

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 792 777**

21 Número de solicitud: 202030830

51 Int. Cl.:

**C12N 1/19** (2006.01)

**A01N 63/32** (2010.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN

B2

22 Fecha de presentación:

**03.08.2020**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**11.11.2020**

Fecha de concesión:

**14.05.2021**

45 Fecha de publicación de la concesión:

**21.05.2021**

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
(100.0%)**

**Avenida de Séneca, 2  
28040 Madrid (Madrid) ES**

72 Inventor/es:

**GÓMEZ GARAY, Aránzazu;  
PINTOS LÓPEZ, Beatriz y  
ASTUDILLO CALDERÓN, Sergio**

54 Título: **CEPA DE *Meyerozyma guilliermondii*, COMPOSICIÓN Y MÉTODOS PARA PROMOVER EL CRECIMIENTO Y ACTIVAR LAS DEFENSAS DE LAS PLANTAS**

57 Resumen:

Cepa de *Meyerozyma guilliermondii*, composición y métodos para promover el crecimiento y activar las defensas de las plantas.

La presente invención se refiere a una nueva cepa de *Meyerozyma guilliermondii* que presenta, simultáneamente, la capacidad de promover el crecimiento de las plantas y la capacidad de controlar las infecciones por hongos fitopatógenos. Incluye, también, cepas mutantes y/o derivadas de esta cepa de *M. guilliermondii*, que mantienen sus mismas propiedades.

También se refiere a composiciones que incluyen dicha cepa, sus mutantes y/o cepas derivadas, para su uso como bioestimulante y/o bioplaguicida en plantas y a métodos para promover el crecimiento y activar las defensas de las plantas que incluyen la adición de la nueva cepa de *M. guilliermondii*.

ES 2 792 777 B2

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 41 LP 24/2015.  
Dentro de los seis meses siguientes a la publicación de la concesión en el Boletín Oficial de la Propiedad Industrial cualquier persona podrá oponerse a la concesión. La oposición deberá dirigirse a la OEPM en escrito motivado y previo pago de la tasa correspondiente (art. 43 LP 24/2015).

## DESCRIPCIÓN

### CEPA DE *Meyerozyma guilliermondii*, COMPOSICIÓN Y MÉTODOS PARA PROMOVER EL CRECIMIENTO Y ACTIVAR LAS DEFENSAS DE LAS PLANTAS

5

#### SECTOR DE LA TÉCNICA

La presente invención se encuadra dentro del sector agrario, en el campo del control de infecciones por hongos en plantas y productos agroalimentarios, y de la promoción del crecimiento de las plantas mediante biofertilizantes. Más concretamente, está relacionada con los sectores de la Producción Vegetal, la Fitopatología y la Industria Agroalimentaria, y se refiere a la aplicación de levaduras como promotoras del crecimiento, para el biocontrol de hongos fitopatógenos y como elicitadoras de compuestos de interés agroalimentario.

15

#### ANTECEDENTES DE LA INVENCION

En el campo de la agricultura, durante las últimas décadas, se han venido buscando sustitutos a los productos químicos de síntesis tanto para evitar infecciones en las plantas y pérdidas de alimentos en los productos cosechados, como para favorecer el crecimiento de las plantas y potenciar el aumento de la producción vegetal. En este sentido, uno de los campos de estudio se ha centrado en la utilización de microorganismos con capacidad antifúngica y/o antimicrobiana y se han obtenido tanto bacterias como levaduras de utilidad. De igual manera, otro grupo de microorganismos se han revelado útiles como biofertilizantes.

25

Se han descrito bacterias y levaduras con poder antifúngico:

US6960342B2 se refiere a una cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* con actividad antifúngica ante una variedad de hongos incluyendo distintas especies de géneros como *Alternaria*, *Curvularia*, *Fusarium*, *Sclerotium*, etc.

ES2519168T3 y ES2401004T3 describen la utilización de una cepa de *Metschnikowia fructicola* en el tratamiento de plantas frente a microorganismos no deseados citando especies pertenecientes, entre otros, a los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* o *Fusarium*.

35

US6423310B1 se refiere al biocontrol de enfermedades poscosecha en plantas mediante métodos que incluyen el uso de microorganismos antagonistas pertenecientes a, entre otros, los géneros *Candida*, *Cryptococcus*, *Pichia*, *Bulleromyces*, *Rhodotorula*,  
5 etc.

En *Biological Control* (2008) 47:207-215, Chanchaichaovivat, A. *et al.* describen una cepa de *Pichia guilliermondii* con capacidad antifúngica postcosecha frente a *Colletotrichum capsici*.

10

En cuanto a las soluciones para incrementar el crecimiento vegetal, podemos citar varios documentos:

ES2147160B1 incluye la descripción de dos cepas bacterianas (*Bacillus pumilus* y *B. licheniformis*) productoras de compuestos reguladores del crecimiento vegetal, del grupo de las giberelinas.

15

ES2594455T3 incluye una cepa de *Glomus iranicum* var. *Tenuihypharum* que, junto con otros componentes, se usa como bioestimulante.

20

En 2019, Xia y col. publican un trabajo en el que identifican 740 aislados fúngicos cultivables que pueden ser beneficiosos para el crecimiento, la salud y el rendimiento de las plantas (Xia, Y. *et al. Scientific Reports* (2019) 9:1669). Entre ellos, seleccionan 6 cepas con capacidades especialmente interesantes: *Coniothyrium aleuritis* aislado 42,  
25 *Pichia guilliermondii* aislado F15, *Fusarium oxysporum* cepa NSF2, *Fusarium proliferatum* cepa AF04, *Aspergillus nidulans* cepa FH5, y *Trichoderma spirale* cepa YIMPH30310.

25

Basha, H. y Ramanujam, B. publican en 2015 (*Biocontrol Science and Technology* 25(2):185-206) un estudio sobre una cepa de *Pichia guilliermondii* y una cepa de *Hanseniaspora uvarum* con interés en la promoción del crecimiento y en el biocontrol, respectivamente.

30

El interés por encontrar cepas de microorganismos capaces de mejorar las condiciones de las plantas de interés agroalimentario, bien frente a enfermedades, bien en cuanto a  
35

su rendimiento, es evidente. Sin embargo, hasta el momento, se han dado a conocer cepas de bacterias o de levaduras con capacidades concretas dentro del amplio abanico de actividades que se están investigando.

## 5 EXPLICACIÓN DE LA INVENCION

Cepa de *Meyerozyma guilliermondii*, composición y métodos para promover el crecimiento y activar las defensas de las plantas.

10 Un aspecto de la presente invención se refiere a una cepa de *Meyerozyma guilliermondii* aislada en 2016 a partir de madera de vid sin síntomas de enfermedad en un campo de plantas con síntomas de yesca en La Rioja y depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), Universidad de Valencia, Parque Científico UV, 46980 Paterna (Valencia), con número de referencia CECT13190, que comprende la secuencia  
15 caracterizada por SEQ ID NO: 3.

En esta memoria descriptiva se muestra cómo *M. guilliermondii* CECT13190 favorece el crecimiento de las plantas, por lo que una de sus aplicaciones es como bioestimulante en plantas y, además, activa las defensas de las plantas, de manera que puede  
20 aplicarse también como bioplaguicida.

El ácido indol-3-acético (AIA), o auxina, es un promotor del crecimiento y del rendimiento de los cultivos al inducir la formación y el aumento de pelos radiculares que facilitan la captación de nutrientes. *M. guilliermondii* CECT13190 presenta producciones de 9,8  
25 µg/mL de AIA. Se observa la producción del ácido indol acético en ausencia de L-triptófano (7,2 µg/mL), lo que muestra que esta levadura es capaz de producir la hormona por una vía distinta y, por tanto, sin el uso del aminoácido como precursor. Las concentraciones son suficientes como para que se observe un incremento en el crecimiento de la planta.

30

Por otro lado, el principal nutriente en agricultura para el crecimiento de las plantas es el nitrógeno; de hecho, para una planta que tiene cubiertas sus necesidades hídricas, el factor limitante fundamental es el nitrógeno. Por lo tanto, los microorganismos capaces de fijarlo son una herramienta útil como bioestimulantes. La capacidad de *M.*  
35 *guilliermondii* CECT13190 de fijar nitrógeno atmosférico y, por tanto, de transformarlo

en  $\text{NH}_4^+$ , permite que este nutriente quede disponible para la planta. Esta capacidad se considera un rasgo característico de los Microorganismos Promotores del Crecimiento Vegetal. Además, el régimen nutricional nitrogenado tiene un impacto en los patrones de biosíntesis de aminoácidos que afecta la expresión génica, incluida la de los genes de defensa.

Otro nutriente esencial para las plantas es el fósforo que, muy frecuentemente, se encuentra en el terreno en forma insoluble. En este sentido, los microorganismos capaces de solubilizar el fósforo están reconocidos como promotores del crecimiento vegetal puesto que los fosfatos solubles son absorbidos por la planta y esto mejora su crecimiento y su productividad. La cepa *M. guilliermondii* CECT13190 también es capaz de solubilizar el fósforo.

Además, *M. guilliermondii* CECT13190 produce 3-metil-1-butanol, un compuesto orgánico volátil conocido por presentar actividad como promotor de crecimiento vegetal.

*M. guilliermondii* CECT13190 actúa también en el control de patógenos internos que crecen y se transportan por los vasos de las plantas y que, por consiguiente, son difíciles de tratar con tratamientos convencionales que, además, pueden resultar perjudiciales para el medio ambiente (como los fitoquímicos).

Entre los compuestos orgánicos volátiles producidos por *M. guilliermondii* CECT13190, se han detectado cantidades significativas de hexametil ciclotriloxano, conocido por su actividad frente a patógenos, fenil etil alcohol, que ralentiza el crecimiento fúngico, e isogeraniol, compuesto conocido como antifúngico.

Además, la cepa de la invención produce sideróforos que se comportan como agentes quelantes secuestrando hierro aun en presencia de otros metales y reduciéndolo a  $\text{Fe}^{2+}$ , lo que favorece su solubilidad y su disponibilidad como nutriente, impulsando el crecimiento vegetal, al mismo tiempo que promueve el control biológico de hongos y bacterias patógenos para las plantas.

*M. guilliermondii* CECT13190 reduce la producción de superóxido dismutasa (SOD). Se reduce así la transformación de especies reactivas de oxígeno (ERO) a peróxido de hidrógeno, lo que se podría traducir en un aumento en el estrés oxidativo, induciendo la

expresión de genes relacionados con la patogénesis (PR).

*M. guilliermondii* CECT13190 aumenta la producción de ácido oxálico en las plantas. El ácido oxálico puede actuar como un inhibidor de la función de la enzima SOD, evitando la transformación de ERO a peróxido de hidrógeno, lo que se podría traducir en un aumento en el estrés oxidativo, induciendo la expresión de genes PR.

Las plantas inoculadas con *M. guilliermondii* CECT13190 presentan mayores cantidades de ácido salicílico que las plantas a las que no se inocula la cepa de la invención. El ácido salicílico participa en varios procesos que promueven el crecimiento de las plantas, incrementando la productividad de los cultivos, y también en la resistencia a patógenos en plantas.

Por otro lado, las plantas cuentan con una serie de mecanismos inducibles para defenderse de los patógenos, mecanismos basados en el reconocimiento del patógeno, la transducción de señales y la consecuente activación de las defensas de la planta. Entre los mecanismos que se activan en estas situaciones, se encuentra la implicación de las proteínas PR y se diferencian dos tipos de respuesta muy activa: la resistencia sistémica adquirida (RSA) y la resistencia sistémica inducida (RSI). La cepa de la invención, al ser inoculada en una planta, induce tanto la expresión de los genes RSA como la expresión de genes RSI.

La invención también se refiere a cepas mutantes y/o derivadas de la cepa *M. guilliermondii* CECT13190 que mantienen sus propiedades, es decir:

- producción de AIA, incluso en ausencia de L-triptófano;
- fijación de nitrógeno atmosférico y transformación en  $\text{NH}_4^+$ ;
- solubilización de fósforo;
- producción de 3-metil-1-butanol;
- producción de hexametil ciclotriloxano;
- producción de fenil etil alcohol;
- producción de sideróforos;
- reducción de la producción de SOD, lo que implica reducción de la transformación de ERO e inducción de los genes PR;
- aumento de la producción de ácido oxálico en las plantas a las que se administra;
- aumento de la cantidad de ácido salicílico en las plantas a las que se administra;

- inducción de la expresión de los genes RSA y RSI en las plantas a las que se administra.

5 Un segundo aspecto de la invención es una composición que incluye la cepa *M. guilliermondii* CECT13190, cepas mutantes y/o derivadas de la misma que mantienen las mismas propiedades, como bioestimulantes, promotoras del desarrollo y crecimiento de las plantas, y/o como bioplaguicidas, estimulando las defensas de la planta

10 Otro aspecto de la invención se refiere a una composición que incluye la cepa *M. guilliermondii* CECT13190, cepas mutantes y/o derivadas de la misma que mantienen las mismas propiedades, cuya presentación puede ser sólida, líquida o en gel.

15 La invención también se refiere a un método para promover el crecimiento y activar las defensas de las plantas que incluye la adición de *M. guilliermondii* CECT13190, cepas mutantes y/o derivadas de la misma que mantienen las mismas propiedades, o de las composiciones que la contienen, a las plantas que se desea tratar. Esta adición puede realizarse mediante cualquiera de los tratamientos utilizados habitualmente, por ejemplo, incluyendo la cepa o la composición en el agua de riego, mediante tratamientos en raíz en vivero o mediante pulverizaciones.

20

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

25 Para complementar la descripción que se está realizando y con objeto de ayudar a una mejor comprensión de las características de la invención, se acompaña como parte integrante de dicha descripción, un juego de dibujos en donde, con carácter ilustrativo y no limitativo, se ha representado lo siguiente:

**Figura 1.** Detalle de las plántulas de pepino a una semana postsiembra

30 **Figura 2.** Representación del área foliar, en cm<sup>2</sup>, de plantas de pepino control (columna azul) y plantas de pepino tratadas con *M. guilliermondii* CECT13190 (columna verde).

**Figura 3.** Diseño experimental para comprobación de la aplicabilidad de *M. guilliermondii* CECT13190 como tratamiento preventivo y/o curativo frente a *Fusarium oxysporum f sp. Cucumerinum*.

35

**Figura 4.** Síntomas de fusariosis de pepino en plantas de 14 días postemergencia con distintos tratamientos.

## REALIZACIÓN PREFERENTE DE LA INVENCIÓN

5

La presente invención se ilustra mediante los siguientes ejemplos que no pretenden ser limitativos de su alcance.

### **Ejemplo 1. Aislamiento de una cepa de *M. guilliermondii* CECT13190.**

10

Se realizó el aislamiento a partir de lascas de madera de vid, procedentes de muestras tomadas en una finca particular de La Rioja, en septiembre de 2016. Para ello se realizó una asepsia superficial mediante lavado con hipoclorito de sodio 1.5% durante 1 minuto y dos lavados posteriores con agua destilada estéril de un minuto cada uno. Las lascas de la madera, de aproximadamente 0.5x0.5 cm<sup>2</sup>, se obtuvieron en cabina de flujo laminar con bisturí. Se sembraron las lascas en medio PDA (*Potato dextrose agar*) en placa Petri  
15 de 9 cm de diámetro y se mantuvieron a 22±2 °C, en oscuridad. Después de 48 horas se realizó la siembra a medio PDA fresco en las mismas condiciones y este proceso se repitió hasta lograr el cultivo axénico de *M. guilliermondii* CECT13190.

20

### **Ejemplo 2. Identificación genética de la cepa de *M. guilliermondii* CECT13190**

Se procedió a la identificación genética de la cepa de *M. guilliermondii* CECT13190 como sigue:

#### 2.1. Extracción del ADN

25

La extracción de ADN se realizó mediante el protocolo que se describe a continuación. Se cultivó la levadura en medio PDB (*Potato Dextrose Broth*) durante 72 horas a 33±2°C. Posteriormente, se centrifugó a 10000 rpm y se decantó el sobrenadante. Al precipitado se le añadieron 300 µL de tampón de extracción (200 mM Tris HCl pH 8.5. 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0.5% SDS) y 150 µL de acetato de sodio 3 M a pH 5.2 y se incubó  
30 a -20°C durante 10 minutos. Transcurrido este tiempo, se centrifugó durante 5 minutos a 10000 rpm y el sobrenadante se transfirió a otro tubo donde se añadió el mismo volumen de isopropanol. Se incubó 5 minutos a temperatura ambiente, tras este tiempo se centrifugó a 10000 rpm durante 5 minutos. El precipitado se lavó con etanol al 70%. Una vez seco se resuspendió en 50 µL de TE (Tris-EDTA). El ADN se conservó a -20°C  
35 hasta su utilización. Se cuantificó la cantidad de ADN mediante espectrofotometría



utilizando la absorbancia a 260 nm (50 µg/ml de ADN tiene una OD a 260=1) y la pureza calculando la relación A260/A280 (1.7-1.9 corresponde al ADN puro) mediante la utilización de un NanoDrop One (Thermo).

5 2.2. Amplificación del ADN mediante PCR del fragmento de la región ITS (*Internal Transcribed Spacer region*)

La amplificación mediante PCR se realizó en un termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf), en un volumen final de 25 µl con la siguiente mezcla: tampón Taq polimerasa 1x, MgCl<sub>2</sub> 1.2mM, dNTPs 0.2mM, cebador ITS1 50 ng; cebador ITS4 50 ng; 10 Taq DNA polimerasa (Ecogen) 1 U y ADN 20 ng, utilizando ADN extraído como se explica en el ejemplo 2.1.

Los cebadores utilizados, ITS1 e ITS4 (White, T. J., et al. 1990. *Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics*. En: *PCR Protocols: A guide to Methods and Applications*. Innis, M. A., D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White (eds). Academic Press, San Diego, USA. pp: 315-322) caracterizados por SEQ 15 ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2, respectivamente, son cebadores universales, que se localizan en las regiones flanqueantes 18s y 28s, y que se utilizan para la identificación de especies fúngicas mediante la amplificación de un fragmento en la región ITS y 5.8s 20 rDNA (400-650 pb). Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 5 minutos 95°C, 40 ciclos: 30 segundos 95°C, 30 segundos 55°C y 1 minuto 72°C para finalizar con una extensión de 10 minutos a 72°C.

2.3. Secuenciación del fragmento ITS

25 Posteriormente, los productos de PCR se secuenciaron, utilizando los cebadores ITS1 e ITS4, caracterizados por SEQ ID NO: 1 Y 2, en la Unidad de Genómica de la UCM. Las secuencias obtenidas se utilizaron para la identificación en la base GenBank mediante el algoritmo BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*). La secuencia del 30 fragmento ITS, caracterizada por SEQ ID NO: 3, presentó una homología del 99.35% con 100 cepas de *M. guilliermondii*.

**Ejemplo 3. Caracterización de la cepa de *M. guilliermondii* CECT13190**

3.1. Curva de crecimiento.

35 Para realizar la curva de crecimiento, el nuevo aislado se cultivó en tubos de ensayo

con 5 mL de medio PDB durante 24 horas a  $28\pm 2^{\circ}\text{C}$  en agitación (250 rpm). Tras 24 horas, el cultivo fue transferido a un matraz con 100 mL de medio PDB y se incubó a  $28\pm 2^{\circ}\text{C}$  durante 52 horas a 250 rpm. Se recogieron muestras a intervalos de 4 horas. El crecimiento se calculó mediante el análisis de la turbidez del medio, midiendo la absorbancia a 600 nm en un espectrofotómetro (Genesys 10S UV-Vis; Thermo). El máximo de crecimiento fue de  $9 \times 10^7$  unidades formadoras de colonia/ml a las 48 horas.

### 3.2. Producción de ácido indol-3-acético (AIA).

Para analizar la producción de ácido indol-3-acético (AIA), la levadura se inoculó en matraces con 100 mL de *Trypticasein Soy Broth medium* (TSB) suplementado con L-triptófano a diferentes concentraciones (1, 100, 200, 300, 400 y 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). El cultivo se mantuvo en un agitador orbital a 150 rpm y  $30\pm 2^{\circ}\text{C}$ . Se tomaron muestras a las 24, 48, 72 y 96 horas. Las muestras se centrifugaron a 10000 rpm y a 1 mL de sobrenadante se le añadieron 4 mL de reactivo de Salkowsky (250 mL de agua destilada, 150 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  y 7.5 mL de  $\text{FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.5 M) y se agitó. La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 20 minutos y en oscuridad. Pasado este tiempo se midió la absorbancia a 535 nm. La cuantificación de AIA se realizó con una curva standard de concentraciones conocidas de AIA (0-400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

La mayor producción de AIA se obtuvo cuando la cantidad del aminoácido en el medio fue de 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , con producciones de 9,8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de AIA. Se observó la producción del ácido indol acético en ausencia de L-triptófano (7,2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), lo que muestra que esta levadura es capaz de producir la hormona por una vía distinta y, por tanto, sin el uso del aminoácido como precursor. Las concentraciones son suficientes como para que se observe un incremento en el crecimiento de la planta.

### 3.3. Fijación de nitrógeno.

La capacidad para fijar nitrógeno de la levadura se evaluó mediante el siguiente protocolo. *M. guilliermondii* se cultivó en PDB durante 48 horas,  $30\pm 2^{\circ}\text{C}$  y 140 rpm en un agitador orbital. Después, se centrifugaron 10 mL a 10000 rpm durante 5 minutos. El *pellet* se resuspendió en una solución de NaCl al 0.8%. Se inoculó una alícuota de 10  $\mu\text{L}$  en viales con medio NFb (ácido málico 5g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.5g,  $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.2g, NaCl 0.1g,  $\text{CaCl}_2\cdot \text{H}_2\text{O}$  0.02 g,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  1g,  $\text{MnSO}_4\cdot \text{H}_2\text{O}$  1.175g, KOH 4g, Agar 3.2-3.9 g, 4 ml de solución azul de bromotimol (5g/l en 0.2 N KOH),  $\text{H}_2\text{O}$  destilada 1000 ml, pH entre 6.8-7) y se incubó a  $33\pm 2^{\circ}\text{C}$ .

Después de su incubación se observó la presencia de un velo (el medio de cultivo se tornó translúcido) con un tamaño de 0.2 cm de profundidad en el tubo de cultivo de diámetro 3 cm. La capacidad de *M. guilliermondii* CECT13190 de fijar nitrógeno atmosférico y, por tanto, de transformarlo en  $\text{NH}_4^+$ , permite que este nutriente quede disponible para la planta.

#### 3.4. Solubilización de fosfatos del medio

Se evaluó también la capacidad de la levadura para solubilizar fosfatos: se cultivó a  $33\pm 2^\circ\text{C}$  en oscuridad durante 96 horas sobre medio Pikovskaya (900 ml de la solución A: 13 g dextrosa, 2.5 g fosfato cálcico, 0.5 g sulfato de amonio, 0.2 g 10 cloruro potásico, 0.1 g sulfato de magnesio, 1 ml trazas de sulfato de manganeso (100 mg/L), 1 ml trazas de sulfato de hierro (100 mg/L), 0.022 g verde de bromocresol, 15 g agar) y 100 ml de la solución B: 2.4 g fosfato tricálcico).

15

El índice de solubilización (IS) de fosfatos se calculó según la siguiente fórmula:  
$$\text{IS} = ((\text{diámetro de la colonia} + \text{diámetro del halo}) / \text{diámetro de la colonia}).$$

Se obtuvo un IS de  $1.84\pm 0.03$  que se encuentra en el promedio de valores de otras levaduras con capacidad para solubilizar fosfatos.

20

#### 3.5. Análisis de compuestos orgánicos volátiles.

Mediante GC-MS (cromatografía de gases - espectrometría de masas), se realizó un análisis de los compuestos orgánicos volátiles mayoritarios producidos por de *M. guilliermondii* CECT13190. Los análisis se realizaron en el centro de apoyo a la investigación de cromatografía de la Universidad Complutense de Madrid.

25

Entre los compuestos orgánicos volátiles producidos por la levadura y detectados mediante esta técnica, destacan:

30

- 3-metil 1-butanol, que presenta actividad como promotor de crecimiento vegetal ( $31\pm 2\%$  del total de compuestos volátiles producidos por la levadura);

- hexametil ciclotrioxano, con actividad frente a patógenos ( $0.01\pm 0.01\%$  del total de compuestos volátiles producidos por la levadura);

35

- fenil etil alcohol, que ralentiza el crecimiento fúngico ( $8.51\pm 2.35\%$  del total de compuestos volátiles producidos por la levadura);

- iso geraniol, conocido como antifúngico (0.03±0.02% del total de compuestos volátiles producidos por la levadura).

### 3.6. Producción de sideróforos.

5 La determinación de la producción de sideróforos se midió cualitativamente en medio CAS (*chromne azurol S*) agar. La composición del reactivo CAS fue: 1 mM CAS, 10 mM FeCl<sub>3</sub>-6H<sub>2</sub>O (1 mM stock) diluido en una solución de HCl 10 mM y 2 mM de N, N – cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB) Las levaduras se inocularon en el medio y se incubaron a 33 ±2°C durante 96 horas. El medio cambió de color de azul a amarillo,  
10 naranja o rosado, lo que se interpreta como positivo en la formación de sideróforos.

### **Ejemplo 4. Efectos de la cepa de *M. guilliermondii* CECT13190 sobre el crecimiento de las plantas**

15 Se estudió el efecto de *M. guilliermondii* CECT13190 sobre el tamaño de las plantas. Para ello, se obtuvieron plantas de pepino a partir de semillas comerciales y se cultivaron en semilleros con sustrato fibra de coco (CE 95 mS/m, pH 6,2) en condiciones controladas (Fotoperíodo 16/8, 22±1°C). A los 20 días postsiembra, se repartieron al azar en dos grupos de 24 plantas, cada uno situado en un miniinvernadero independiente. Se procedió entonces a inocular las plantas. Un invernadero se inoculó con *M. guilliermondii* CECT13190 y el otro invernadero se mantuvo como control (el experimento se repitió tres veces). En la figura 1, se muestra un detalle de plántulas de pepino a una semana postsiembra. En la esquina superior derecha está la planta control, las otras tres plantas corresponden al tratamiento con *M. guilliermondii* CECT13190.  
20

25

En la figura 2 se puede observar el área foliar media de plantas de pepino en tratamiento control (C) e inoculadas con *M. guilliermondii* CECT13190. Las medidas se realizaron a partir de fotografías de las hojas mediante una técnica de contraste con el programa ImageJ. Aquellas plantas tratadas con *M. guilliermondii* CECT13190 resultaron tener  
30 unos valores de área foliar/hoja (14±1 cm<sup>2</sup>) significativamente mayores que el control (10±0.5 cm<sup>2</sup>). Del mismo modo, el número de hojas total también alcanzó valores máximos en estas plantas.

35 Se determinó el estado de desarrollo de las plantas conforme a la versión extendida de la escala BBCH. Se comprobó un avance en la fenología de las plantas tratadas con *M.*

*guilliermondii* CECT13190 frente a las control en el número de hojas verdaderas (estado de crecimiento 1, desarrollo foliar, código 1. en la escala BBCH, número de hojas verdaderas) y en adelanto de la floración (estado de crecimiento 6, floración, código 61, en la escala BBCH) con una hoja más y un 17% de adelanto de la floración.

5

**Ejemplo 5. *M. guilliermondii* CECT13190 como elicitador de las defensas en las plantas**

10 Se analizó la capacidad de *M. guilliermondii* CECT13190 como elicitador de las defensas en plantas de pepino y vid.

15 En pepino: se obtuvieron plantas de pepino a partir de semillas comerciales y se cultivaron en semilleros con sustrato fibra de coco (CE 95 mS/m, pH 6,2) en condiciones controladas (fotoperíodo 16/8, 22±1°C). A los 20 días postsiembra, se repartieron al azar en tres grupos de 24 plantas, cada uno situado en un invernadero independiente. Se procedió entonces a inocular las plantas como se describe a continuación.

20 En vid: se emplearon botes de cristal (17x25,5x7cm) y vermiculita, autoclavados a 121°C durante 20 minutos. Se sometieron las varetas de vid (injertos certificados de tempranillo, clon RJ51/110R-E35) a asepsia (etanol 70% durante 5 minutos y lejía 4% durante 10 minutos, tras ello, se realizaron tres lavados con agua destilada estéril durante 5 minutos). Las varetas se regaron, en semanas alternas, con agua filtrada y medio Hoagland nº 2 en dilución 1:10. Se repartieron al azar las plantas en tres grupos de 24 plantas. Cuando las varetas ya se encontraban totalmente brotadas en Estado 13 según la Guía BBCH escala para la vid (Lorenz, DH; KW Eichhorn; H. Bleiholder; R. Klose; U. Meier; E. Weber (1994). "Phänologische Entwicklungsstadien der Weinrebe (*Vitis vinifera* L. ssp. *Vinifera*)". *Vitic. Enol. Sci.* 49: 66-70), se procedió a inocular las plantas como se describe a continuación.

30 En la figura 3, se muestra un esquema de los experimentos diseñados para comprobar esta característica de la cepa.

Grupo 1. Control (C): plantas regadas con agua de grifo filtrada.

35 Grupo 2. *Fusarium* (P): inoculación con *Fusarium oxysporum* f sp. *cucumerinum* (en

pepino) y *Fusarium equiseti* (en vid). Se regaron las plantas con mezcla de esporas y micelio.

Grupo 3. *M. guilliermondii* CECT13190 (CECT13190): inoculación con *M. guilliermondii*  
5 CECT13190: levadura al 10% (4ml de medio PDB con la levadura crecida durante 48h en agitación a 120rpm junto con 36mL de agua filtrada).

Tras la inoculación, todas las plantas se regaron con agua filtrada durante 20 días. Posteriormente, se procedió a realizar una segunda inoculación. Para ello, los grupos  
10 previos se subdividieron y trataron según se indica:

Grupo 1a. Control (C): plantas regadas con agua de grifo filtrada.

Grupo 1b. Control + *Fusarium* (C + P): plantas regadas con agua de grifo filtrada y, tras  
20 días, inoculadas con *Fusarium*.

15

Grupo 2a. *Fusarium* (P): plantas previamente inoculadas con *Fusarium sp.*, se siguieron regando con agua de grifo filtrada.

Grupo 2b: *Fusarium* + *M. guilliermondii* CECT13190 (P + CECT13190): plantas  
inoculadas inicialmente con *Fusarium sp.* y, tras 20 días, inoculadas con *M.*  
20 *guilliermondii* CECT13190 al 10% (como se ha descrito más arriba).

Grupo 3a. *M. guilliermondii* CECT13190 (CECT13190): inoculación con *M. guilliermondii*  
CECT13190 al 10%.

Grupo 3b. *M. guilliermondii* CECT13190 + *Fusarium* (CECT13190 + P): plantas  
25 inoculadas inicialmente con *M. guilliermondii* CECT13190 y, tras 20 días, inoculadas con  
*Fusarium*.

En la figura 4, se muestra un ejemplo de resultados obtenidos en plantas de pepino. Se  
representan los síntomas de fusariosis de pepino (*F. oxysporum f sp. cucumerinum*) en  
30 plantas de 14 días postemergencia de los tratamientos: C (control), M (regadas con *M.*  
*guilliermondii* cepa CECT13190), F (regadas con *F. oxysporum f sp. cucumerinum*), CF  
(plantas control una semana y después inoculadas con *F. oxysporum f sp.*  
*cucumerinum*), MF (tratamiento preventivo: una semana con *M. guilliermondii* cepa  
CECT13190 y después inoculadas con *F. oxysporum f sp. cucumerinum*) y FM  
35 (tratamiento curativo: una semana con *F. oxysporum f sp. cucumerinum* y después

regadas con *M. guilliermondii* cepa CECT13190); en verde están representadas las plantas sanas, en amarillo las plantas vivas con síntomas, y en rojo las plantas muertas.

**Ejemplo 6. *Meyerozyma guilliermondii* CECT13190 como activador de las defensas de las plantas de vid, tanto por vía RSA (Resistencia Sistémica Adquirida), como por RSI (Resistencia Sistémica Inducida).**

#### 6.1 Producción de superóxido dismutasa (SOD)

Se tomaron 250mg de tejido vegetal (por triplicado) de cada uno de los ensayos de inoculación descritos en las figuras 3 y 4, previamente tratado con nitrógeno líquido. El tejido se introdujo en tubos Eppendorf de 2 ml con 1,5mL de fosfato potásico 0.05M. Las muestras se centrifugaron a 10000rpm durante 15 minutos. Se recogió el sobrenadante, 200µL, y se añadieron 3mL de la mezcla de reacción (2.35 ml de Na-P tampón 50 mM, 0.2 ml de EDTA Na<sub>2</sub> 0.66 mM, 0.3 ml de L-Metionina 10 mM, 0.1 ml NBT 33 µM y 0.05 ml de riboflavina 0.0033 mM). Como blanco se utilizaron 200µL de tampón de extracción + 3mL mezcla de reacción y se mantuvo en oscuridad durante 10 minutos. La muestra control contenía 200µL de tampón de extracción + 3mL mezcla de reacción y se incubó durante 10 minutos expuesta a luz intensa. Tras la incubación se midió la absorbancia a la longitud de onda 560 nm.

La mayor cantidad de SOD se produjo en las plantas que habían recibido tratamiento Control. La menor cantidad, en el tratamiento con el patógeno *Fusarium sp.* (un 10% menos que en el control) y se detectaron valores intermedios en las plantas con inoculaciones cruzadas *Fusarium sp.* + *Meyerozyma guilliermondii* CECT13190 y para las plantas inoculadas solo con *Meyerozyma guilliermondii* CECT13190 (un 5% menos que en el control). Se reduce así la transformación de ERO a peróxido de hidrógeno, lo que se traduciría en un aumento en el estrés oxidativo, induciendo la transformación del oligómero de NPR1 a su forma monomérica y, por tanto, activando la expresión de PR 3 y 5 (β-1,3-glucanasa; osmotina y taumatina, respectivamente).

#### 6.2 Niveles de Ácido Oxálico

Los niveles de ácido oxálico en las varetas de vid se midieron con el *Oxalic Acid Colorimetric Assay Kit* MAK179-1KT (Sigma Aldrich). Se detectó una mayor cantidad (un incremento de un 60%) de ácido oxálico en las varetas inoculadas con *Meyerozyma guilliermondii* CECT13190. El ácido oxálico puede actuar como un inhibidor de la función

de la enzima SOD, evitando la transformación de ERO a peróxido de hidrógeno. De este modo, se estaría produciendo un aumento en el estrés oxidativo, induciendo la transformación del oligómero de NPR1 a su forma monomérica y, por tanto, activando la expresión de PR 3 y 5 ( $\beta$ -1,3-glucanasa; osmotina y taumatina, respectivamente).

5

### 6.3 Niveles de Ácido Salicílico

Los niveles de ácido salicílico *in situ* en las hojas, se midieron en las hojas apicales de cada vareta, que fueron sumergidas en una solución de nanopartículas de TiO<sub>2</sub> durante 24 horas en agitación a 120rpm. El porcentaje de área foliar cubierto por manchas marrones se midió mediante el programa ImageJ. Las plantas inoculadas con *Meyerozyma guilliermondii* CECT13190 mostraron un incremento de 2.5 veces la cantidad de ácido salicílico frente a las plantas control. La expresión de los genes PRs está regulada por la presencia de ácido salicílico, aumentando de manera consecuente la resistencia a patógenos fúngicos. La presencia de ácido salicílico aumenta la actividad del estrés oxidativo y la cantidad de compuestos antioxidantes en el citoplasma, provocando la conversión del oligómero NPR1 a monómero. Este monómero es capaz de entrar en el núcleo de las células, donde es fosforilado. El hecho de que se encuentre fosforilado y en presencia de ácido salicílico, permite su interacción con SUMO-3, un tipo de ubiquitina que incrementa la asociación entre NPR1 y el factor de transcripción TGA y con la polimerasa, mientras que la reduce con el factor de transcripción WRKY (que, en ausencia de ácido salicílico, actúa como represor transcripcional). Con ello, se lleva a cabo la transcripción de genes SAR.

### 6.4 Expresión de diferentes genes que codifican PRs y enzimas clave de la síntesis de etileno mediante PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR).

#### 6.4.1 Extracción, purificación y cuantificación de RNA Total

El material vegetal se congeló con nitrógeno líquido y se pulverizó. Se maceraron 0,3 gramos de cada muestra en Eppendorf de 2mL, con 1 mL de tampón de extracción [2% (p/v) CTAB, 2% (p/v) PVP-40, Tris-HCl 300 mM pH 8,0, NaCl 1,4 M, EDTA 25 mM pH 8,0, 0.005% (p/v) espermidina, 2% (v/v)  $\beta$ -mercaptoetanol], precalentado a 65°C. La mezcla se incubó a 65°C durante 10 minutos con agitación cada 2 min. Se centrifugaron durante 5 min a 12.000 x g, y al sobrenadante se le añadió un volumen igual de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1 v/v) a 4°C. A continuación, se agitaron en vórtex durante 1 minuto y se centrifugaron 10 min a 12.000 x g. Se recogió la fase acuosa



superior en nuevos tubos y se procedió a la precipitación selectiva del RNA, añadiendo un isovolumen de LiCl 4M e incubando toda la noche a 4°C. Posteriormente se centrifugó a 12000 x g durante 15 min a 4°C. El precipitado se lavó 3 veces con etanol frío 70% (v/v), tras el secado se resuspendió en 50 µL de agua libre de RNAsas. La pureza y concentración del RNA se cuantificó mediante espectrofotómetro Nanodrop ND-100 (NanoDrop® Technologies).

El tratamiento con DNasa I recombinante, permitió eliminar el DNA genómico, siguiendo las indicaciones del fabricante (Invitrogen™): un volumen de 50 µl de mezcla de reacción con agua libre de RNasa, 10 µg RNA, 5 µl tampón de incubación y 1 µl DNasa recombinante (libre de RNasa) 2 U/µl se incubó a 37°C durante 30 minutos; se añadieron 5µl de *DNase inactivation reagenty* y se incubó a temperatura ambiente 2 minutos; se centrifugó a 10.000 x g, cuantificándose el RNA en un espectrofotómetro Nanodrop ND-100 (NanoDrop®Technologies).

#### 6.4.2 Síntesis de DNA complementario (cDNA).

Se realizó la síntesis del cDNA mediante el kit NZY *FirstStrand cDNA Synthesis kit* de NZYtech, siguiendo las instrucciones del fabricante. La mezcla de la reacción se preparó en un volumen final de 20 µl en agua libre de RNasa, 10µl NZYRT 2x Master Mix, 2 µl NZYRT Enzyme Mix y 1 µg RNA libre de DNA, se incubó a 25°C durante 10 min y la retrotranscripción se llevó a cabo a 50°C durante 20 min. Se inactivó la transcriptasa a 85°C durante 5 minutos. Se añadió 1 µl de NZY RNasa H (*Escherichia coli*) y se incubaron las muestras a 37°C durante 20 min. Se añadieron 30 µL de agua libre de RNAasas MilliQ autoclavada. La concentración stock de cDNA se preparó de manera que fuese de 0.20 µg/µL.

#### 6.4.3 Estudio de expresión génica (PCR cuantitativa a tiempo real)

Se llevó a cabo el estudio de la expresión relativa de los genes que codifican: el *non-expresser of PR genes 1 (NPR1)* (utilizando oligonucleótidos publicados en Le Henanff, G., et al. (2009). "Characterization of Vitis vinifera NPR1 homologs involved in the regulation of pathogenesis-related gene expression." BMC Plant Biology, 9(1), 54); la taumatina (*VviTLS1*), la osmotina (*VviOsmo*), la quitinasa de clase I (*Vcchitb*), la β-1,3-glucanasa de clase I (*Vcgns1*), la 1-amino-ciclopropano-carboxilato (ACC) sintasa (*VviACS1*) y ACC oxidasa (*VviACO1*) (utilizando oligonucleótidos diseñados por el grupo de POSTBIOTEC del ICTAN-CSIC), caracterizados por SEQ ID NO: 4-19 (Tabla

- 1). La expresión se cuantificó mediante NZY qPCR *Green Master Mix* (NZYtech) utilizando las especificaciones del fabricante. Las reacciones se llevaron a cabo en placas multipocillo en un termociclador iCycler iQ (Bio-Rad) y los resultados fueron procesados mediante iQ5 2.0 (*Standard Edition Optical System Software V2.0*, Bio-Rad).

**Tabla 1.** Oligonucleótidos utilizados en el estudio del Ejemplo 6.4.3.

| gen            | secuencia             | cebador               | SEQ ID NO: |
|----------------|-----------------------|-----------------------|------------|
| Vcchitb-F      | GGTGTTGAATGTGGGAAAGG  | <i>Forward primer</i> | 4          |
| Vcchitb-R      | CAGTCCAGGTTGTTGCCATA  | <i>Reverse primer</i> | 5          |
| Vcgns1-F       | GGATTTGGGACTACGGTTGA  | <i>Forward primer</i> | 6          |
| Vcgns1-R       | CGGCTCCTTCTTGTCTCAT   | <i>Reverse primer</i> | 7          |
| VviTLS1-F      | ACCTCGACTACATCGACATCT | <i>Forward primer</i> | 8          |
| VviTLS1-R      | CCAGGTCCATCAGTGCAACA  | <i>Reverse primer</i> | 9          |
| VviOsmo-F      | TAATCCTACTCCAATGGGT   | <i>Forward primer</i> | 10         |
| VviOsmo-R      | CATGCACCGTTTTCAAGACCG | <i>Reverse primer</i> | 11         |
| VvNPR1.1 F     | GGAATTCGATGTTGGGTACG  | <i>Forward primer</i> | 12         |
| VvNPR1.1 R     | GCAACCTTGTCAGAATGTCC  | <i>Reverse primer</i> | 13         |
| VviACS1-F      | GTTCCCGTGGGTTTGCTTTA  | <i>Forward primer</i> | 14         |
| VviACS1-R      | GTTGCATCATCCTCCATGTG  | <i>Reverse primer</i> | 15         |
| VviACO1-F      | GCATCATTCTACAACCCAGG  | <i>Forward primer</i> | 16         |
| VviACO1-R      | GGAACCTCAAACCGGCATAA  | <i>Reverse primer</i> | 17         |
| UBC EE253706 F | CATAAGGGCTATCAGGAGGAC | <i>Forward primer</i> | 18         |
| UBC EE253706 R | TGGCGGTCCGAGTTAGG     | <i>Reverse primer</i> | 19         |

- Las reacciones de amplificación se realizaron en un volumen final de 20 µl conteniendo 10 µl de NZY qPCR *Green Master Mix*, 2 µl de cada oligonucleótido y 4 µl del cDNA. El protocolo de amplificación fue: 5°C 2 min, 95°C 10 min, seguido de 40 ciclos a 95°C 20 s, 55-60°C, por último, se mantuvo la reacción a 4°C. Al final de la PCR se elaboró una curva de disociación en un gradiente de temperatura de 65 a 95°C, con lecturas del plato cada 0,2°C, para evaluar la presencia de dímeros de oligonucleótidos. Se llevaron a cabo tres réplicas biológicas con sus dos repeticiones técnicas para cada muestra y cada uno de los genes. El gen de la ubiquitina (número de referencia NCBI: EE253706) de *V. vinifera* se utilizó como gen de referencia interna para normalizar los valores de

amplificación (utilizando los oligonucleótidos caracterizados por SEQ ID NO: 18-19). La expresión relativa del gen se calculó siguiendo el método de Livak y Schmittgen (Livak, K. J. y Schmittgen, T. D. 2001. *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method*. *Methods* 25: 402-408), en el que se compararon directamente los Ct (ciclo umbral) de cada gen testado y el gen de referencia ( $\Delta Ct = Ct$  del gen de interés -  $Ct$  del gen de referencia) en cada muestra, y posteriormente se compararon los  $\Delta Ct$  de las muestras problema con respecto a la muestra referencia ( $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$  de cada muestra -  $\Delta Ct$  de la muestra calibrador o muestras de varetas control), a través de la siguiente fórmula:  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

10

Las plantas inoculadas con *M. guilliermondii* CECT13190 mostraron una mayor expresión de NPR1, lo que conduce a una mayor expresión de las proteínas relacionadas con la patogénesis (PR).

15

En las plantas de vid tratadas con *M. guilliermondii* CECT13190 se expresaron tres tipos de familias de proteínas relacionadas con la patogénesis: taumatina (PR-5),  $\beta$ -1,3-glucanasa (PR-2), quitinasa tipo I (PR-3) y osmotina (PR-5). La taumatina y la osmotina han sido identificadas como PRs cuya función es aumentar la permeabilidad de la membrana fúngica, lo que acaba produciendo su ruptura.

20

Se produce la transcripción de genes RSA (Resistencia Sistémica Adquirida), los cuales transcriben para las familias de PR 1, 2 ( $\beta$ -1,3-glucanasa) y 5 (taumatina y osmotina).

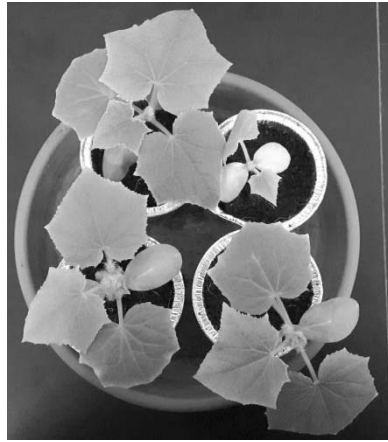
25

*Meyerozyma guilliermondii* CECT13190 inoculada en planta provocó una elevada expresión de los genes de la biosíntesis de etileno (ACS1 y ACO1). La presencia de etileno induce la activación de la familia PR-5 (taumatina y osmotina) y PR-3 (quitinasa de tipo I). Por tanto, la familia PR-5 no solo está regulada por la presencia de ácido salicílico, también lo está por la producción interna de etileno, es decir, la RSI (Respuesta Sistémica Inducida).

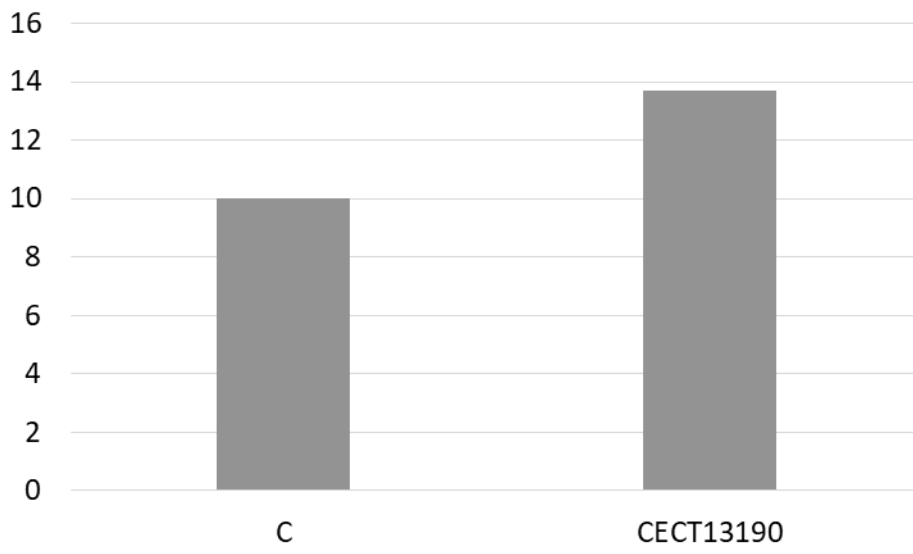
30

## REIVINDICACIONES

1. Cepa de *Meyerozyma guilliermondii* depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo con el número de depósito CECT13190 que comprende la secuencia caracterizada por SEQ ID NO: 3.
- 5
2. Cepas mutantes y/o derivadas de la cepa de *Meyerozyma guilliermondii* depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo con el número de depósito CECT13190 y que mantienen las mismas propiedades que dicha cepa.
- 10
3. Composición que comprende la cepa de *Meyerozyma guilliermondii* definida en la reivindicación 1 y/o las cepas mutantes y/o derivadas definidas en la reivindicación 2, para su uso como bioestimulante y/o bioplaguicida en plantas.
- 15
4. Composición según la reivindicación 3 cuya presentación puede ser líquida, sólida o en gel.
5. Método para promover el crecimiento y activar las defensas de las plantas que incluye la adición de la cepa *M. guilliermondii* CECT13190 definida en la reivindicación 1, y/o de mutantes y/o derivadas definidas en la reivindicación 2, o de las composiciones definidas en las reivindicaciones 3-4, a dichas plantas.
- 20
6. Método según la reivindicación 5 en el que la adición se realiza mediante incorporación de la cepa *M. guilliermondii* CECT13190 definida en la reivindicación 1, y/o de mutantes y/o derivadas definidas en la reivindicación 2, o de las composiciones definidas en las reivindicaciones 2-3 al agua de riego.
- 25



**Fig. 1**



**Fig.2**

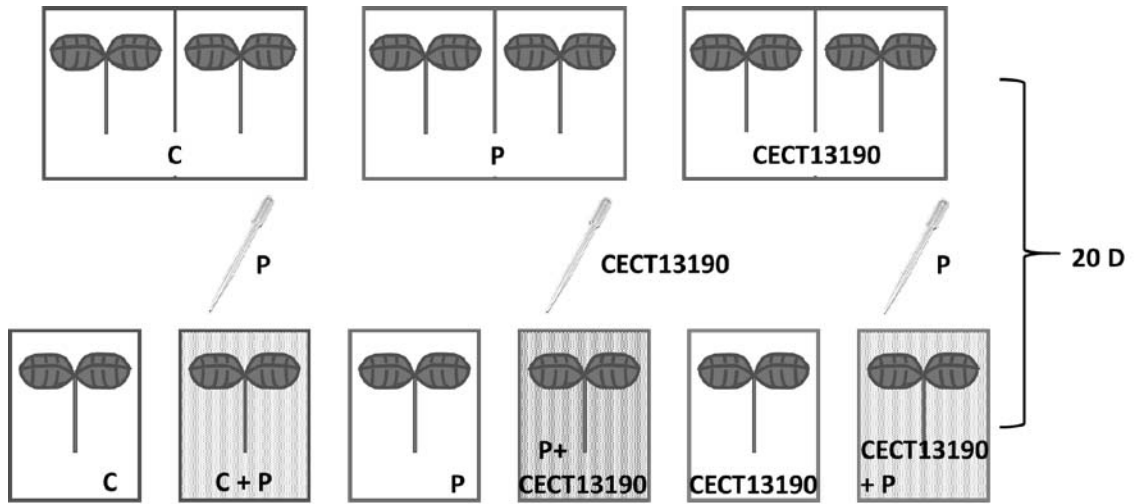


Fig. 3

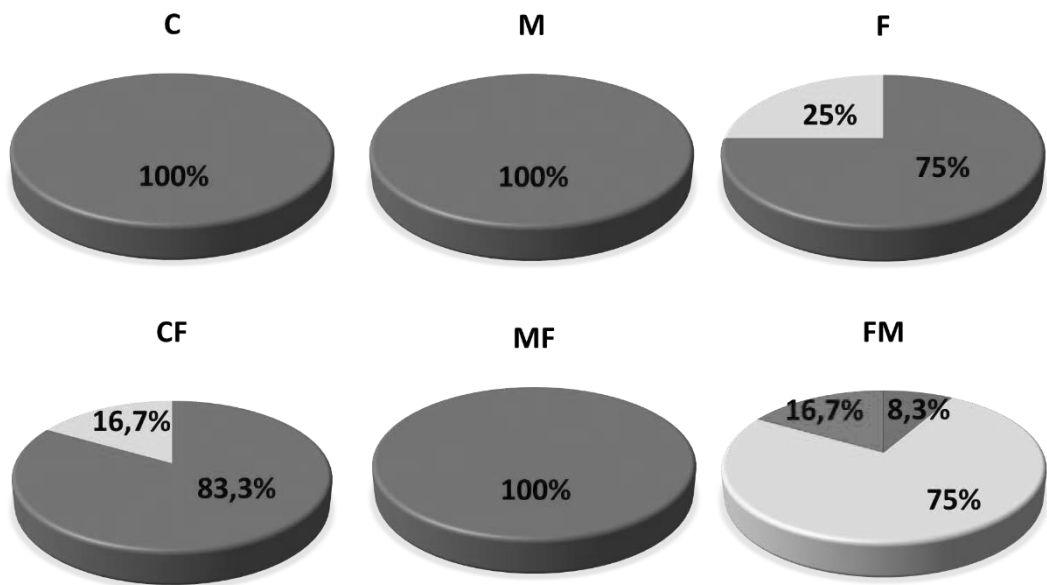


Fig. 4