0029$). Los grupos estadísticos se indican en el gráfico por las letras a y b.

Figura 3: Medición del peso de biomasa fresca de las partes aéreas de las plantas de tomate después de la aplicación de composiciones concentradas derivadas de sobrenadante de cultivo de *Bacillus sp.* Los pesos de biomasa fresca de las partes aéreas de las plantas de tomate se midieron después de la aplicación de composiciones que contienen: (modalidad 1) composición derivada de sobrenadante de *Bacillus amyloliquefaciens* que contiene concentraciones finales para el tratamiento de 90 mg/L de iturina A, 100 mg/L de fengicina A y B y 60 mg/L de surfactina A; (modalidad 2) composición de sobrenadante de *Bacillus subtilis* que contiene concentraciones finales para el tratamiento con 175 mg/L de micosubtilina y 75 mg/L de surfactina A; (modalidad 3) composición de sobrenadante de *Bacillus subtilis* que contiene concentraciones finales para el tratamiento con 700 mg/L de micosubtilina y 300 mg/L de surfactina A. El análisis reveló un efecto significativo del tratamiento en la altura de la planta ($P=0,0029$). Los grupos estadísticos se indican en el gráfico por las letras a, b y c.

Figura 4: Medición del aumento de materia húmeda y raíces de plantas de trigo después de la aplicación de composiciones concentradas derivadas de sobrenadante de cultivo de *Bacillus sp.*

Los pesos de biomasa fresca de las partes aéreas y radicales de las plantas de trigo se midieron después de la aplicación solo por la raíz (R) o por aplicación radicular y foliar (R+F) de las composiciones que contienen: (modalidad 1) composición derivada de sobrenadante de *Bacillus amyloliquefaciens* que contiene concentraciones finales para el tratamiento con 90 mg/L de iturina A, 100 mg/L de fengicina A y B y 60 mg/L de surfactina A; (modalidad 2) composición de sobrenadante de *Bacillus subtilis* que contiene concentraciones finales para el tratamiento con 175 mg/L de micosubtilina y 75 mg/L de surfactina A; (modalidad 4) composición de sobrenadante de *Bacillus subtilis* que contiene concentraciones finales para el tratamiento con 350 mg/L de micosubtilina y 150 mg/L de surfactina A. Los grupos estadísticos se indican en el gráfico por las letras A y B para el efecto bioestimulante en las partes aéreas de las plantas de trigo y las letras a y b para el efecto bioestimulante sobre las partes radicales de las plantas de trigo.

Figura 5: Medición del aumento en el contenido de clorofila de las plantas de trigo después de la aplicación de composiciones concentradas derivadas de *Bacillus sp.* El contenido de clorofila de las partes aéreas de las plantas de trigo se midió después de la aplicación solo por la raíz (R) o por aplicación radicular y foliar (R+F) de composiciones que

contienen: (modalidad 1) composición de sobrenadante de *Bacillus amyloliquefaciens* que contiene concentraciones finales para el tratamiento con 90 mg/L de iturina A, 100 mg/L de fengicina A y B y 60 mg/L de surfactina A de; (modalidad 4) composición de sobrenadante de *Bacillus subtilis* que contiene concentraciones finales para el tratamiento con 350 mg/L de micosubtilina y 150 mg/L de surfactina A. Los grupos estadísticos se indican en el gráfico por las letras a, b y c.

Figura 6: Medición de la longitud de la raíz de las semillas de tomate después del tratamiento de remojo/recubrimiento con composiciones que contienen lipopéptidos purificados.

La longitud de la raíz de las semillas de tomate se midió después de la aplicación de composiciones que contienen: (modalidad 1) Sobrenadante concentrado y purificado de cultivo de *Bacillus subtilis* que contiene 99 % de micosubtilina; (modalidad 2) sobrenadante concentrado y purificado de cultivo de *Bacillus subtilis* que contiene 99 % de surfactina; (modalidad 3) sobrenadante concentrado y purificado de cultivo de *Bacillus subtilis* que contiene 99 % de fengicina; (modalidad 4) sobrenadante concentrado y purificado de sobrenadante de cultivo de *Bacillus subtilis* que contiene 79 % de una mezcla de micosubtilina y surfactina; cada modalidad se compara con una condición de control que corresponde a un control tratado con el mismo volumen de una solución de 0,1 % de DMSO. Los grupos estadísticos se indican en el gráfico por las letras a, b.

Figura 7: Medición de la ganancia de crecimiento de las plantas de tomate tratadas con composiciones que contienen lipopéptidos purificados entre el comienzo y el final del período de estrés hídrico.

El tamaño de las plantas de tomate se midió al final del período de estrés hídrico y se comparó con el tamaño al comienzo del período para estimar la ganancia después de la aplicación de composiciones que contienen: (modalidad 1) Sobrenadante de cultivo de *Bacillus subtilis* concentrado y purificado hasta una pureza del 30 % (masa de lipopéptido/masa seca total) y cuyas proporciones relativas son 80 % de micosubtilina y 20 % de surfactina. Esta composición se aplica a una velocidad de 75 g/ha de lipopéptidos; (modalidad 2) Sobrenadante de cultivo de *Bacillus subtilis* concentrado y purificado hasta una pureza del 30 % (masa de lipopéptido/masa seca total) y cuyas proporciones relativas son 80 % de micosubtilina y 20 % de surfactina. Esta composición se aplica a una velocidad de 150 g/ha de lipopéptidos; (modalidad 3) Sobrenadante de cultivo de *Bacillus subtilis* concentrado y purificado hasta una pureza del 99 % (masa de lipopéptido/masa seca total) y cuyas proporciones relativas son 80 % de micosubtilina y 20 % de surfactina. Esta composición se aplica a una velocidad de 150 g/ha de lipopéptidos; cada modalidad se compara con una condición de control que corresponde a un control tratado con el mismo volumen de una solución de agua destilada. Los grupos estadísticos se indican en el gráfico por las letras a, b y c.

Figura 8: Medición de la eficiencia fotosintética de las plantas de tomate tratadas con composiciones que contienen lipopéptidos purificados entre el comienzo y el final del período de estrés hídrico.

La eficiencia fotosintética se midió mediante fluorimetría con PAM al principio y al final del estrés hídrico y después de la aplicación de composiciones que contienen: (modalidad 1) Sobrenadante de cultivo de *Bacillus subtilis* concentrado y purificado hasta una pureza del 30 % (masa de lipopéptido/masa seca total) y cuyas proporciones relativas son 80 % de micosubtilina y 20 % de surfactina. Esta composición se aplica a una velocidad de 75 g/ha de lipopéptidos; (modalidad 2) Sobrenadante de cultivo de *Bacillus subtilis* concentrado y purificado hasta una pureza del 30 % (masa de lipopéptido/masa seca total) y cuyas proporciones relativas son 80 % de micosubtilina y 20 % de surfactina. Esta composición se aplica a una velocidad de 150 g/ha de lipopéptidos; (modalidad 3) Sobrenadante de cultivo de *Bacillus subtilis* concentrado y purificado hasta una pureza del 99 % (masa de lipopéptido/masa seca total) y cuyas proporciones relativas son 80 % de micosubtilina y 20 % de surfactina. Esta composición se aplica a una velocidad de 150 g/ha de lipopéptidos; cada modalidad se compara con una condición de control que corresponde a un control tratado con el mismo volumen de una solución de agua destilada. El gráfico A corresponde a la medición al comienzo del estrés hídrico y el gráfico B corresponde a la medición al final del estrés hídrico. Los grupos estadísticos se indican en el gráfico por las letras a, b y c.

Figura 9: Medición de la conductancia estomática de las plantas de tomate tratadas con composiciones que contienen lipopéptidos purificados entre el comienzo y el final del período de estrés hídrico.

La conductancia estomática se analizó con un porómetro para medir la velocidad de flujo de dióxido de carbono (CO) o vapor de agua a través de los estomas de una hoja al principio y al final del estrés hídrico y después de aplicar composiciones que contienen: (modalidad 1) Sobrenadante de cultivo de *Bacillus subtilis* concentrado y purificado hasta una pureza del 30 % (masa de lipopéptido/masa seca total) y cuyas proporciones relativas son 80 % de micosubtilina y 20 % de surfactina. Esta composición se aplica a una velocidad de 75 g/ha de lipopéptidos; (modalidad 2) Sobrenadante de cultivo de *Bacillus subtilis* concentrado y purificado hasta una pureza del 30 % (masa de lipopéptido/masa seca total) y cuyas proporciones relativas son 80 % de micosubtilina y 20 % de surfactina. Esta composición se aplica a una velocidad de 150 g/ha de lipopéptidos; (modalidad 3) Sobrenadante de cultivo de *Bacillus subtilis* concentrado y purificado hasta una pureza del 99 % (masa de lipopéptido/masa seca total) y cuyas proporciones relativas son 80 % de micosubtilina y 20 % de surfactina. Esta composición se aplica a una velocidad de 150 g/ha de lipopéptidos; cada modalidad se compara con una condición de control que corresponde a un control tratado con el mismo volumen de una

solución de agua destilada. El gráfico A corresponde a la medición al comienzo del estrés hídrico y el gráfico B corresponde a la medición al final del estrés hídrico. Los grupos estadísticos se indican en el gráfico por las letras a y b.

EJEMPLOS

5

Ejemplo 1: Preparación de una composición bioestimulante

1.a Preparación de un sobrenadante de cultivo

10

El sobrenadante de cultivo se obtiene a partir de un proceso de fermentación aeróbica de una cepa de *Bacillus* derivada de la cepa de *Bacillus subtilis* ATCC 6633 o de la cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* LMG S-29032. El cultivo se lleva a cabo en un medio agitado que contiene una fuente de carbono (glucosa, sacarosa,...), una fuente de nitrógeno (sulfato de amoníaco, peptona...) y elementos traza a 30 °C. El pH se mantiene a un valor de 7. El cultivo se recolecta después de 48 a 72 horas. Después se centrifuga o se filtra para eliminar las células. El sobrenadante de cultivo está listo para concentrarse. El porcentaje de lipopéptidos en esta etapa está en el intervalo de 0,05 a 0,5 % (peso/volumen).

15

1.b Preparación de una preparación bioestimulante concentrada

20

- Por filtración tangencial

El sobrenadante de cultivo obtenido mediante, por ejemplo, la preparación presentada en 1.a se concentra mediante ultrafiltración tangencial mediante el uso de una membrana, cuyo umbral de corte puede ser de 1 KDa a 100 KDa. Por ejemplo, 1000 L de sobrenadante de cultivo obtenido como se describe anteriormente se concentran mediante el pase por la membrana para obtener un producto retenido de un volumen de 10 a 100 L.

25

- Por precipitación a pH ácido

30

Un segundo ejemplo de la preparación de una preparación bioestimulante concentrada es una disminución de pH para precipitar los lipopéptidos. Se adiciona ácido sulfúrico concentrado al sobrenadante obtenido, por ejemplo, mediante la preparación presentada en 1.a. Después de obtener un pH final de aproximadamente 1, la solución se deja agitar por de 2 a 12 horas. Una centrifugación permite recuperar un rechazo de material que contiene los lipopéptidos. Este rechazo se disuelve después mediante la adición de agua y sosa para obtener un valor de pH entre 7 y 8,5. Por ejemplo, cuando el rechazo se obtiene de 1000 L de sobrenadante de cultivo, este rechazo puede usarse en un volumen total de 10 a 100 L.

35

El porcentaje de lipopéptidos al final de uno de estos dos ejemplos de preparación está entre 1 y 15 % (peso/volumen).

40

Ejemplo 2: Efecto bioestimulante de la composición obtenida del sobrenadante de cultivo de *Bacillus* en el crecimiento vegetal

2.a Análisis de los compuestos presentes en el sobrenadante

45

La capacidad de la composición para usarse como composición bioestimulante puede verificarse mediante el uso de métodos analíticos. La presencia de lipopéptidos, metabolitos primarios o enzimas del cultivo de *Bacillus* en la composición de hecho puede medirse mediante diferentes métodos conocidos por el experto, en particular mediante cromatografía líquida acoplada con espectrometría de masas (o LC-MS), cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) o métodos colorimétricos.

50

2.b Método para evaluar el efecto bioestimulante en las plantas

El efecto bioestimulante de la composición puede evaluarse directamente en la planta mediante el análisis de los parámetros de crecimiento. Para este fin, el sobrenadante de cultivo o la composición derivada del mismo puede aplicarse a las partes superiores de la planta, a nivel de la raíz mediante regado, o mediante remojo de las semillas. Estos modos de aplicación pueden, además, combinarse. El efecto bioestimulante se evalúa después de una fase de crecimiento.

55

El efecto bioestimulante se obtiene si se cumple al menos uno de los siguientes criterios:

60

- Aumento del tamaño de la planta (en altura o grosor)
- Aumento de la biomasa fresca y/o seca de los frutos de las plantas
- Aumento de la biomasa fresca y/o seca de las partes aéreas de la planta
- Aumento de la biomasa fresca y/o seca de las raíces de las plantas
- Aumento en el número de nodos, el número de espigas para los cultivos de cereales
- Aumento de la longitud del sistema radicular de la planta
- Aumento del rendimiento de cereales, verduras y/o frutas

65

- Aumento del contenido de clorofila
- Mayor resistencia al estrés abiótico: por ejemplo, durante el estrés hídrico: eficiencia fotosintética, conductancia estomática, etc., aumentadas.

5 2.c Efecto de las composiciones que contienen lipopéptidos en el aumento de la altura de las plantas de tomate.

Equipamiento y métodos

10 La prueba se lleva a cabo en un invernadero de cultivo para garantizar condiciones semicontroladas de temperatura y sol:

- temperatura: 25 °C de día/20 °C de noche
- Fotoperíodo: 14 horas de luz diurna/10 horas de noche

15 El invernadero se regula para un brillo mínimo de 175 W/m². Por debajo de este brillo, la iluminación se enciende y compensa el valor del brillo. La sombra se extiende más allá de un brillo de 500 W/m² y se retrae hasta 450W/m².

20 Cada modalidad se evalúa en 5 plantas de tomate previamente trasplantadas en la etapa de 2 hojas en suelo agrícola arenoso. Se lleva a cabo una fertilización inicial dos días antes del trasplante con una solución de Hakaphos rojo 8-12-24 proporcionado a una velocidad de 0,2 g por planta de tomate.

El modo de uso probado en esta prueba de eficiencia bioestimulante corresponde a una contribución del producto al pie de las plantas para el trasplante de tomate y después de 3 semanas de cultivo foliar, considerando un volumen de pulverización de 200 L/ha.

25 Las composiciones probadas son las siguientes:

- Sobrenadante de cultivo de *Bacillus amyloliquefaciens* concentrado por un factor de 20 y diluido por un factor de 40 para obtener una concentración de 50 g/ha en lipopéptidos cuyas proporciones relativas son 36 % para la familia de las Iturinas (aquí iturina A) y 24 % para la familia de las surfactinas (aquí surfactina A) y 40 % para la familia de las fengicinas (aquí fengicina A y B) (modalidad 1),

30 – Sobrenadante de cultivo de *Bacillus subtilis* concentrado por un factor de 20 y diluido por un factor de 40 para obtener una concentración de 50 g/ha en lipopéptidos cuyas proporciones relativas son 70 % para la familia de la Iturina (aquí micosubtilina) y 30 % para la familia de la surfactina (aquí surfactina A) (modalidad 2),

35 – Sobrenadante de cultivo de *Bacillus subtilis* concentrado por un factor de 20 y diluido por un factor de 10 para obtener una concentración de 200 g/ha en lipopéptidos cuyas proporciones relativas son 70 % para la familia de la Iturina (aquí micosubtilina) y 30 % para la familia de la surfactina (aquí surfactina A) (modalidad 3),

- Control tratado con el mismo volumen de agua destilada (modalidad de control)

La altura de las plantas y la biomasa fresca de las partes aéreas se miden luego de 6 semanas de cultivo. Los datos se procesan mediante un análisis de varianza (ANOVA, método LSD con un nivel de confianza del 95 %, es decir, un umbral de riesgo del 5 %) para resaltar los efectos significativos. La prueba se realiza mediante el uso del software STATGRAPHICS Centurion XV versión 15.2.06.

Resultados

45 El protocolo experimental hace posible comparar el efecto bioestimulante de diferentes composiciones derivadas de un sobrenadante de un cultivo de una cepa de *Bacillus* en la altura lograda por las plantas de tomate. Los resultados se muestran en la Figura 1. El análisis estadístico muestra un efecto significativo del tratamiento sobre este parámetro (P=0,0029). Los grupos estadísticos se indican en el gráfico por las letras a y b, todas las modalidades tienen un efecto bioestimulante significativo en comparación con el control.

50 Los resultados presentados en la Figura 2 muestran que las composiciones de sobrenadante de *Bacillus subtilis* que contienen las concentraciones finales para el tratamiento con 175 mg/L de micosubtilina y 75 mg/L de surfactina A (modalidad 2) y las concentraciones finales para el tratamiento con 700 mg/L de micosubtilina y 300 mg/L de surfactina A de (modalidad 3) aumentan significativamente el tamaño de las plantas de tomate durante un período de 6 semanas en comparación con el modo no tratado (modalidad de control). El efecto bioestimulante de la modalidad 1 del sobrenadante de *Bacillus amyloliquefaciens* que contiene las concentraciones finales para el tratamiento con 90 mg/L de iturina A, 100 mg/L de fengicina A y B y 60 mg/L de surfactina A es mucho mayor que el del control no tratado, pero pertenece a los 2 grupos estadísticos que incluyen el del control.

60 2.d Efecto de las composiciones de lipopéptidos en el aumento de la biomasa fresca de las partes aéreas de las plantas de tomate.

Equipamiento y métodos

65 El protocolo experimental es idéntico al descrito en el párrafo 2.c anteriormente.

Resultados

5 El protocolo experimental hace posible comparar el efecto bioestimulante de diferentes composiciones derivadas de un sobrenadante de cultivo de una cepa de *Bacillus* en el peso de la biomasa fresca de las partes aéreas de las plantas de tomate. Los resultados se muestran en la Figura 3. El análisis estadístico muestra un efecto significativo del tratamiento sobre este parámetro ($P=0,0029$).

10 Los grupos estadísticos se indican en el gráfico por las letras a, b y c.

15 Los resultados presentados en la Figura 2 muestran que las composiciones de sobrenadante de *Bacillus subtilis* que contienen las concentraciones finales para el tratamiento con 175 mg/L de micosubtilina y 75 mg/L de surfactina A (modalidad 2) y las concentraciones finales para el tratamiento con 700 mg/L de micosubtilina y 300 mg/L de surfactina A (modalidad 3) permiten un aumento significativo en la biomasa fresca de las partes aéreas en comparación con la modalidad no tratada (modo de control). El efecto bioestimulante de la modalidad 1 del sobrenadante de *Bacillus amyloliquefaciens* que contiene las concentraciones finales para el tratamiento con 90 mg/L de iturina A, 100 mg/L de fengicina A y B y 60 mg/L de surfactina A es mucho mayor que el control no tratado, pero pertenece a 2 grupos estadísticos que incluyen el control.

20 2.e Efecto de las composiciones de lipopéptidos en el aumento de la producción de material húmedo a partir de plantas de trigo y material húmedo a partir de raíces de plantas de trigo

Equipamiento y métodos

25 Las semillas de trigo de la variedad Tybalt se sembraron en un sustrato inerte. Las raíces se desarrollaron en un medio líquido. Cuando las plantas de trigo estaban en la etapa de 1-2 hojas, las plantas se plantaron en macetas con suelo de arcilla arenoso. Las macetas se mantuvieron en una cámara de cultivo con 16 horas de luz y una temperatura de 19 °C.

30 Para cada cultivo y tratamiento, se cultivaron 20 plantas. Diez plantas se trataron por aplicación en la raíz (anotado como R en las Figuras 4 y 5); 10 plantas no se trataron. Después, en el grupo de 10 plantas tratadas por aplicación en la raíz, 5 plantas se trataron por aplicación foliar (observar R+F en las Figuras 4 y 5); 5 plantas no se trataron (observar R en las Figuras 4 y 5).

35 Las raíces de las plantas de trigo se trataron por inmersión en las diversas soluciones del producto e inmediatamente después del tratamiento se plantaron en macetas con suelo arenoso para macetas para frutas. Las aplicaciones foliares se aplicaron 4 semanas después de la siembra, con un volumen de pulverización de 200 l/ha. La medición final se realiza después de 9 semanas de crecimiento.

40 Los datos obtenidos se analizaron estadísticamente con SAS 7. La normalidad se probó con Kolmogorov-Smirnov y la igualdad de varianzas se probó mediante la prueba de Levene. Las variables homoscedásticas normalmente distribuidas se sometieron a un Anova de una vía bidireccional con Tukey como prueba post hoc.

Las composiciones probadas son las siguientes:

- 45 – Sobrenadante de cultivo de *Bacillus amyloliquefaciens* concentrado por un factor de 20 y diluido por un factor de 40 para obtener una concentración de 50 g/ha en lipopéptidos cuyas proporciones relativas son 36 % para la familia de las Iturinas (aquí iturina A) y 24 % para la familia de las surfactinas (aquí surfactina A) y 40 % para la familia de las fengicinas (aquí fengicina A y B) (modalidad I),
- 50 – Sobrenadante de cultivo de *Bacillus subtilis* concentrado por un factor de 20 y diluido por un factor de 40 para obtener una concentración de 50 g/ha en lipopéptidos cuyas proporciones relativas son 70 % para la familia de la Iturina (aquí micosubtilina) y 30 % para la familia de la surfactina (aquí surfactina A) (modalidad 2),
- Sobrenadante de cultivo de *Bacillus subtilis* concentrado por un factor de 20 y diluido por un factor de 20 para obtener una concentración de 100 g/ha en lipopéptidos cuyas proporciones relativas son 70 % para la familia de la Iturina (aquí micosubtilina) y 30 % para la familia de la surfactina (aquí surfactina A) (modalidad 4),
- 55 – El control se trata con el mismo volumen de agua destilada (modalidad de control)

Resultados

60 El protocolo experimental hace posible comparar el efecto bioestimulante de diferentes composiciones derivadas de un sobrenadante de cultivo de una cepa de *Bacillus* en el peso de la biomasa fresca de las partes aéreas (planta MF) y la biomasa de raíz fresca (raíz MF) de las plantas de trigo. Los resultados se muestran en la Figura 4. Los grupos estadísticos se indican en el gráfico por las letras A y B para las partes aéreas y a y b para las raíces.

65 - Efecto en la biomasa fresca de las partes aéreas de las plantas de trigo

Los resultados presentados en la Figura 4 muestran que las composiciones de sobrenadante de *Bacillus subtilis* que contienen concentraciones finales para el tratamiento con 175 mg/L de micosubtilina y 75 mg/L de surfactina A (modalidad 2) aplicada por aplicaciones radiculares y foliares (R+F) y concentraciones finales para el tratamiento con 350 mg/L de micosubtilina y 150 mg/L de surfactina A (modalidad 4) aplicada por la aplicación radicular (R) permite un aumento significativo en la biomasa fresca de las partes aéreas en comparación con la de la modalidad no tratada (modalidad de control).

Los resultados presentados en la Figura 4 muestran que la composición de un sobrenadante de *Bacillus amyloliquefaciens* que contiene las concentraciones finales para el tratamiento con 90 mg/L de iturina A, 100 mg/L de fengicina A y B y 60 mg/L de surfactina A (modalidad 1) aplicada solo por aplicación radicular (R) o radicular y foliar (R+F) es mucho más alta que el control no tratado, pero pertenece a 2 grupos estadísticos que incluyen el del control. Se observa un resultado similar para la modalidad 4 aplicada por aplicación radicular y foliar (R+F).

- Efecto en la biomasa fresca de las partes radiculares de las plantas de trigo

Los resultados presentados en la Figura 4 muestran que las composiciones de sobrenadante de *Bacillus subtilis* que contienen concentraciones finales para el tratamiento con 175 mg/L de micosubtilina y 75 mg/L de surfactina A (modalidad 2) aplicada por aplicación radicular y foliar (R+F) y concentraciones finales para el tratamiento con 350 mg/L de micosubtilina y 150 mg/L de surfactina A (modalidad 4) aplicada por la aplicación radicular (R) permite un aumento significativo en la biomasa fresca de las partes radiculares en comparación con las de la modalidad no tratada (modalidad de control).

Los resultados presentados en la Figura 4 muestran que la composición de sobrenadante de *Bacillus amyloliquefaciens* que contiene las concentraciones finales para el tratamiento con 90 mg/L de iturina A, 100 mg/L de fengicina A y B y 60 mg/L de surfactina A (modalidad 1) aplicada a nivel radicular y foliar (R+F) es mucho más alta que el control no tratado, pero pertenece a 2 grupos estadísticos que incluyen el del control. Se observa un resultado similar para la modalidad 2 aplicada por la aplicación radicular (R) y la modalidad 4 aplicada por la aplicación radicular y foliar (R+F).

2.f Efecto de las composiciones de lipopéptidos en el aumento del contenido de clorofila en plantas de trigo

Equipamiento y métodos

El protocolo experimental es idéntico al descrito en el párrafo 2.e anteriormente.

Resultados

El protocolo experimental hace posible comparar el efecto bioestimulante de diferentes composiciones de lipopéptidos derivadas de un sobrenadante de cultivo de una cepa de *Bacillus* en el contenido de clorofila de las partes aéreas de las plantas de trigo. Los resultados se muestran en la Figura 5. Los grupos estadísticos se indican en el gráfico por las letras a, b y c.

Los resultados presentados en la Figura 5 muestran que la composición de un sobrenadante de *Bacillus subtilis* que contiene las concentraciones finales para el tratamiento de 350 mg/L de micosubtilina y 150 mg/L de surfactina A (modalidad 4) aplicada por aplicación radicular y foliar (R+F) permite un aumento significativo en el contenido de clorofila de las partes aéreas en comparación con el modo no tratado (modo de control).

Estos resultados muestran, además, que la composición de sobrenadante de *Bacillus amyloliquefaciens* que contiene las concentraciones finales para el tratamiento con 90 mg/L de iturina A, 100 mg/L de fengicina A y B y 60 mg/L de surfactina A (modalidad 1) aplicada por aplicación radicular (R) o aplicación radicular y foliar (R+F) permite un aumento significativo en el contenido de clorofila de las partes aéreas en comparación con los de la modalidad no tratada (modo de control).

Ejemplo 3: Efecto de diferentes composiciones de lipopéptidos en el tamaño de la raíz de las semillas de tomate después de remojar/recubrir las semillas

Equipamiento y métodos

La prueba se realizó con semillas de tomate de la marca MONEYMAKER. Las semillas de tomate se desinfectaron previamente por inmersión en una solución de etanol/agua de 75/25 v/v durante 2 minutos, después 30 minutos en 5 % de lejía (hipoclorito de sodio) más Tween (0,1 %) y finalmente se enjuagaron con agua hasta que la espuma desapareció por completo.

Las semillas se remojaron durante una hora en soluciones de lipopéptidos de diferentes purezas y concentraciones.

Las soluciones de lipopéptidos se concentraron (ver los métodos en 1.b) y después se purificaron por filtración tangencial.

Las soluciones se diluyeron después en 0,1 % de DMSO para obtener concentraciones de lipopéptidos para la modalidad 1 de 50 y 100 pM, para la modalidad 2 de 5, 20 y 100 pM, para la modalidad 3 de 5, 20 y 100 pM, para la modalidad 4 de 5, 20 y 100 pM.

Las semillas se colocaron verticalmente en placas de Petri y se refrigeraron durante una noche para estandarizar la germinación. Después, las cajas se colocaron en un horno a 22 °C con un fotoperíodo de 16 horas.

Se usa una solución de 0,1 % de DMSO en agua destilada como control para el experimento.

Cada modalidad se repite 5 veces en una placa de Petri.

Las composiciones probadas son las siguientes:

- Sobrenadante de cultivo de *Bacillus subtilis* concentrado y purificado que contiene 99 % de micosubtilina (modalidad 1),
- Sobrenadante de cultivo de *Bacillus subtilis* concentrado y purificado que contiene 99 % de surfactina (modalidad 2),
- Sobrenadante de cultivo de *Bacillus subtilis* concentrado y purificado que contiene 99 % de fengicina (modalidad 3),
- Un sobrenadante de cultivo de *Bacillus subtilis* concentrado y purificado que contiene 79 % de una mezcla que contiene las proporciones relativas de 40 % de micosubtilina y 60 % de surfactina (modalidad 4),
- Control tratado con el mismo volumen de una solución de 0,1 % de DMSO (control)

La longitud de la raíz se midió después de 7 días de incubación de las cajas. La normalidad se probó con la prueba de Kolmogorov-Smirnov y la igualdad de varianzas se probó con la prueba de Brown-Forsythe o la prueba de Kruskal-Wallis. Después las variables se sometieron a un Anova con una prueba post-hoc de Student-Newman-Keuls con $P=0,05$ (nivel de confianza del 95 % o umbral de riesgo del 5 %) para resaltar los efectos significativos. La prueba se realizó mediante el uso del software SigmaPlot 14.0. Los grupos estadísticos se indican por las letras a y b.

Resultados

El protocolo experimental hace posible comparar el efecto bioestimulante de varias composiciones de lipopéptidos purificados en la longitud de la raíz de las semillas de tomate. Los resultados presentados en la Figura 6 muestran que las composiciones de sobrenadantes de *Bacillus subtilis* tienen un efecto significativo en el crecimiento de las raíces de las semillas de tomate, con la excepción de la modalidad 2. Los grupos estadísticos se indican en el gráfico por las letras a y b. En base a estos resultados, puede observarse un efecto significativo del tratamiento con la modalidad 1 (micosubtilina) en la longitud de la raíz a partir de la concentración de 50 pM ($P=0,028$). Aunque a concentraciones de 20 pM y 100 pM se observa un efecto en la longitud de la raíz con la modalidad 2 (surfactina), no es estadísticamente diferente de la condición de control. Se observa un efecto bioestimulante en la longitud de la raíz para las modalidades 3 (fengicina) ($P=0,05$) y 4 (mezcla de micosubtilina y surfactina) a partir de 5 pM ($P=0,009$).

Ejemplo 4: Efecto de diferentes composiciones de lipopéptidos purificados en el crecimiento de plantas de tomate, eficiencia fotosintética y conductancia estomática en condiciones de estrés hídrico

El objetivo de esta prueba es estudiar el efecto de las composiciones de lipopéptidos obtenidas de diferentes sobrenadantes de *Bacillus subtilis* concentrados y purificados en el crecimiento, eficiencia fotosintética y conductancia estomática de los tomates en condiciones de estrés hídrico. Las composiciones estudiadas incluyen diferentes purezas y diferentes concentraciones de lipopéptidos.

Equipamiento y métodos

Material vegetal

La prueba se realiza a partir de semillas de tomate de la marca FANDANGO Fi.

Las semillas se siembran en parches de plántulas (turba de Klamann). La humedad se mantiene cerca de la saturación durante la germinación (el agua se proporciona por subirrigación y pulverización). En la etapa de propagación de 2 hojas (después de 3 semanas), las plántulas se trasplantan a las macetas de suelo para la

prueba. Durante el trasplante, la turba que se adhiere a las raíces se elimina mediante la inmersión en agua antes de la resiembra en macetas.

Preparación del suelo y las macetas de cultivo.

El suelo de prueba es un suelo agrícola arenoso con una composición conocida. Antes de la prueba, se tamiza a 10 mm, después se miden la materia seca y la capacidad de retención de agua. Al comienzo de la prueba, cada maceta contiene 3,5 kg de suelo crudo regado al 70 % de la capacidad máxima de retención de agua (CR_{máx}) del suelo. El peso promedio de 5 macetas se calcula para tener un peso objetivo correspondiente al 70 % de la CR_{máx}.

Las macetas se riegan al peso establecido correspondiente al 70 % de la CR_{máx} de agua del suelo de resiembra en maceta durante un período sin estrés hídrico. En adición, se llevó a cabo un suministro inicial de fertilizante de 100 mL de una solución a 2 g/L de Hakaphos rojo 8-12-24. Se proporcionan, además, 50 mL de esta solución antes del estrés hídrico. Durante el estrés hídrico, se adiciona una solución de KNO₃ y MgSO₄.

Estrés hídrico

Durante el período de 3 semanas de estrés hídrico, las macetas no se riegan durante una semana, después se mantienen durante una semana al 30 % de la CR_{máx} y después durante una semana al 50 % de la CR_{máx}.

Duración de la prueba

La prueba se coloca en un invernadero de cultivo para garantizar condiciones de temperatura y luz solar semicontroladas:

- temperatura: 25 °C de día/20 °C de noche
- Fotoperíodo: 14 horas de luz diurna/10 horas de noche

El invernadero se regula para un brillo mínimo de 175 W/m². Por debajo de este brillo, la iluminación se enciende y compensa el valor del brillo. La sombra se extiende más allá de un brillo de 500 W/m² y se retrae por debajo de 450 W/m².

Modalidades probadas

Las diferentes composiciones se exponen tres veces. Para cada contribución, se proporcionan 10 mL de la composición por maceta. La primera contribución se realiza al sembrar en maceta, esta contribución es una contribución al suelo. Las otras contribuciones se realizan por pulverización foliar. La segunda contribución se realiza después de 3 semanas de cultivo y dos días antes del inicio del estrés hídrico, la tercera se realiza después de 10 días de estrés hídrico. La modalidad de control se trata con el mismo volumen de agua destilada.

Las modalidades probadas son las siguientes y cada modalidad incluye 6 macetas repetidas.

Las composiciones probadas son las siguientes:

- Control tratado con el mismo volumen de agua destilada (control)
- Sobrenadante de cultivo concentrado de *Bacillus subtilis* purificado hasta una pureza del 30 % (masa de lipopéptido/masa seca total) y cuyas proporciones relativas son 80 % de micosubtilina y 20 % de surfactina. Esta composición se aplica a una velocidad de 75 g/ha de lipopéptidos (modalidad 1),
- Sobrenadante de cultivo concentrado de *Bacillus subtilis* purificado hasta una pureza del 30 % (masa de lipopéptido/masa seca total) y cuyas proporciones relativas son 80 % de micosubtilina y 20 % de surfactina. Esta composición se aplica a una velocidad de 150 g/ha de lipopéptidos (modalidad 2),
- Sobrenadante de cultivo concentrado de *Bacillus subtilis* purificado hasta una pureza del 99 % (masa de lipopéptido/masa seca total) y cuyas proporciones relativas son 80 % de micosubtilina y 20 % de surfactina. Esta composición se aplica a una velocidad de 150 g/ha de lipopéptidos (modalidad 3),

La ganancia de altura de las plantas entre el comienzo y el final del estrés hídrico, la eficiencia fotosintética al comienzo y al final del estrés hídrico y la conductancia estomática al comienzo y al final del estrés hídrico se miden y comparan con la modalidad de control. Después las variables se someten a una Anova y prueba de Kruskal-Wallis con P=0,05 (nivel de confianza del 95 % o umbral de riesgo del 5 %) para resaltar los efectos significativos. La prueba se realiza mediante el uso del software Statgraphics centurion XV - versión 15.2.06. Los grupos estadísticos se indican por las letras a, b y c.

Resultados

Aumento de altura de las plantas de tomate entre el comienzo y el final del estrés hídrico

Al final del período de estrés hídrico la altura de las plantas de tomate se compara con la altura inicial antes del período de estrés hídrico, la ganancia de crecimiento se muestra en la Figura 7. La modalidad 1 no es estadísticamente diferente de la modalidad de control (valor $P=0,432$). Se observa un mejor crecimiento con la modalidad 2 pero esta no es estadísticamente diferente de la modalidad de control (valor $P=0,124$). Se observa una ganancia significativamente diferente con la modalidad 3 en comparación con la modalidad de control (valor $P=0,008$).

Eficiencia fotosintética por fluorimetría con PAM

La eficiencia fotosintética se midió mediante fluorimetría con PAM al principio y al final del estrés hídrico. Bajo estrés, el valor de cp (PSII) disminuye y los procesos no fotoquímicos aumentan (disipación de calor y fluorescencia de clorofila) a expensas de la fotosíntesis. En la Figura 8A, se observa un ligero aumento en cp (PSII) para la modalidad 3 pero el efecto no es estadísticamente significativo (valor $P=0,4932$). En la Figura 8B, se observa un aumento en cp (PSII) para la modalidad 2 (efecto estadísticamente no significativo) y la modalidad 3 (efecto estadísticamente significativo) (valor $P=0,0070$), por lo que estas modalidades se estresan menos que la condición de control. La modalidad 1 tiene un valor de cp (PSII) más bajo que la condición de control (efecto estadísticamente no significativo).

Conductancia estomática

La medición de la conductancia estomática se realizó con un porómetro. Este dispositivo se usa para medir la conductancia estomática de las hojas. La conductancia estomática es la medición del caudal de dióxido de carbono (CO_2) o vapor de agua a través de los estomas de una hoja. Los estomas son pequeños poros en la parte superior e inferior de la hoja y son responsables de dejar entrar y expulsar el CO_2 y la humedad del y al aire exterior. La unidad de medida es milimoles por metro cuadrado segundo ($mmol/m^2s$). En la Figura 9 A al comienzo del estrés hídrico, las modalidades 1 y 3 tienen los valores más altos de conductancia estomática, lo que indica una mejor apertura de los estomas y por lo tanto menos estrés de estas modalidades pero este efecto no es estadísticamente significativo (valor $P=0,0544$). En la Figura 9B al final del estrés hídrico, las modalidades 2 y 3 tienen valores más bajos que la modalidad de control y que la modalidad 1 (efecto estadísticamente significativo, valor $P=0,000$). Para estas modalidades 2 y 3, los estomas se cierran, las plantas retienen mejor el agua y son más resistentes a la sequía.

Estas pruebas hacen posible especificar uno de los mecanismos de acción de los lipopéptidos contenidos en los sobrenadantes de *Bacillus subtilis* concentrados como agente bioestimulante, a saber, para mejorar la resistencia al estrés hídrico. Se observa, además, un efecto de dosis, con efectos significativos obtenidos a partir de 150 g/ha y superiores, independientemente de la pureza del lipopéptido de dicho sobrenadante.

REIVINDICACIONES

1. El uso de al menos un lipopéptido seleccionado entre iturina A, mojavensina, micosubtilina, bacilomicinas A, B, C, D, F y L, surfactinas A, B, C, liquenisina, pumilacidina, fengicinas A y B, plipastatinas A y B, o agrastatina para estimular el crecimiento de las plantas.
5
2. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho lipopéptido se obtiene a partir de un sobrenadante de al menos una cepa de *Bacillus* sp.
- 10 3. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en donde la concentración de dicho al menos un lipopéptido es de al menos 20 mg/L (0,002 %).
4. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde dicho al menos un lipopéptido se obtiene a partir de las cepas de *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus licheniformis*, *Paenibacillus polymixa*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus sphaericus*, *Bacillus velenzensis*, *Bacillus firmus*, *Bacillus methylotrophicus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus vallismortis*.
15
5. El uso de acuerdo con la reivindicación 4, en donde dicha cepa o al menos una de dichas cepas de *Bacillus* sp. es una cepa de *Bacillus subtilis*, preferentemente elegida entre las cepas ATCC 6633, ATCC 21332, 168, ATCC 9943 y NCIB 3610 y sus derivados o una cepa de *Bacillus amyloliquefaciens*, preferentemente elegida entre las cepas de FZB42 y LMG 5-29032 y sus derivados.
20
6. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que implica la aplicación de dicho al menos un lipopéptido mediante el tratamiento de las hojas y/o el tratamiento de la raíz y/o el tratamiento de las semillas y/o los bulbos ornamentales.
25
7. El uso de acuerdo con la reivindicación 6 para aumentar el tamaño de las raíces.
8. El uso de acuerdo con la reivindicación 6 para aumentar la conductancia estomática en caso de estrés hídrico.
30

Masa molecular de los principales lipopeptidos producidos por <i>Bacillus</i> sp.				
MM de las Surfactinas	MM de las Iturinas	MM de las Fengicinas	MM de las Kurstalinas	MM de las Isocorninas
Surfactina C10 estándar	Iturina A C14	Fengicina A C14	Kurstalina C11	Isocornina C12
1007.651	1042.544	1056.540	1434.794	877.465
Surfactina C14 estándar	Iturina A C16	Fengicina A C16	Kurstalina C12	Isocornina C18
1021.667	1070.575	1070.575	1448.779	891.461
Surfactina C16 estándar	Iturina A C17	Fengicina A C17	Kurstalina C13	Isocornina C14
1005.683	1084.591	1084.591	1462.795	905.496
Surfactina C18 estándar	Iturina A C18	Fengicina A C18	Kurstalina C14	
			1476.811	919.512
			1490.826	
[Val] surfactina C18	Iturina C1 C18	1 dobles enlaces	de cadena recta	
993.636	1019.544		Kurstalina C11	895.4757
[Val] surfactina C14	Iturina C1 C17	Fengicina A C14	Kurstalina C12	919.49134
1007.651	1003.559	Fengicina A C16	Kurstalina C13	923.50698
[Val] surfactina C16	Iturina C1 C18	Fengicina A C18	Kurstalina C14	937.52262
1021.667	1017.575			
[Ile] surfactina C18	Iturina C1 C19	Fengicina A C17	Ácido graso hidroxilado	
1007.651	1111.591	Fengicina A C18	Kurstalina C11	893.460
			Kurstalina C12	907.476
[Ile] surfactina C14	Miscobactina C14		Kurstalina C13	921.491
1021.667	1066.590		Kurstalina C14	935.507
[Ile] surfactina C16	Miscobactina C16			
1005.683	1070.575		Ácido graso hidroxilado de cadena recta	
	Miscobactina C17		Kurstalina C11	911.47062
			Kurstalina C12	925.48626
[Ala] surfactina C18			Kurstalina C13	939.5019
979.620			Kurstalina C14	953.51754
[Ala] surfactina C14	Bactolomina D C14			
993.636	1000.533			
[Ala] surfactina C16	Bactolomina D C16			
1007.651	1044.549			
	Bactolomina D C18			
	Bactolomina D C17			
[Gln] surfactina C18				
1006.667				
[Gln] surfactina C14				
1020.683				
[Gln] surfactina C16				
1034.698				
[Phe] pumilactidina C14	Bactolomina F C14			
1005.683	1056.590			
[Phe] pumilactidina C16	Bactolomina F C16			
1049.698	1070.575			
[Phe] pumilactidina C18	Bactolomina F C18			
1063.714	1084.591			
[Phe] pumilactidina C17	Bactolomina F C17			
1077.729	1089.607			
	Bactolomina L C14			
	1020.512			
[Val] pumilactidina C14	Bactolomina L C16			
1021.667	1004.528			
[Val] pumilactidina C16	Bactolomina L C18			
1005.683	1046.543			
[Val] pumilactidina C18	Bactolomina L C17			
1049.698	1062.559			
[Val] pumilactidina C17				
1063.714				
	Moharensina A C14			
	1069.555			
Liquenzina C18	Moharensina A C16			
1006.667	1083.571			
Liquenzina C14	Moharensina A C18			
1020.683	1097.586			
Liquenzina C16	Moharensina A C17			
1034.698	1111.602			
Liquenzina C18				
1048.714				

Figura 1

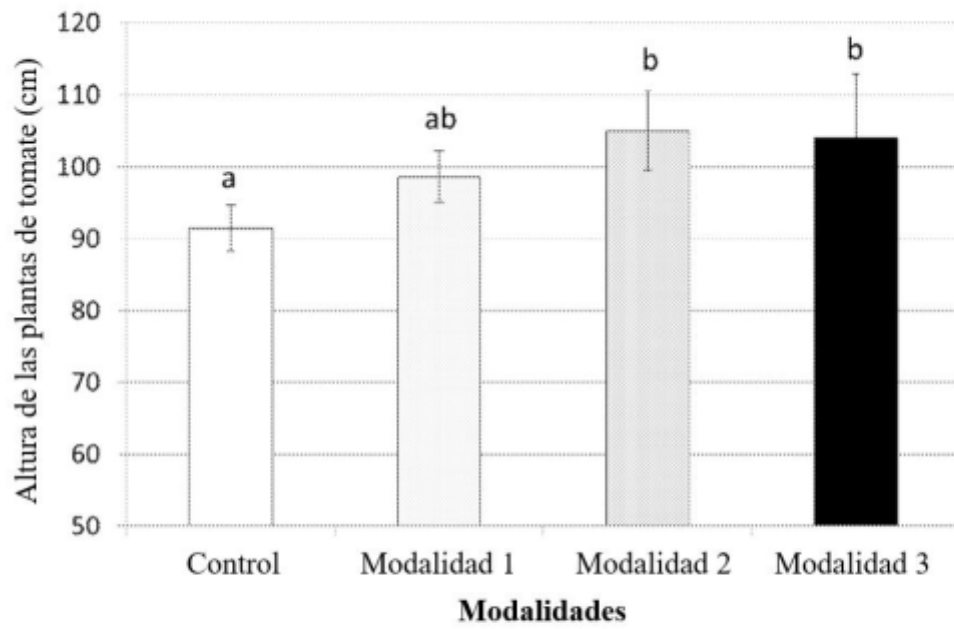


Figura 2

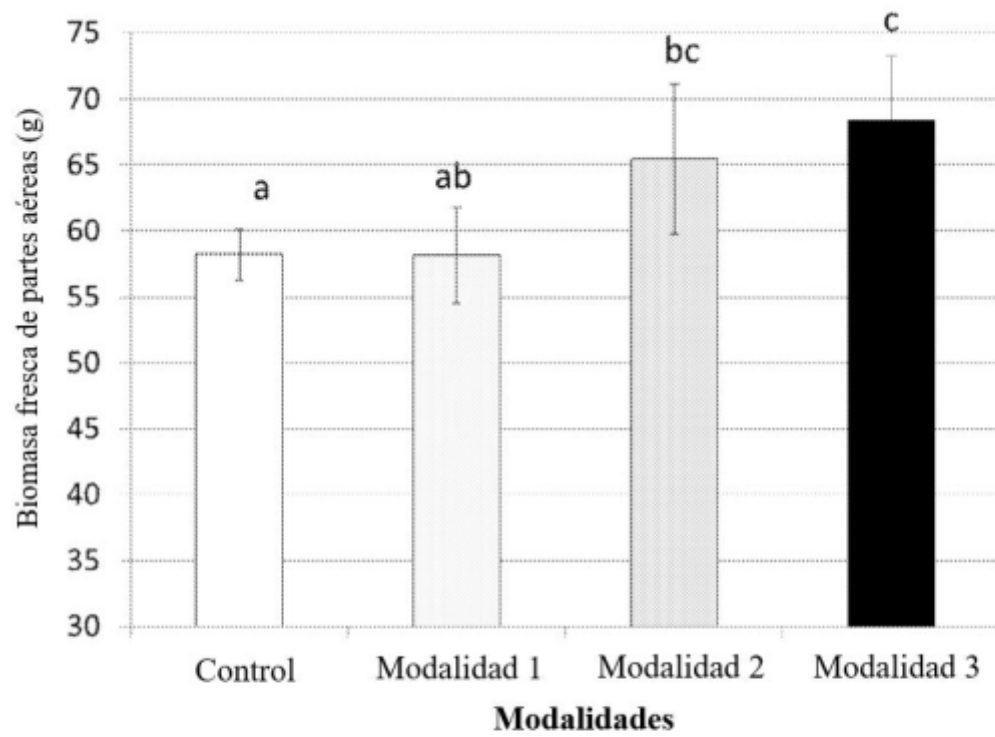


Figura 3

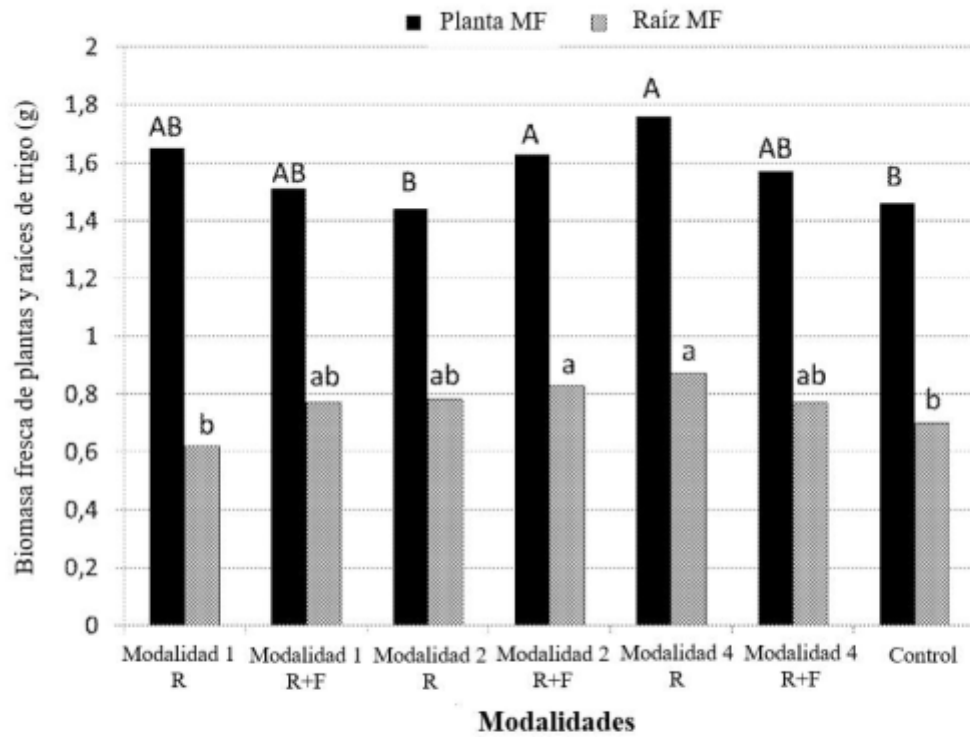


Figura 4

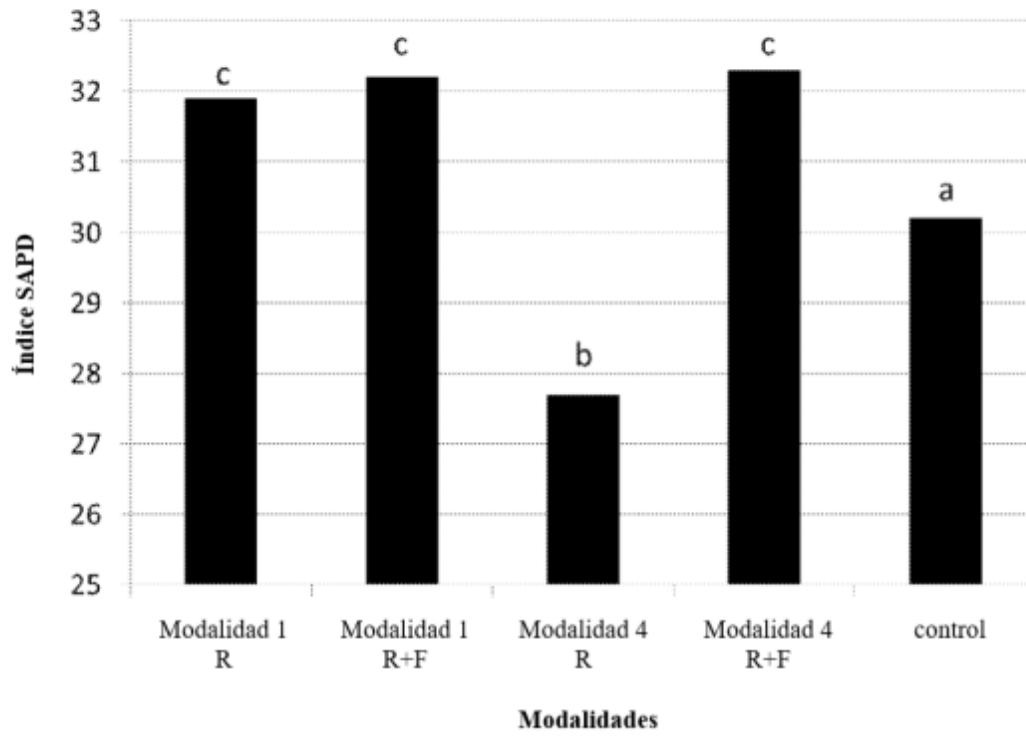


Figura 5

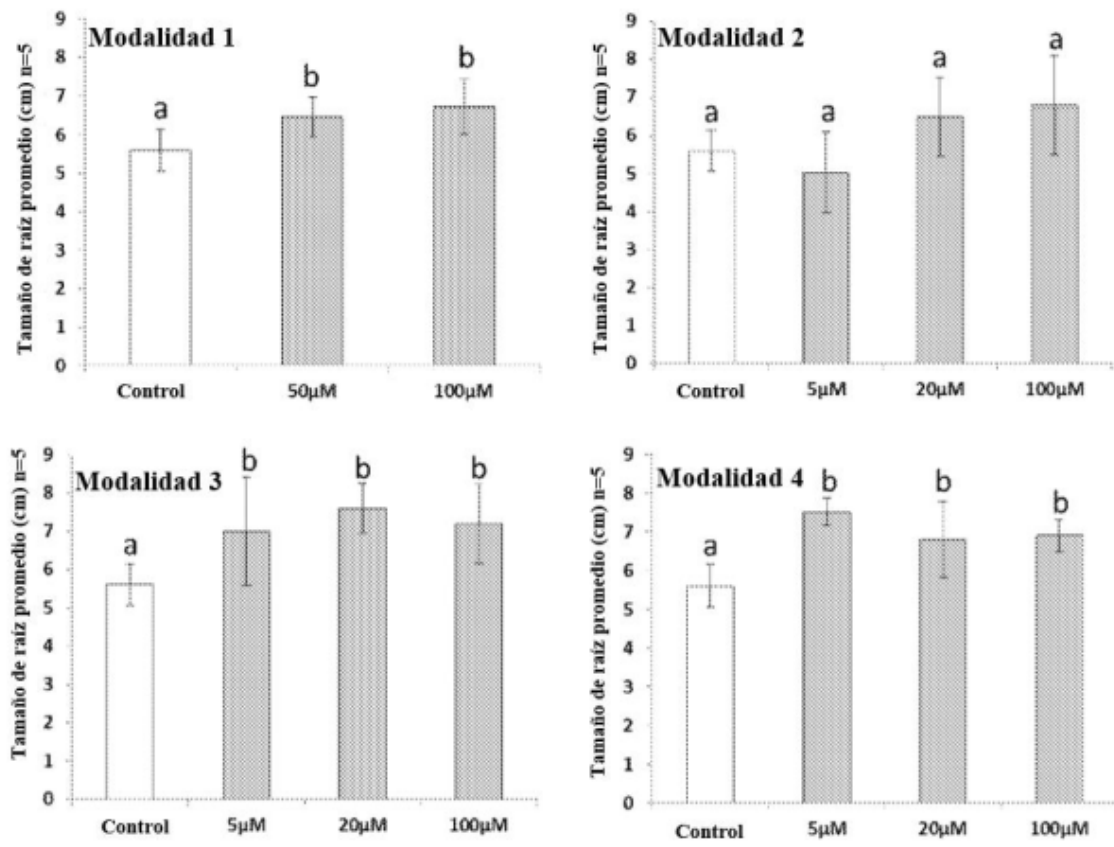


Figura 6

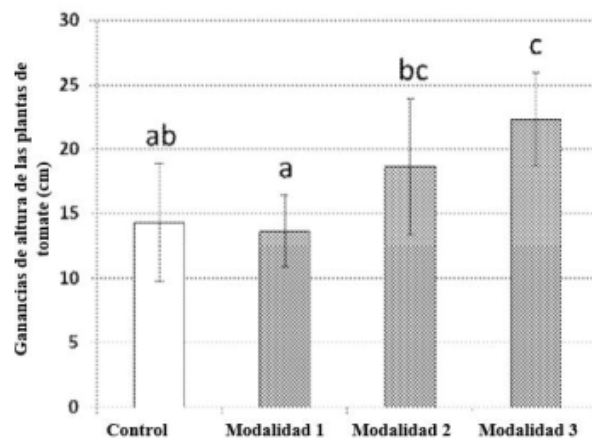


Figura 7

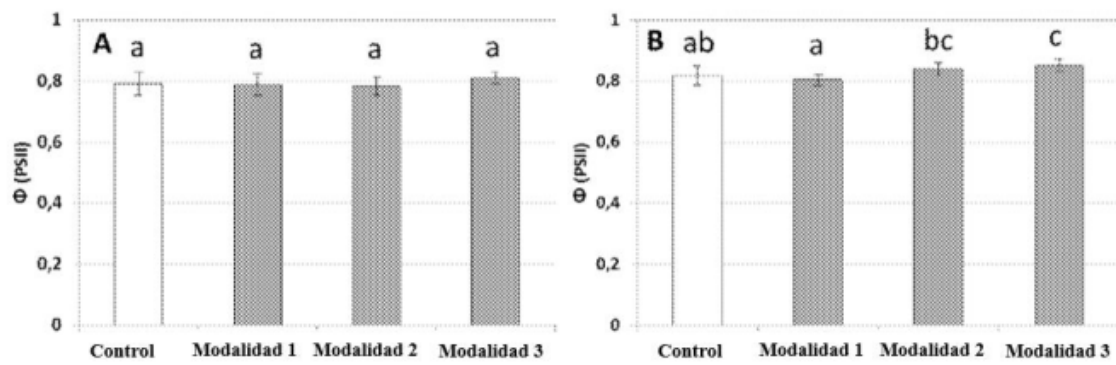


Figura 8

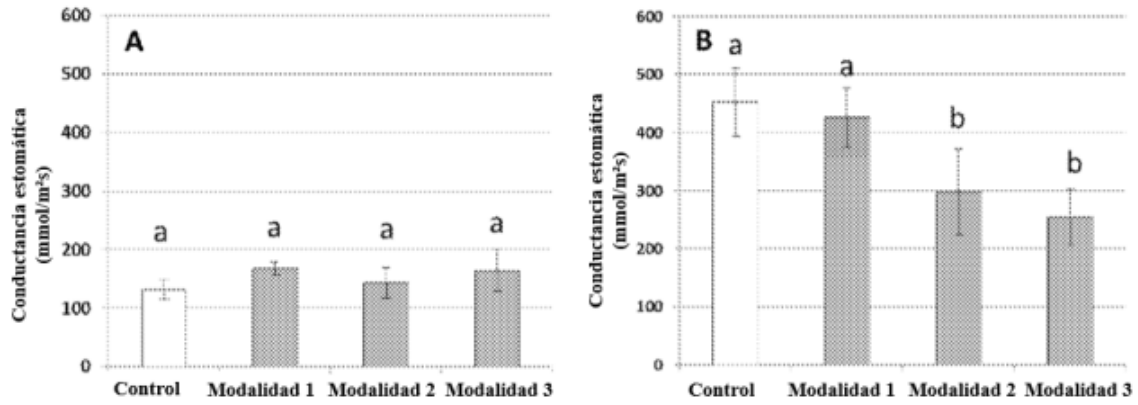


Figura 9