

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 684 858**

21 Número de solicitud: 201700542

51 Int. Cl.:

C12N 1/14 (2006.01)

A01N 63/04 (2006.01)

C05F 11/08 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

31.03.2017

43 Fecha de publicación de la solicitud:

04.10.2018

Fecha de concesión:

02.07.2019

45 Fecha de publicación de la concesión:

09.07.2019

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD DE ALMERÍA (100.0%)
OTRI-UAL, Ctra. Sacramento s/n Edf. Central
04120 Almería (Almería) ES**

72 Inventor/es:

**DIÁNEZ MARTÍNEZ, Fernando José y
SANTOS HERNÁNDEZ, Milagrosa**

Observaciones:

La lista de secuencias está accesible al público en la página web de la OEPM para su descarga en formato electrónico.

54 Título: **Nueva cepa de Paecilomyces variotii, composiciones y aplicaciones de la misma**

57 Resumen:

Nueva cepa de Paecilomyces variotii, composiciones y aplicaciones de la misma.

La presente invención se refiere a una nueva cepa de Paecilomyces variotii, con número de depósito CECT nº 20957 y que se ha denominado Pae10773.

Dadas las propiedades de esta nueva cepa, en la presente invención se contempla su uso para potenciar el crecimiento de plantas, tal como cultivos hortícolas. Asimismo, se refiere a una composición que comprende dicha cepa, con capacidad de promover el desarrollo de plantas en suelos infestados por patógenos o condiciones de estrés. Por ello, se describe su uso como biofertilizante para plantas.

ES 2 684 858 B1

DESCRIPCIÓN

Nueva cepa de *paecilomyces variotii*, composiciones y aplicaciones de la misma.

5 Sector de la técnica

Esta invención se encuadra en el sector técnico de la microbiología agrícola, más concretamente en el relativo a la aplicación de microorganismos en los cultivos agrícolas para la biofertilización y promoción del crecimiento vegetal.

10

Estado de la técnica

El uso de microorganismos en agricultura ha experimentado un desarrollo notable en los últimos años. Su uso va orientado principalmente para dos fines: actuar como agente de control biológico de plagas o enfermedades de los cultivos y/o ejercer un efecto promotor del crecimiento vegetal.

15

Existen numerosos microorganismos beneficiosos, y su uso en los sistemas agrícolas puede mejorar la nutrición, la resistencia a estreses abióticos y bióticos, y proporciona una transición efectiva desde sistemas de producción basados en el uso de productos químicos a otros más sostenibles. La búsqueda de nuevas herramientas que permitan reducir el uso de plaguicidas y fertilizantes químicos, es un objetivo que hay que alcanzar a medio plazo.

20

Los microorganismos más efectivos como promotores del crecimiento vegetal son las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR, Plant Growth Promoting Rhizobacteria), hongos micorrícicos, y los hongos promotores del crecimiento vegetal (PGPF, Plant Growth Promoting Fungí). Los microorganismos con efectos benéficos sobre las plantas tienen un potencial considerable como biofertilizantes y como agentes de control biológico. Actualmente, en la agricultura se aplican tratamientos con biopreparados a diversos cultivos, sobre todo en la fase de siembra y trasplante, ya que surge la necesidad de proteger la plántula en este momento de estrés, haciéndola fuerte y vigorosa. Los microorganismos también pueden ser usados como bioactivadores o bioestimuladores, que se definen como “productos que contienen células vivas o latentes de cepas microbianas, previamente seleccionadas, que se caracterizan por producir sustancias fisiológicamente activas (auxinas, giberelinas, citoquininas, aminoácidos, péptidos y vitaminas) que al interactuar con la planta desencadenan diferentes eventos metabólicos como estimular el crecimiento, desarrollo y rendimiento de cultivos” (Dibut, 2006).

25

30

35

El término biofertilizante puede definirse como “preparado que contiene células vivas o latentes de cepas microbianas eficientes, que se utilizan para aplicarlas en semillas o al suelo con el objetivo de incrementar el número de estos microorganismos en el medio y acelerar los procesos microbianos de tal forma que se aumenten las cantidades de nutrientes que pueden ser asimilados por las plantas o se hagan más rápidos los procesos fisiológicos que influyen sobre el desarrollo y el rendimiento de los cultivos” (Dibut, 2006).

40

A diferencia de los fertilizantes, los bioestimuladores no están directamente asociados a la sustitución de dosis de fertilizantes químicos en los cultivos, sino que se emplean independientemente de la aplicación o no de estos insumos. Su actividad productora de sustancias fisiológicamente activas y su efecto sobre el vegetal, alcanza su máxima expresión cuando la planta está adecuadamente nutrida. Así, aun cuando no se aplican fertilizantes se obtiene un marcado efecto estimulador sobre el rendimiento, pero en tal caso se debe fertilizar con enmiendas orgánicas para evitar el empobrecimiento del suelo a lo largo de varios ciclos de cosecha (Sánchez, 2011).

50

Es en este aspecto en el que se apoya el registro de los productos que contienen microorganismos para su uso en agricultura, ya que al usar la palabra “fertilizante” en algunos países, permite un registro más fácil. Basándose en estos hechos, es frecuente encontrar en el mercado productos bioestimulantes y biofertilizantes pero orientados más bien a un uso como medio de defensa fitosanitaria.

El género *Paecilomyces* se encuentra en una amplia gama de hábitats dentro de los cuales se encuentran suelos cultivados, bosques, praderas, desiertos, sedimentos y lodo de agua residuales. También se ha detectado en el interior de huevos de nematodos e incluso en el interior de hembras de nematodos. Asimismo, se ha detectado con frecuencia en la rizosfera de una gran diversidad de cultivos. Esta especie de hongo puede desarrollarse en distintas temperaturas desde los 5°C a 50°C. También tiene una amplia tolerancia del pH y se puede desarrollar en una gran variedad de sustratos (Linares, I. 2009). Existen diversas especies tales como *Paecilomyces lilacinus*, que se considera enemigo natural de insectos como la mosca blanca y chinche salivosa, y también se considera que es efectivo para el control de nematodos de género *Meloidogyne*, *Pratylenchus* y *Radopholus* produciendo enzimas capaces de actuar sobre los huevos, y larvas provocando deformaciones, y pérdida de movimiento.

Paecilomyces variotii es el estado asexual de *Byssochlamys spectabilis*, miembro del Phylum Ascomycota (Familia Trichocomaceae). Sin embargo, el estado de *Byssochlamys* rara vez se observa en el cultivo debido a la naturaleza heterotálica de ésta. *Paecilomyces variotii* crece rápidamente, produciendo una colonia pulverulenta de color amarillo-marrón. Esta especie también se ha descrito como nematocida para nematodos de género *Meloidogyne*, *Pratylenchus* y *Radopholus*.

Objeto de la invención

Es objeto de la invención una nueva cepa de *Paecilomyces variotii* con número de depósito CECT nº 20957.

Asimismo, es objeto de la invención el empleo de la cepa, y de la composición que la comprende, para la biofertilización, para potenciar el crecimiento y/o producción de plantas, por ejemplo cultivos hortícolas, plantas ornamentales e incluso forestales.

Son objeto de la presente invención todas las realizaciones que se mencionan en las reivindicaciones dependientes en esta memoria.

“Biofertilizante” y “bioestimulante” tienen el mismo significado, como sustancias que estimulan el crecimiento de las plantas.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a una nueva cepa promotora del crecimiento vegetal, denominada Pae10773, de la especie *Paecilomyces variotii*, que fue depositada el 26 de Junio de 2016, en la Colección Española de Cultivos Tipo) con CECT Nº 20957, (Universidad de Valencia, 56100 Burjassot, Valencia, España) según el Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos para Fines del Procedimiento de Patente.

Dicha cepa constituye un eficaz microorganismo bioestimulante y promotor del crecimiento de las plantas, tales como cultivos. Este hongo promotor, cultivado en forma biológicamente pura, se denomina Pae10773 y se ha identificado mediante la secuenciación de la región ITS (Internal Transcriber Spacer) del ADNr (que figura como SEQ ID Nº 1).

La cepa Pae10773 de *Paecilomyces variotii* se aisló de suelos naturales procedentes de la costa de Almería. La velocidad de crecimiento de *Paecilomyces variotii* en medio de cultivo agarizado (agar-malta) y en estufa a 25° C ha sido de:

- 5 - Día 0: 0 mm
- Día 2: 2,5 mm
- 10 - Día 4: dispersión de esporas por la placa (múltiples colonias aisladas)
- Día 6: crecimiento general.

15 La cepa Pae10773 de *Paecilomyces variotii* Pae10773 ha sido ensayada en condiciones de semillero y de campo. Los ensayos se han realizado en condiciones de uso comercial en el que, a modo de ejemplo, se puede indicar que en ningún caso en los que se ha ensayado se ha realizado una desinfección o esterilización de los sustratos o suelos en los que se ha realizado la inoculación, práctica que, en general es recomendada para muchos productos de este tipo, lo que supone una ventaja respecto a los productos biofertilizantes existentes.

20 Dadas las propiedades de esta nueva cepa, en la presente invención se contempla su uso para potenciar el crecimiento de plantas, por ejemplo, cultivos hortícolas, plantas ornamentales o forestales.

25 La presente invención se refiere también a una composición biofertilizante que comprende un cultivo biológicamente puro de la cepa Pae10773.

Según realizaciones particulares la presente invención se refiere también a una composición biofertilizante que comprende al menos:

- 30 - un cultivo biológicamente puro de la cepa Pae10773.
- un vehículo.

35 Del concepto "cultivo biológicamente puro de la cepa Pae10773" se debe entender que el cultivo puede contener metabolitos derivados de la propia cepa.

En esta memoria "cultivo biológicamente puro de la cepa Pae10773", "la cepa Pae10773", "esporas de la cepa Pae10773" o "Pae10773" se usan indistintamente.

40 La composición de la invención puede estar en forma sólida, líquida, gelificada o coloidal.

La composición de la invención puede comprender además uno o más microorganismos distintos de *Paecilomyces variotii*, por ejemplo, *Trichoderma*.

45 El vehículo tiene la función de ser un agente adecuado y necesario para la dispersión de la cepa, multiplicación, o ambas, o también para la conservación de las esporas sin que germinen, por ejemplo, cuando el vehículo es una solución salina.

50 El vehículo puede ser uno o más productos que se mezclan con el cultivo de la cepa Pae10773 como medio para obtener una composición que se pueda manipular, y que a la vez favorece la dispersión y/o multiplicación de la cepa.

Un vehículo en las composiciones de la presente invención, está seleccionado entre:

a) sustrato.

b) agua de riego.

5 c) solución salina.

d) mezclas de al menos dos de a) b) y c).

10 El vehículo puede ser sólido, líquido, coloidal o gelificado, por ejemplo, está gelificado en el caso de que se añada alginato. Así, en una realización particular de la composición de la invención, el vehículo se selecciona entre un medio sólido, líquido, coloidal o gelificado, donde van a ir incorporadas las esporas del hongo.

15 En el contexto de la presente invención, un sustrato es una sustancia o una mezcla de sustancias que se pueden utilizar para el crecimiento de plantas. Dicho sustrato puede ser, por ejemplo, cualquiera de los empleados habitualmente en horticultura.

20 Un sustrato generalmente comprende uno o más tipos de agregados ligeros neutros (perlita, vermiculita entre otros) y un constituyente orgánico (turba de Sphagnum, compost, entre otros), opcionalmente con suelo. En la formulación de sustratos las proporciones utilizadas de los ingredientes antes mencionados pueden variar, según el sustrato elegido, el tamaño de maceta, tipo de planta a producir, sistema de riego, entre otros factores y, por lo tanto, la cantidad hay que adaptarla para cada caso.

25 El sustrato puede ser por ejemplo turba, fibra de coco, compost y mezclas de los mismos. En realizaciones particulares los sustratos son compost, preferiblemente los obtenidos de orujo de vid, champiñón, residuos hortícolas, residuos sólidos urbanos, residuos de jardinería, vermicompost y mezclas de los mismos. En realizaciones preferidas de la composición de la invención, se emplean sustratos formulados a base de turba o de compost del tipo TCP
30 (Turba+compost+perlita), compost-turba-vermiculita, compost-turba-fibra de coco, o cualquier mezcla de los mismos.

35 Las composiciones sólidas pueden estar en forma de polvo, gránulos o polvos humectables, mientras que las composiciones líquidas pueden estar en forma de medios acuosos o no acuosos, en suspensiones, dispersiones o de forma concentrada. Asimismo, la cepa Pae10773 Paecilomyces variotii puede incluirse en matrices de biopolímeros (sin excluir otras posibles formulaciones) tales como alginato de calcio, agar, y los posibles aditivos que se consideren para cada situación a la que se destine el producto.

40 El microorganismo, es decir, la cepa Pae10773, se puede mezclar a modo de ejemplo, con solución salina, o se puede encapsular, o bien, se puede mezclar un sustrato, tal como turba, con las esporas de Pae10773.

45 Según realizaciones particulares la composición de la invención comprende un cultivo de Pae10773 mezclado con un sustrato, tal como turba, que actúa como vehículo, para su aplicación.

50 En el caso de mezclar el cultivo de la cepa con el sustrato, se puede también opcionalmente obtener una composición en la que el cultivo de la cepa está mezclado con solución salina, y esta mezcla en forma líquida, se agrega a un sustrato que actúa también - además de la solución salina - como vehículo.

La presente invención se refiere también a una combinación que comprende al menos:

- un cultivo biológicamente puro de la cepa Pae10773.
- un agente seleccionado entre:

- 5
- una planta
 - una semilla.

10 En el caso de la combinación de la invención, el agente, - la propia planta a la que se pretende bioestimular o una semilla de una planta - es el objeto sobre el que se pretende que la cepa Pae10773 produzca sus efectos.

La combinación según realizaciones particulares comprende:

- 15
- un cultivo biológicamente puro de la cepa Pae10773.
 - una planta.

La combinación según realizaciones particulares comprende:

- 20
- un cultivo biológicamente puro de la cepa Pae10773.
 - una semilla.
- 25
- un vehículo.

Un vehículo, que tiene las mismas funciones mencionadas anteriormente para las composiciones, en las combinaciones que comprenden semillas, según la presente invención está seleccionado entre:

- 30
- a. un sustrato.
 - b. agua de riego.
- 35
- c. solución salina.
 - d. mezclas de al menos dos de a), b) y c).

40 El sustrato en las combinaciones definidas puede ser cualquiera de los definidos anteriormente para las composiciones de la invención.

En el caso de que el agente sea una semilla, la cepa se puede mezclar con la semilla mediante el uso de una sustancia como alginato, de modo que las semillas quedan impregnadas de la cepa.

45 Es decir, la cepa puede incorporarse a la semilla, al sustrato donde se va a sembrar o simplemente añadirla en agua de riego.

50 La composición de la invención puede estar por lo tanto formando parte de una semilla, con lo que se obtiene una combinación como las que se han definido anteriormente. En este caso, las propias semillas actúan también como vehículo para dispersión y/o multiplicación de la cepa. Opcionalmente se puede preparar una combinación que contenga el microorganismo impregnado sobre semillas, y a su vez formando parte de un sustrato.

En las combinaciones definidas anteriormente, se pueden impregnar semillas con la suspensión de esporas, o mezclar un sustrato, tal como turba, con las esporas de Pae10773 -.

5 Tanto en las composiciones bioestimulantes como en las combinaciones definidas, la cepa Pae10773 está presente en forma de conidias. La concentración de conidias que es añadida a la composición o combinación puede estar comprendida entre $1 \cdot 10^8$ y $1 \cdot 10^{12}$ conidias/mL de agua.

10 Tanto las composiciones bioestimulantes como las combinaciones definidas anteriormente pueden incluir adyuvantes, tales como emulsionantes, agentes de suspensión, agentes de pegajosidad, etc., así como otro u otros agentes de estimulación del crecimiento y control biológico.

15 La obtención de la composición biofertilizante de la invención o las combinaciones definidas, se puede llevar a cabo mediante la inoculación de la cepa Pae10773 en el vehículo correspondiente, bien incorporada a un sustrato comercial como turba, o resuspendiendo las esporas a la dosis comercial en el vehículo que se desee ya sea líquido o sólido y que permita su supervivencia.

20 La composición de la invención es eficaz para potenciar el crecimiento y/o producción de plantas. Las plantas que pueden ser susceptibles de promoción del crecimiento comprenden plantas hortícolas, ornamentales e incluso forestales.

25 Sin establecer ninguna limitación, los efectos provocados por *Paecilomyces variotii* Pae10773 afectan al crecimiento de la planta, que puede ser en forma de incrementar la masa de la raíz, profundidad radicular, calibre del tallo o longitud de planta.

30 *Paecilomyces variotii* Pae10773 se puede aplicar en cualquier medio y ambiente sin limitación (al suelo, a un sustrato, a un cultivo hidropónico simplemente adicionándolo al agua) siempre y cuando se encuentre en las condiciones adecuadas (es decir, las condiciones normales de un cultivo).

35 En otro aspecto principal la invención se refiere al uso de *Paecilomyces variotii* Pae10773, al uso de la composición descrita, o al uso de las combinaciones descritas, para potenciar el crecimiento y/o producción de cultivos hortofrutícolas u otras plantas en suelos con problemas fitosanitarios o estrés.

40 En otro aspecto principal la invención se refiere al uso de *Paecilomyces variotii* Pae10773 con fungicidas compatibles. Para facilitar las tareas para el agricultor, en un mismo riego se puede utilizar otros microorganismos o fungicidas compatibles, en una sola aplicación.

45 Los métodos de aplicación de *Paecilomyces variotii* Pae10773 se realizan principalmente por medio de conidias. Sin establecer limitaciones, normalmente la composición comprende uno o varios coadyuvantes y el microorganismo en cuestión. La concentración de conidias que es añadida a la composición o combinación puede estar comprendida entre $1 \cdot 10^8$ y $1 \cdot 10^{12}$ conidias/mL de agua. Dicho microorganismo se ha producido en un medio de cultivo de base sólida suplementada con los elementos nutricionales requeridos para cada caso.

50 Tanto las composiciones bioestimulantes como las combinaciones definidas anteriormente pueden incluir adyuvantes, tales como emulsionantes, agentes de suspensión, agentes de pegajosidad, etc., así como otro u otros agentes de estimulación del crecimiento y control biológico.

- 5 La obtención de la composición biofertilizante de la invención o las combinaciones definidas, se puede llevar a cabo mediante la inoculación de la cepa Pae10773 en el vehículo correspondiente, bien incorporada a un sustrato comercial como turba, o resuspendiendo las esporas a la dosis comercial en el vehículo que se desee ya sea líquido o sólido y que permita su supervivencia.
- 10 La composición de la invención es eficaz para potenciar el crecimiento y/o producción de plantas. Las plantas que pueden ser susceptibles de promoción del crecimiento comprenden plantas hortícolas, ornamentales e incluso forestales.
- 15 Sin establecer ninguna limitación, los efectos provocados por *Paecilomyces variotii* Pae10773 afectan al crecimiento de la planta, que puede ser en forma de incrementar la masa de la raíz, profundidad radicular, calibre del tallo o longitud de planta.
- 20 *Paecilomyces variotii* Pae10773 se puede aplicar en cualquier medio y ambiente sin limitación (al suelo, a un sustrato, a un cultivo hidropónico simplemente adicionándolo al agua) siempre y cuando se encuentre en las condiciones adecuadas (es decir, las condiciones normales de un cultivo).
- 25 En otro aspecto principal la invención se refiere al uso de *Paecilomyces variotii* Pae10773, al uso de la composición descrita, o al uso de las combinaciones descritas, para potenciar el crecimiento y/o producción de cultivos hortofrutícolas u otras plantas en suelos con problemas fitosanitarios o estrés.
- 30 En otro aspecto principal la invención se refiere al uso de *Paecilomyces variotii* Pae10773 con fungicidas compatibles. Para facilitar las tareas para el agricultor, en un mismo riego se puede utilizar otros microorganismos o fungicidas compatibles, en una sola aplicación.
- 35 Los métodos de aplicación de *Paecilomyces variotii* Pae10773 se realizan principalmente por medio de conidias. Sin establecer limitaciones, normalmente la composición comprende uno o varios coadyuvantes y el microorganismo en cuestión. La concentración de conidias que es añadida a la composición o combinación puede estar comprendida entre $1 \cdot 10^8$ y $1 \cdot 10^{12}$ conidias/mL de agua. Dicho microorganismo se ha producido en un medio de cultivo de base sólida suplementada con los elementos nutricionales requeridos para cada caso.
- 40 La presente invención también se refiere a un método para estimular el crecimiento de las plantas que comprende obtener una composición como la que se ha definido anteriormente y poner en contacto las plantas o semillas de dichas plantas con la composición.
- 45 Los ejemplos que siguen a continuación ilustran la presente invención, pero no deben ser considerados como limitaciones a los aspectos esenciales del objeto de la misma, tal como han sido expuestos en los apartados anteriores de esta descripción.

Breve descripción de las figuras

- 45 Figura 1. Efecto de la aplicación de *P. variotii* Pae10773 en plántulas de brócoli. En cada parámetro se indica la unidad, por lo que el eje "y" solo son números que se corresponden con el eje x.
- 50 Figura 2. Efecto de la aplicación de *P. variotii* Pae10773 sobre el área foliar en plantas de brócoli.
- Figura 3. Efecto de la aplicación de *P. variotii* Pae10773 en un cultivo de brócoli en suelo.

Figura 4. Desarrollo de la raíz de pimiento expresado en Peso Seco (g) tras la aplicación de dos dosis de *Paecilomyces variotii* Pae10773 (PD1SN y PD2SN). SSN: Testigo plantas sensibles a nematodos; RSN: Testigo plantas resistente a nematodos.

5 Figura 5. Efecto de la aplicación *P. variotii* Pae10773 a tres dosis diferentes (10^4 , 10^5 , 10^6 esporas/mL) en el desarrollo de plántulas de tomate. CA: testigo sin *P. variotii* Pae10773. PAE D1, PAED2 Y PAED3: 10^4 , 10^5 , 10^6 esporas/mL, respectivamente.

10 Figura 6. Efecto de la aplicación *P. vañotti* Pae10773 a tres dosis diferentes (10^4 , 10^5 , 10^6 esporas/mL) en el desarrollo de plántulas de tomate (Diámetro del tallo y número de hojas). CA: testigo sin *P. variotii* Pae10773. PAE D1, PAED2 Y PAED3: 10^4 , 10^5 , 10^6 esporas/MI, respectivamente.

15 Figura 7. Peso seco de las hojas (g) de plantas de tomate transplantadas en campo conteniendo *P. variotii* Pae10773 a tres dosis diferentes (10^4 , 10^5 , 10^6 esporas/mL).

Figura 8. Peso seco de la raíz (g) de plantas de tomate transplantadas conteniendo *P. variotii* Pae10773 a tres dosis diferentes (10^4 , 10^5 , 10^6 esporas/mL).

20 Figura 9. Peso seco total (g) de plantas de tomate transplantadas conteniendo *P. variotii* Pae10773 a tres dosis diferentes (10^4 , 10^5 , 10^6 esporas/mL).

25 Figura 10. Índice de calidad QI de plantas de tomate transplantadas conteniendo *P. variotii* Pae10773 a tres dosis diferentes (10^4 , 10^5 , 10^6 esporas/mL).

Figura 11. Índice tallo-Raíz de plantas de tomate transplantadas conteniendo *P. variotii* Pae10773 a tres dosis diferentes (10^4 , 10^5 , 10^6 esporas/mL).

30 Ejemplos

Ejemplo 1

Una cepa del género *Paecilomyces variotii* se aisló de un suelo natural del parque Natural de Cabo de Gata (Níjar) de la provincia de Almería como sigue:

35 Se realizó una suspensión con 1 g de suelo en agua estéril. A continuación se realizaron diluciones sucesivas, y de cada una de las suspensiones se realizó extensión en Placa de Petri, incubación y posterior identificación de las colonias formadas. La cepa pura resultante se denominó Pae10773 y se identificó mediante PCR (Polymerase Chain Reaction) y posterior secuenciación de la región ITS (Internal Transcriber Spacer) del ADNr, perteneciendo a la especie *Paecilomyces variotii*.

Ejemplo 2

45 La cepa se creció en medio de cultivo agarizado PDA (*Potato Dextrose Agar*) en ambiente de laboratorio y se procedió a evaluar la cantidad de conidias producidas por Placa de Petri. A continuación, se procedió a la extracción de conidias y cuantificación en hematocímetro de su concentración. El producto final en agua estéril alcanzó una concentración entre $1 \cdot 10^7$ - $5 \cdot 10^8$ conidias/mL.

50 Los ensayos de viabilidad en medio salino mostraron viabilidad de conidias en el 100% de los casos, después de periodos de almacenamiento de 12 meses. Así como una adecuada conservación en dichos formulados, que se manifestaron en la ausencia de germinación en los mismos durante el periodo de almacenamiento.

Ejemplo 3

En la figura 1 y 2, se muestran los resultados obtenidos tras la aplicación de *Paecilomyces variotii* Pae10773 en el desarrollo de plántulas de brócoli en macetas de un volumen de 300 mL y el sustrato empleado fue turba. Se aplicó *Paecilomyces variotii* Pae10773 a la dosis de 10^6 esporas/mL de agua. La aplicación se realizó mediante riego (R) al sustrato. Se añadieron 5 mL de la suspensión con las esporas por planta y/o maceta en una única aplicación. La duración del ensayo fue de 30 días, y posteriormente, se procedió a la toma de datos de los parámetros morfológicos. Los resultados revelan que se produce un incremento de los parámetros morfológicos evaluados tras la aplicación de *Paecilomyces variotii* Pae10773. Se observa un incremento en un 20,26; 10,02; 9,18; 14,73 y 9,12 % en la altura, peso fresco, número de hojas, peso seco y área foliar, respectivamente. Las letras a, y b, indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos.

Ejemplo 4

Se realizaron ensayos de inoculación de *Paecilomyces variotii* Pae10773 en un cultivo comercial de brócoli en invernadero. La inoculación se realizó mediante la aplicación en riego de una dosis de $4 \cdot 10^6$ esporas/mL de agua. La aplicación se realizó una sola vez en el momento del trasplante añadiéndose 10 mL de la suspensión de conidias por planta. La duración del ensayo fue de 60 días.

En la figura 3, se muestran los resultados obtenidos tras la aplicación de *Paecilomyces variotii* Pae10773 en el desarrollo de brócoli. Como se puede comprobar se ha producido un incremento del 34,18; 2,70; 1,68 y 0,92 % en el peso seco de parte aérea, peso seco raíz, número de hojas y diámetro de la planta, respectivamente. Las letras a, y b, indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos.

Ejemplo 5

Dos dosis de conidias de *Paecilomyces variotii* Pae10773 (PD1SN: 10^5 esporas/mL de agua y PD2SN: 10^6 esporas/mL) de agua se aplicaron al sustrato (turba) 5 ml de suspensión de esporas a cada maceta de 300 mL de la suspensión con esporas, previo al desarrollo de plántulas de pimiento sensibles a nematodos, en ausencia total de nematodos en el sustrato. En la figura 4, se observa el desarrollo de la raíz expresado en Peso Seco (g) tras la aplicación de dichas dosis de *Paecilomyces variotii* Pae10773. Los resultados muestran que la aplicación de ambas dosis incrementa el peso seco de la raíz de pimiento, presentando PD2SN diferencias significativas con el testigo (SSN). El peso seco de la raíz correspondiente a la aplicación de la dosis PD2SN: 10^6 esporas/mL, no muestra diferencias significativas con el empleo de una variedad comercial de pimiento (RSN) con mayor vigor y con resistencia a nematodos. Las letras a, b y c, indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos.

Ejemplo 6

Tres dosis de conidias de *Paecilomyces variotii* Pae10773 (PaeD1: 10^4 esporas/mL, PaeD2: 10^5 esporas/mL de agua y PaeD3: 10^6 esporas/mL de agua) se aplicaron al desarrollo de plántulas de tomate. La aplicación se realizó mediante riego (R) al sustrato, añadiendo 1 mL de suspensión de esporas a macetas de 300 mL por planta en una sola aplicación. Los resultados revelan que se produce un incremento en la longitud del tallo para las tres dosis aplicadas, existiendo diferencias significativas con respecto al testigo (Figura 5). El mayor incremento se observa para la D1, suponiendo más de un 30% de la longitud del tallo con respecto al testigo (CA). Asimismo, este mismo efecto se observa para los parámetros diámetro del tallo y número

de hojas. (Figura 6). Las letras a, b y c, indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos.

Ejemplo 7

5 Tres dosis de conidias de *Paecilomyces variotii* Pae10773 (PaeD1: 10^4 esporas/mL, PaeD2: 10^5 esporas/mL de agua y PaeD3: 10^6 esporas/mL de agua) se aplicaron al desarrollo de plántulas de tomate. La aplicación se realizó mediante riego (R) al sustrato. La aplicación se
10 realizó mediante riego (R) al sustrato, añadiendo 1 mL de suspensión de esporas a macetas de 300 mL, por planta en una sola aplicación. Dichas plántulas fueron sembradas en cultivo enarenado en un invernadero tipo parral y se le aplicó de nuevo las mismas dosis *Paecilomyces variotii* Pae10773, mediante riego a la plántula 15 días después del trasplante, con la dosis anteriormente indicada. Los resultados revelan que se produce un mayor
15 desarrollo de la planta como evidencia los valores alcanzados para el peso seco de la raíz, el peso seco de las hojas y el peso seco total, (figuras 7, 8 y 9). Asimismo, el índice de calidad de planta indica que las mejores dosis se corresponden con la D1 y D3, (figura 10), aunque el índice tallo raíz, que corresponden a valores bajos, mejor calidad de la planta, las tres dosis resultaron satisfactorias (Figura 11). El volumen radical fue superior para las tres dosis, lo que
20 significa un menor estrés en el trasplante. Las letras a, y b, indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos.

REIVINDICACIONES

- 5 1. La cepa Pae10773 de *Paecilomyces variotii* que fue depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo con CECT N°20957.
2. Secuencia parcial no codificante del gen ribosomal de la cepa Pae10773 definida en la reivindicación 1, SEQ ID NO: 1.
- 10 3. Composición biofertilizante que comprende un cultivo biológicamente puro de la cepa Pae10773.
- 4 Composición biofertilizante según la reivindicación 3, que comprende al menos:
- 15 - un cultivo biológicamente puro de la cepa Pae10773.
- un vehículo.
- 20 5. Composición según una de las reivindicaciones 3 o 4, que está en forma sólida, líquida, gelificada o coloidal.
- 25 6. Una combinación que comprende al menos:
- un cultivo biológicamente puro de la cepa Pae10773 definida en la reivindicación 1.
- un agente seleccionado entre:
- 30 - una planta
- una semilla.
7. Una combinación según la reivindicación 6, que comprende al menos:
- 35 - un cultivo biológicamente puro de la cepa Pae10773 definida en la reivindicación 1.
- una planta.
8. Una combinación según la reivindicación 6, que comprende al menos:
- 40 - un cultivo biológicamente puro de la cepa Pae10773 definida en la reivindicación 1.
- una semilla.
- un vehículo.
- 45 9. Composición según la reivindicación 4, o una combinación según la reivindicación 8, en la que el vehículo está seleccionado entre:
- a) sustrato.
- 50 b) agua de riego.
- c) solución salina.
- d) mezclas de al menos dos de a) b) y c).

10. Composición según una de las reivindicaciones 3 a 5, o una combinación según una de las reivindicaciones 6 a 8, que comprende además uno o más microorganismos distintos de *Paecilomyces variotii*.
- 5 11. Composición según la reivindicación 4, o una combinación según la reivindicación 9, en la que el sustrato está seleccionado entre turba, fibra de coco, compost y combinaciones de los mismos.
- 10 12. Composición, según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, o una combinación según una de las reivindicaciones 6 a 8, donde la cepa Pae10773 está presente en forma de conidias.
13. Composición o combinación según la reivindicación 12 a la cual se han añadido conidias a una concentración comprendida entre $1 \cdot 10^8$ y $1 \cdot 10^{12}$ conidias/mL de agua.
- 15 14. Composición según una de las reivindicaciones 3 a 5, o una combinación según una de las reivindicaciones 6 a 8, que comprende además al menos una de las siguientes sustancias:
- un adyuvante
- 20 - un agente de estimulación del crecimiento
- un agente de control biológico
- 25 - combinaciones de dos o más de los anteriores.
15. Composición o combinación según la reivindicación 14, en la que el adyuvante está seleccionado entre un emulsionante, un agente de suspensión y un agente de pegajosidad.
- 30 16. Uso de la cepa definida en la reivindicación 1, o de una composición definida en una de las reivindicaciones 3-5, o de una combinación definida en una de las reivindicaciones 6 a 8, para potenciar el crecimiento, la producción, o el crecimiento y la producción de plantas.
- 35 17. Uso según la reivindicación 16 en el que las plantas son plantas en suelos con problemas fitosanitarios o estrés.
18. Uso según la reivindicación 16 o 17 en el que las plantas son cultivos hortícolas, plantas ornamentales o forestales.
- 40 19. Uso según una de las reivindicaciones 16 a 18 en el que la cepa Pae10773 se utiliza simultáneamente con fungicidas compatibles.

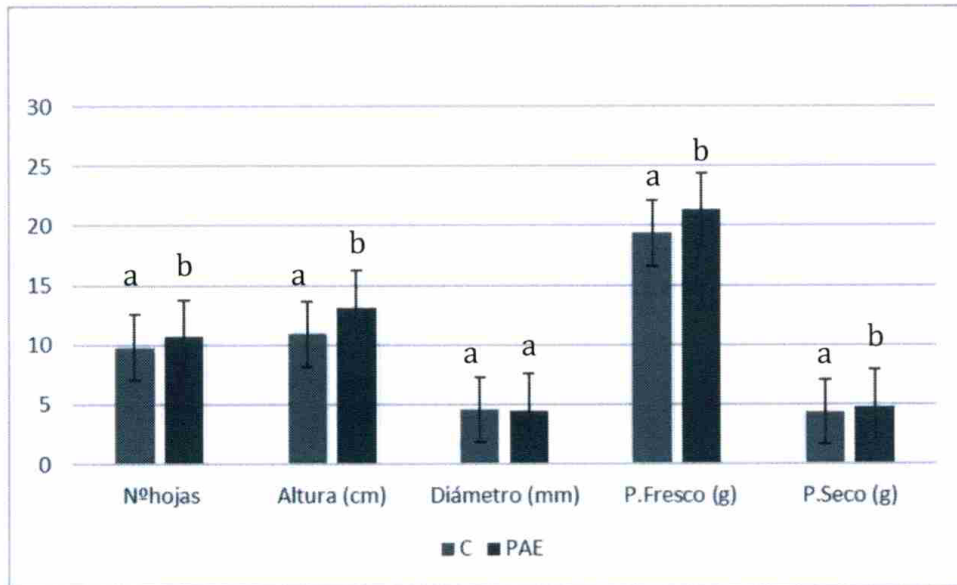


Figura 1

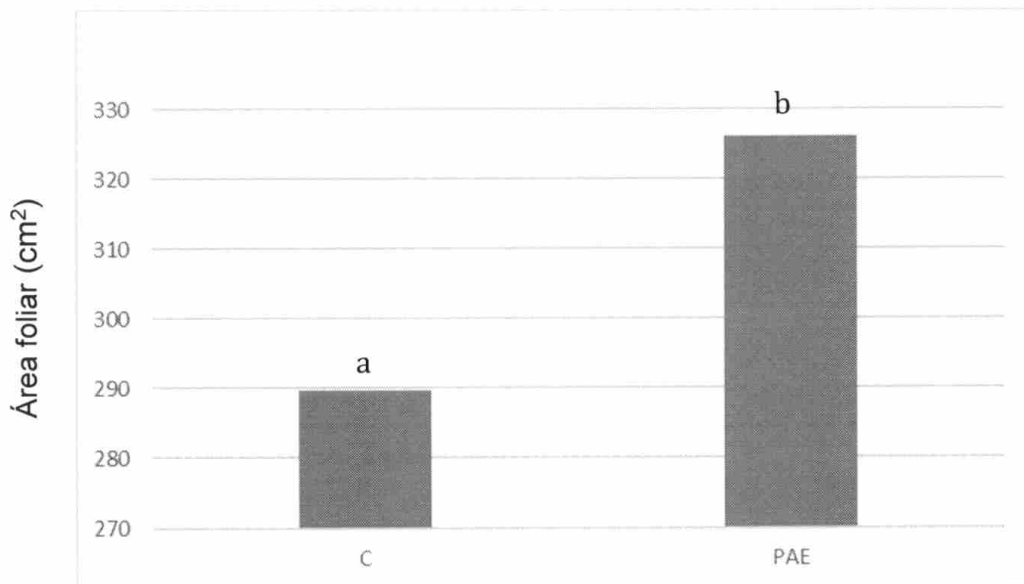


Figura 2

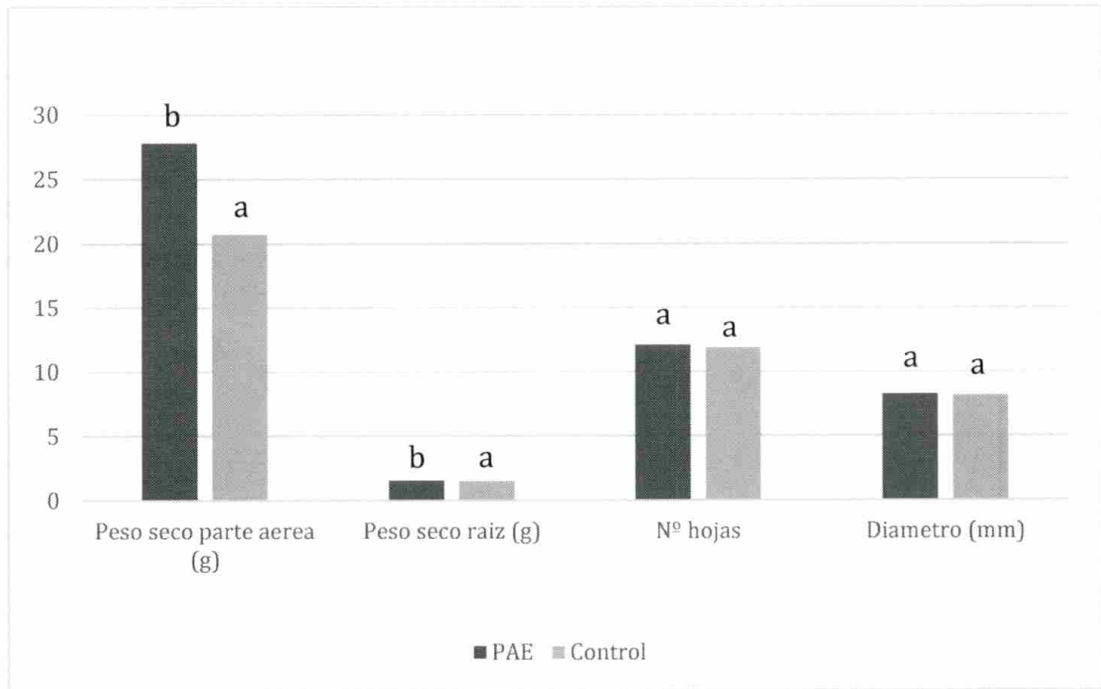


Figura 3

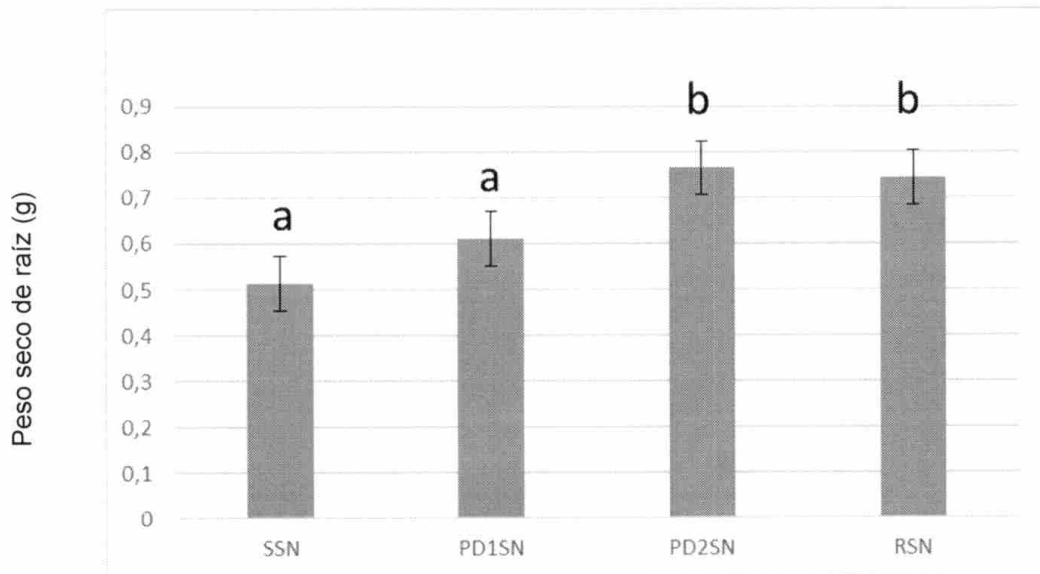


Figura 4

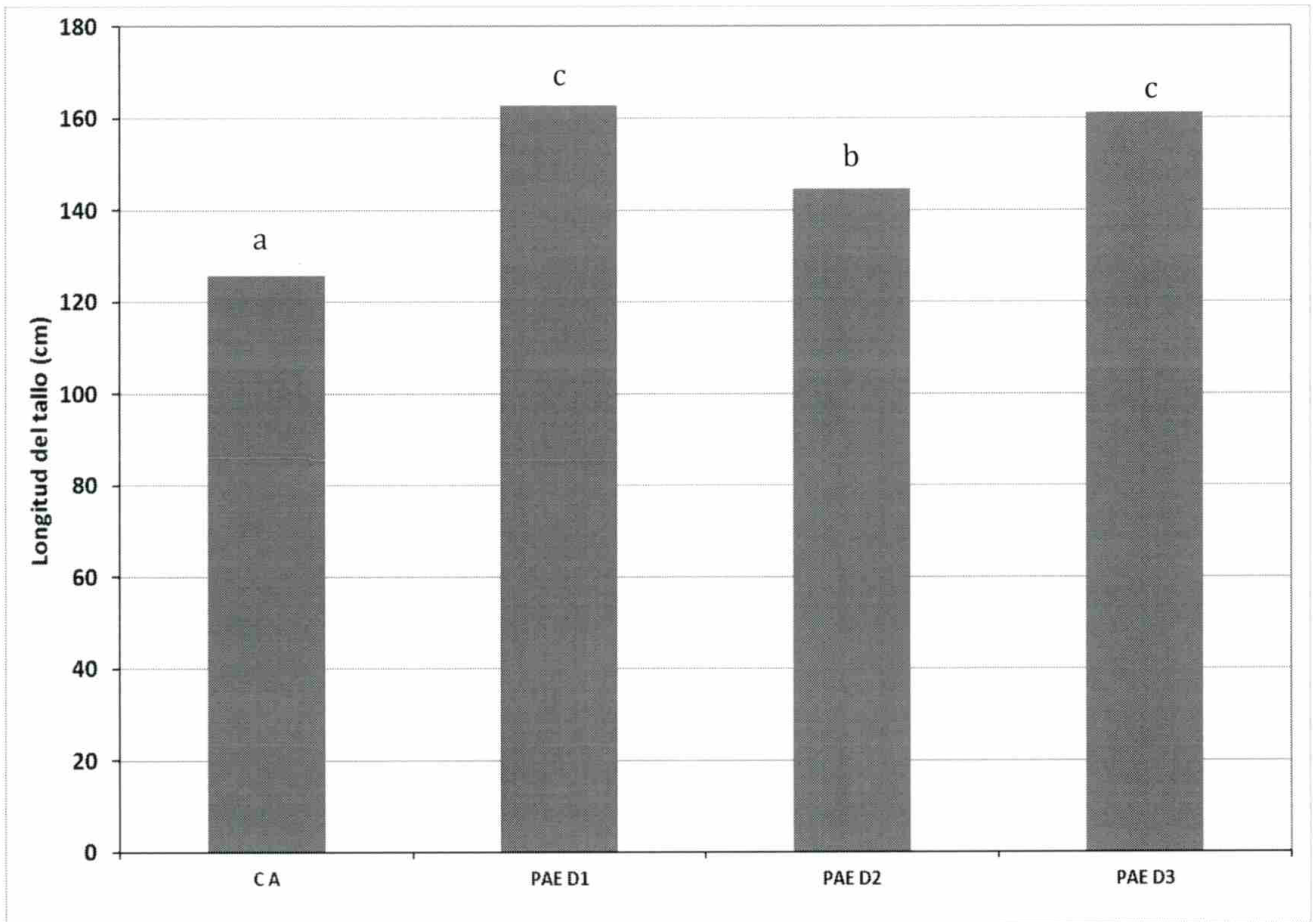


Figura 5

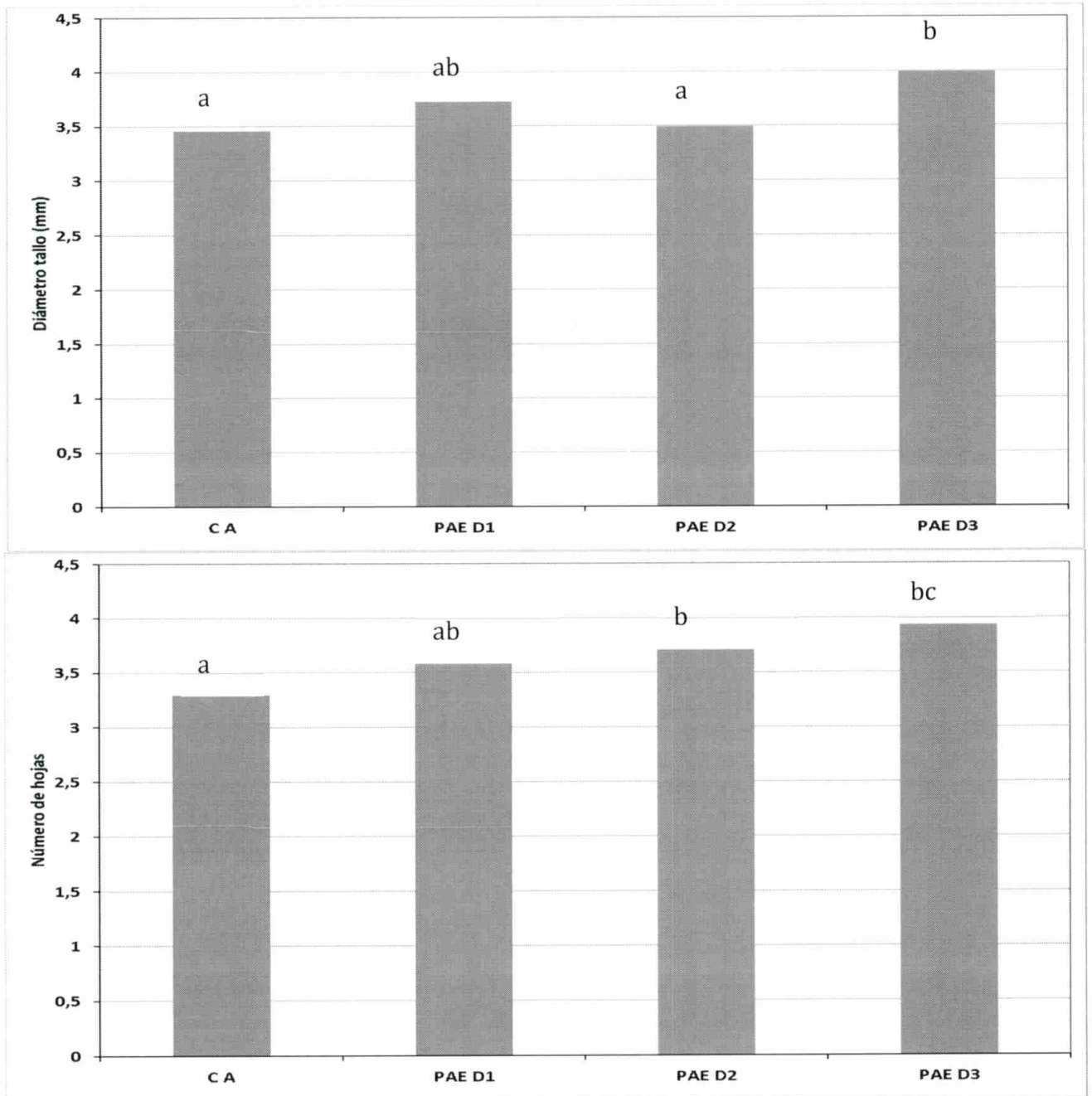


Figura 6

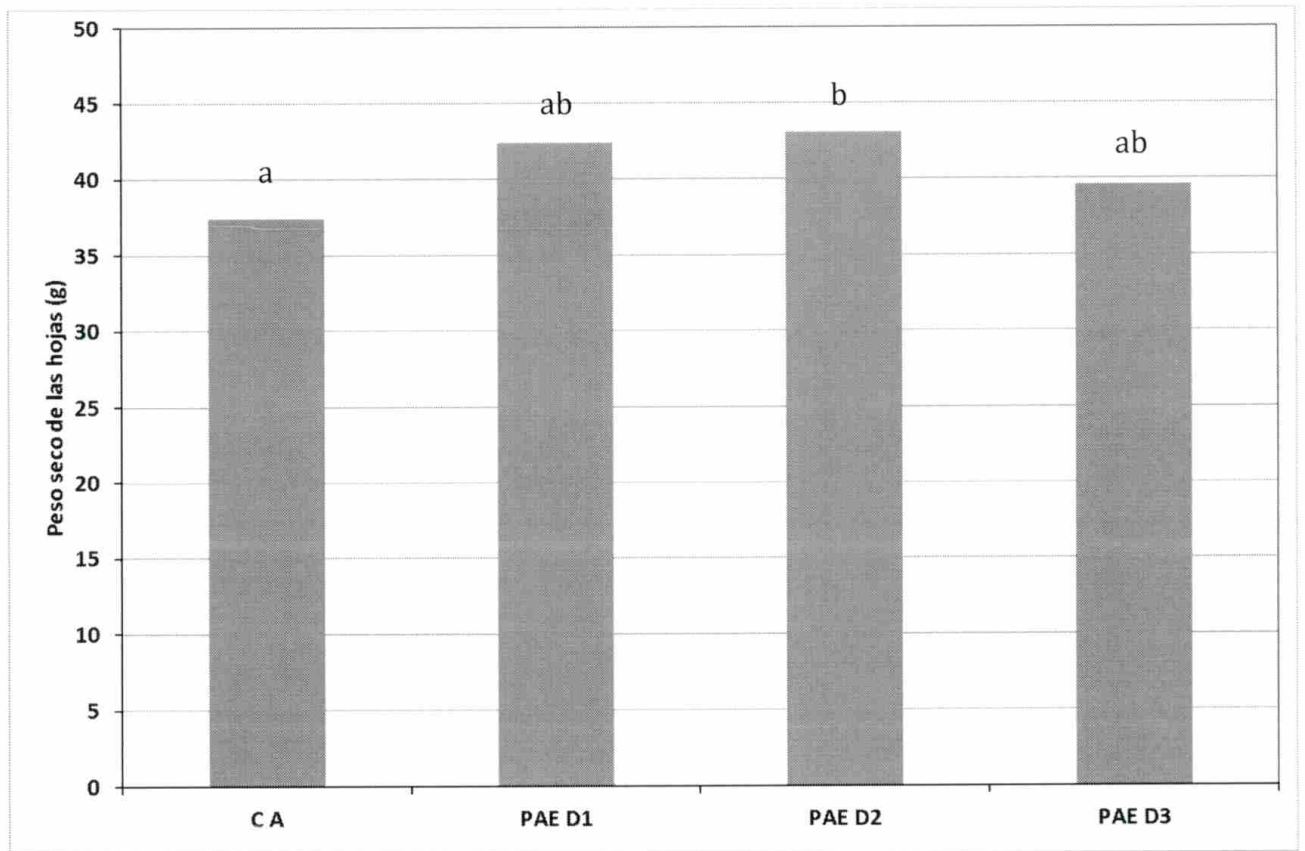


Figura 7

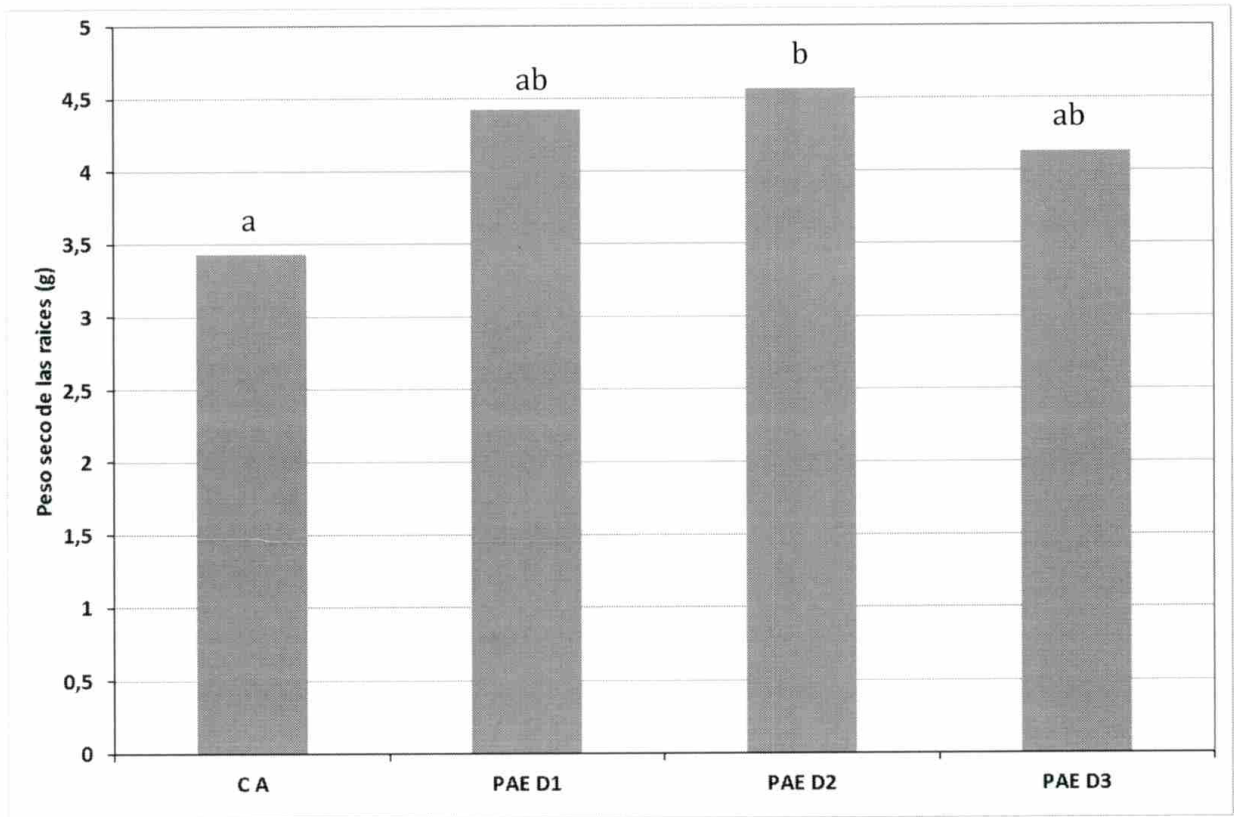


Figura 8

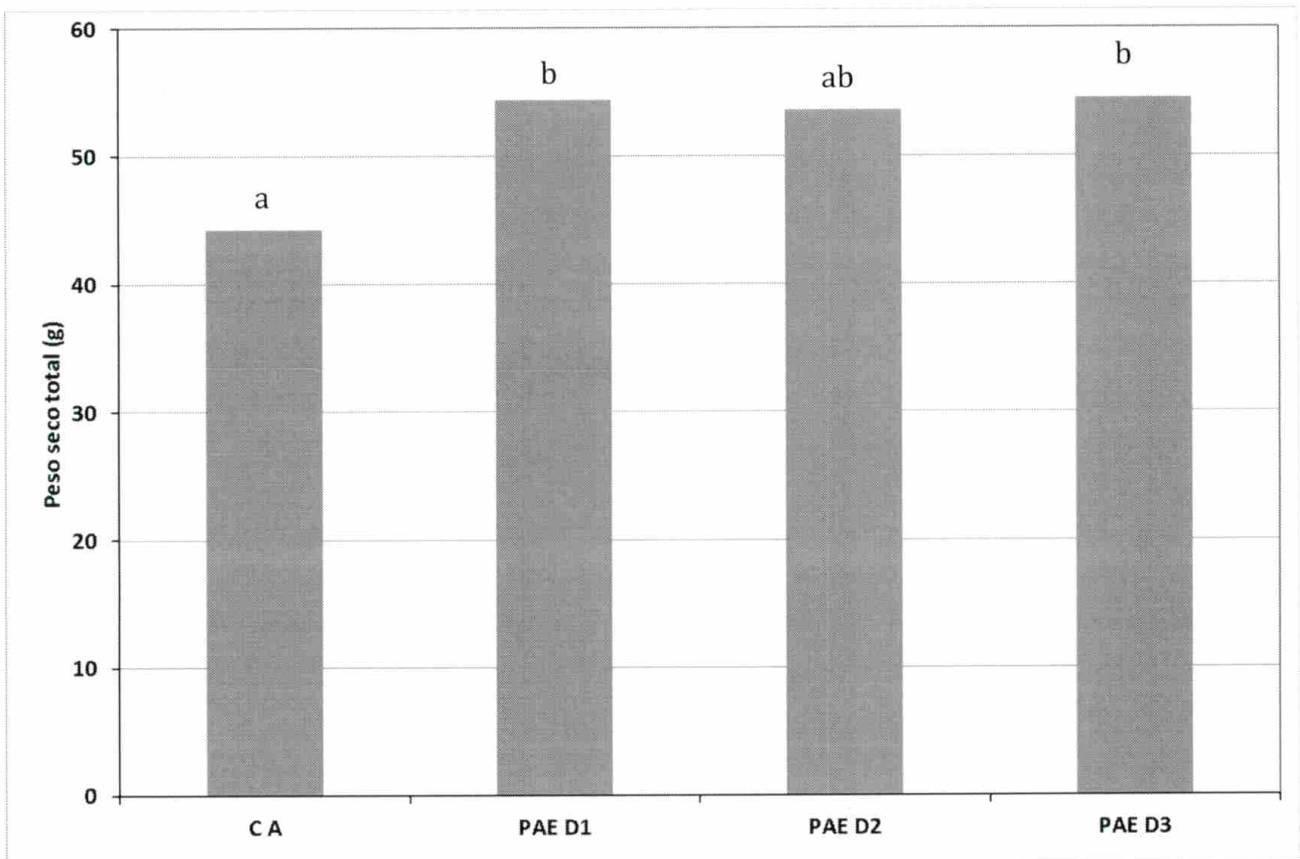


Figura 9

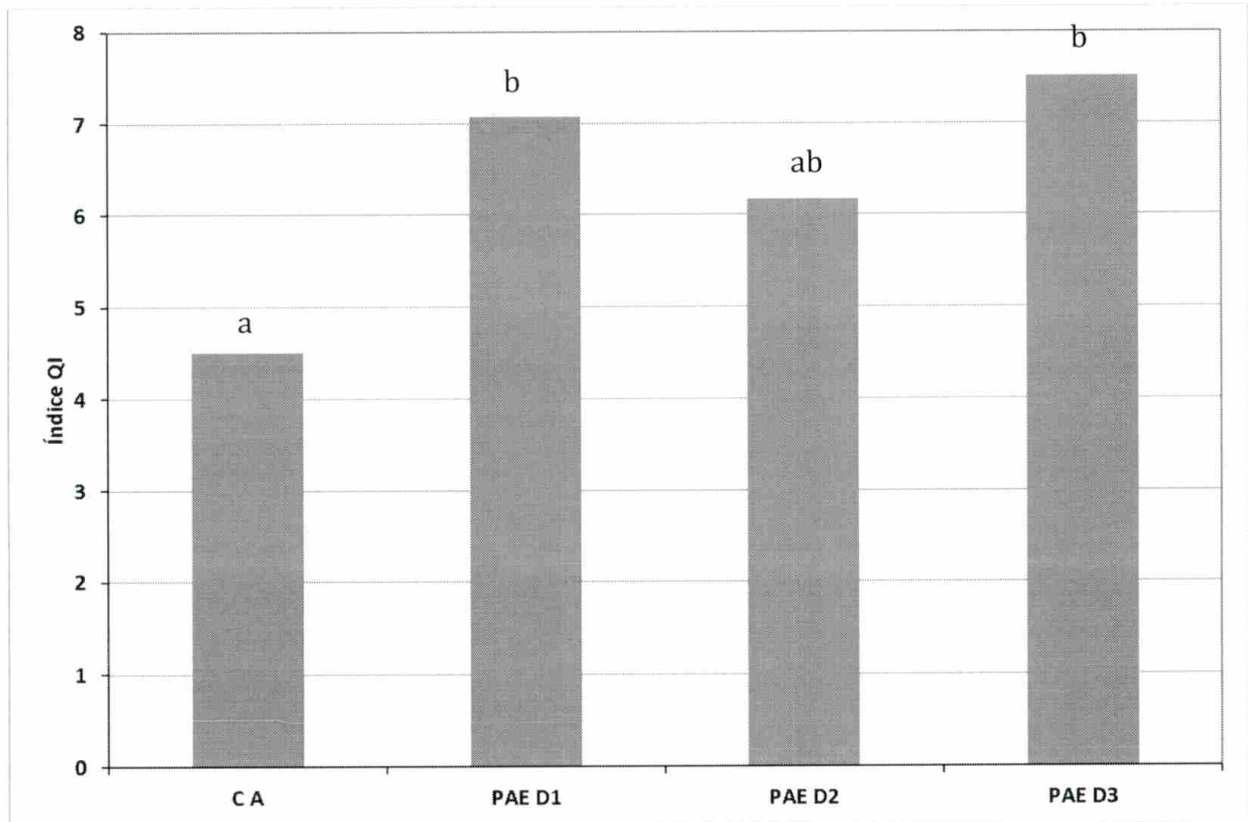


Figura 10

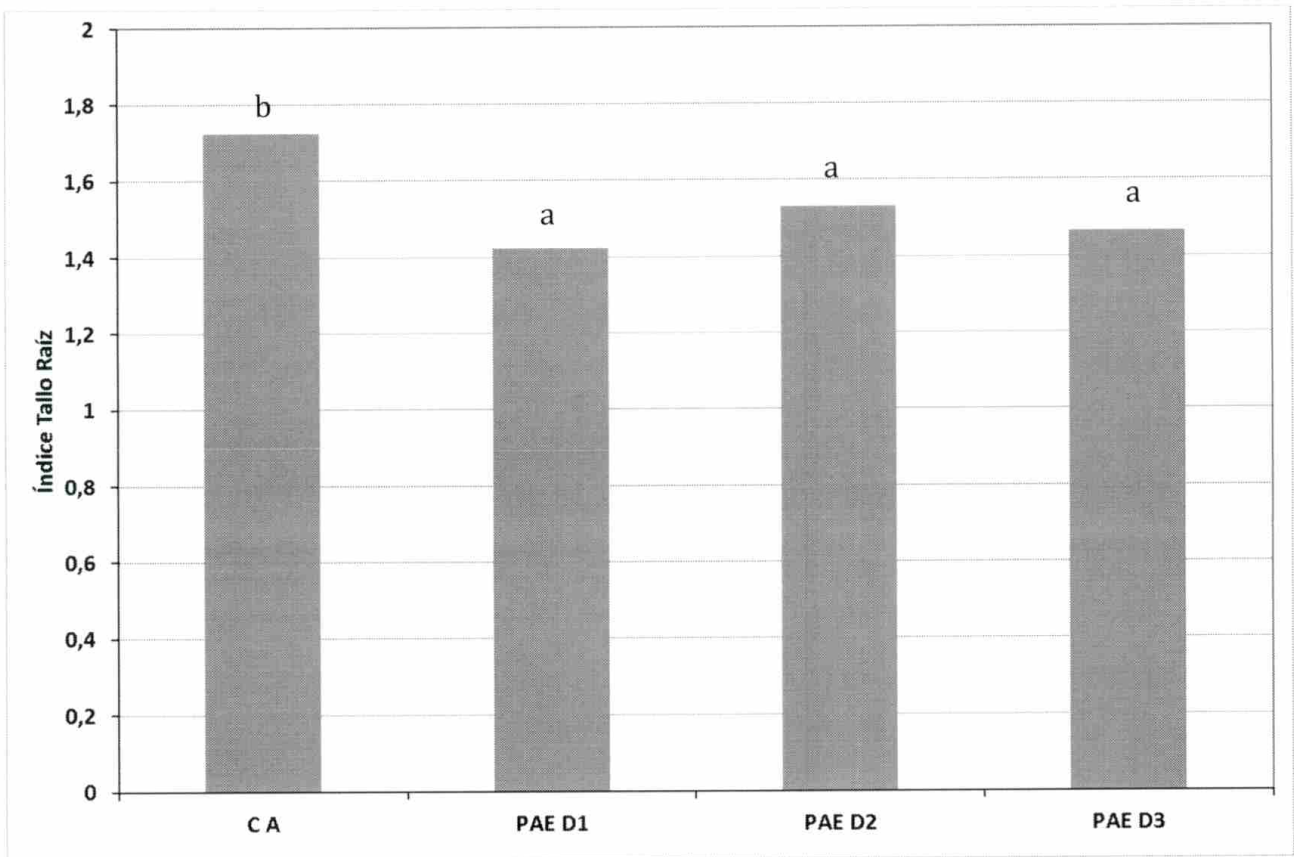


Figura 11



- ②① N.º solicitud: 201700542
②② Fecha de presentación de la solicitud: 31.03.2017
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	Base de datos ENA. Número de acceso JX282326, versión 1. 16.08.2012. Recuperado de Internet [en línea] [recuperado el 16.01.2018] https://www.ebi.ac.uk/ena/data/view/JX282326&display=text	2
Y	CN 104745483 A (SHANDONG PENGBEI BIOTECHNOLOGY CO LTD) 01/07/2015, Resúmenes de las bases de datos EPODOC y WPI. Recuperados de EPOQUE. [En línea]. Recuperados de Internet. Recuperados el 18.01.2018.	1, 3-19
Y	ES 2411807 A1 (UNIV ALMERIA) 08/07/2013, Página 13, línea 1-página 15, línea 6; página 16, líneas 8-20.	1, 3-19
A	WO 2014029747 A1 (BAYER CROPSCIENCE AG) 27/02/2014, Página 11, línea 28; página 32, línea 30-página 36, línea 11.	1, 3-19
A	ANIS MUHAMMAD et al. Bioefficacy of microbial antagonists against <i>Macrophomina phaseolina</i> on sunflower. Pakistan Journal of Botany, 2010, vol. 42 (4) Páginas 2935-2940, ISSN 0556-3321.	1, 3-19
A	EP 0290193 A1 (SANKYO CO) 09/11/1988, página 5, línea 31-página 6, línea 8.	1
A	CN 105255746 A (PLANT PROT RES INST GUANGDONG ACADEMY AGRICULTURAL) 20/01/2016, resúmenes de las bases de datos EPODOC y WPI. Recuperados de EPOQUE. [En línea]. Recuperados de Internet. Recuperados el 18.01.2018.	1, 3-19

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia
Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría
A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita
P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud
E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
22.01.2018

Examinador
A. I. Polo Diez

Página
1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C12N1/14 (2006.01)
A01N63/04 (2006.01)
C05F11/08 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12N, A01N, C05F

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, INTERNET, BD-TXTE, HCAPLUS, BIOSIS

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 22.01.2018

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1, 3-19	SI
	Reivindicaciones 2	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-19	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	Base de datos ENA. Nº de acceso JX282326	16.08.2012
D02	CN 104745483 A (SHANDONG PENGBEI BIOTECHNOLOGY CO LTD)	01.07.2015
D03	ES 2411807 A1 (UNIV ALMERIA)	08.07.2013

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

1. Novedad (art 6.1 de L.P)

1.1. Secuencia (reivindicación 2)

El documento D01, página de la base de datos ENA (European Nucleotide Archive), muestra una secuencia de la región ITS (Internal Transcriber Spacer) del ADN ribosomal de *Paecilomyces variotii* con número de registro JX282326 que tiene una 100% de identidad con la secuencia de la reivindicación 2 (SEQ ID nº 1).

Por lo tanto, a la vista del documento D01, la secuencia de la reivindicación 2 no cumple el requisito de novedad.

1.2. Cepa, composición y combinación que la contiene y usos de la cepa (reivindicaciones 1, 3-19)

Ningún documento del estado de la técnica muestra una cepa con el mismo número de depósito que la cepa de la reivindicación 1, por lo que se supone que dicha cepa es nueva.

La reivindicación 1 que se refiere a la cepa, así como las reivindicaciones dependientes 3-19 que se refieren a las composiciones o combinaciones que la contiene y al uso de la misma, también se consideran nuevas.

2. Actividad inventiva (art. 8.1 de la L.P.)

El documento D02 divulga una cepa (SJ1), de la misma especie *Paecilomyces variotii* que la cepa de la solicitud. Dicha cepa promueve el crecimiento de las plantas de arroz y maíz y, por lo tanto, puede ser utilizada como hongo promotor del crecimiento vegetal y formar parte de composiciones biofertilizantes o bioestimulantes.

La diferencia entre la primera reivindicación de la solicitud y el documento D02 es que la cepa mencionada en la solicitud es otra cepa de la misma especie de hongo (Pae 10773, CECT 20957). En ausencia de un efecto técnico diferente o mejorado de la cepa de la reivindicación 1 respecto a la cepa ya conocida en el documento D02, se considera que la nueva cepa de la reivindicación 1 es una cepa alternativa y equivalente a la del documento D02 y, que por lo tanto, carece de actividad inventiva.

Las reivindicaciones dependientes 3 a 19 no aportan características, que en combinación con las reivindicaciones de las que dependen, le otorguen actividad inventiva a la invención. Dichas reivindicaciones se refieren a combinaciones, composiciones y usos de la cepa de la reivindicación 1. Sin embargo, tanto los ingredientes utilizados en las composiciones como los usos de la cepa ya han sido divulgados para hongos promotores del crecimiento vegetal, es decir, para microorganismos del mismo tipo.

En ese sentido, el documento D03 muestra composiciones biofertilizantes (que contiene otro hongo promotor del crecimiento) que pueden presentarse en forma sólida, líquida o coloidal, pueden incluir otros adyuvantes, un sustrato, agentes de pegajosidad, otro agente de control biológico, etc. Estas formulaciones se pueden utilizar para potenciar el crecimiento de cultivos hortícolas, ornamentales y forestales y en plantas con problemas fitosanitarios (página 13, línea 1-página 15, línea 6; página 16, líneas 8-20).

En resumen, las reivindicaciones 1 y 3 a 19 carecen de actividad inventiva a la vista de la combinación de documentos D02 y D03.

En consecuencia, ninguna de las reivindicaciones 1-19 cumple todos los requisitos de patentabilidad del art. 4.1 de la Ley de Patentes de 11/1986.