

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 907 599**

21 Número de solicitud: 202031055

51 Int. Cl.:

| | |
|-------------------|-----------|
| C12N 1/14 | (2006.01) |
| A01N 63/30 | (2010.01) |
| C05F 11/08 | (2006.01) |
| A01H 15/00 | (2006.01) |
| A01N 65/00 | (2009.01) |

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN

B2

22 Fecha de presentación:

19.10.2020

43 Fecha de publicación de la solicitud:

25.04.2022

Fecha de concesión:

06.09.2022

45 Fecha de publicación de la concesión:

13.09.2022

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD DE ALMERÍA (100.0%)
Ctra. Sacramento, s/n
04120 La Cañada de San Urbano (Almería) ES**

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

Observaciones:

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

54 Título: **CEPA DE *RUTSTROEMIA CALOPUS*, COMPOSICIONES Y USOS**

57 Resumen:

Cepa *Rutstroemia calopus* y sus usos.

La presente invención describe una cepa de la especie *Rutstroemia calopus* capaz de promover e incrementar el crecimiento y desarrollo vegetal en cultivos, incluso en condiciones de estrés hídrico o salino, así como sus usos. También se describe una composición biofertilizante que comprende dicha cepa y un método para incrementar el crecimiento vegetal.

ES 2 907 599 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 *Rutstroemia calopus*, composiciones y usos

5 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. La presente invención se refiere a una cepa de la especie *Rutstroemia calopus* capaz de promover e incrementar el crecimiento y desarrollo vegetal en cultivos, incluso en condiciones de estrés hídrico o salino.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Uno de los mayores desafíos en la agricultura radica en la reducción de riesgos e impactos negativos de los productos fitosanitarios y fertilizantes sobre la salud humana y el medioambiente, al tiempo que se mantiene o mejora la productividad y la rentabilidad de la actividad agrícola. Esto sólo está siendo posible mediante el uso de nuevas tecnologías englobadas en sistemas de producción integrada, que reduzcan los residuos y minimicen su impacto medioambiental, evitando el uso de plaguicidas y fertilizantes químicos.

20 Existen numerosos microorganismos beneficiosos, y su uso en los sistemas agrícolas puede mejorar la nutrición, la resistencia a estreses abióticos y bióticos, y proporcionar una transición efectiva desde sistemas de producción basados en el uso de productos químicos a otros más sostenibles.

25 El mecanismo de la fitoestimulación por microorganismos mejora los sistemas de raíces y brotes, ya que libera en la rizosfera auxinas, pequeños péptidos, volátiles y otros metabolitos activos, que promueven la ramificación de las raíces y la absorción de nutrientes, aumentando así el crecimiento y el rendimiento de las plantas.

30 Existen numerosos microorganismos que se asocian con plantas y que cumplen funciones importantes para el crecimiento y la salud de las plantas. Dichos microorganismos intervienen en la adquisición de nutrientes y/o estimulación hormonal, así como algunos suprimen los patógenos de las plantas.

35 En la supresión de los patógenos de las plantas intervienen diversos mecanismos, que

a menudo están relacionados indirectamente con el crecimiento de las plantas. En el documento *Jumpponen A., et al, 1998. New Phytologist 140(2):295-310* se describen hongos pigmentados de color café o negro asociados a las raíces de las plantas, *Mycelium radicus astrovirens* (MRA), los cuales coexistían con hongos micorrízicos, por lo que fueron denominados como hongos “pseudomicorrízicos”. Actualmente estos hongos reciben el nombre de endófitos septados oscuros (DSE, Dark Septate Endophytes) (*Rodríguez et al., 2009*).

Mientras que los miembros de los géneros bacterianos *Azospirillum* y *Rhizobium* promueven el crecimiento de las plantas, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Stenotrophomonas* y *Streptomyces* y los géneros de hongos *Ampelomyces*, *Coniothyrium* y *Trichoderma* son organismos modelo para demostrar su influencia en la salud de las plantas (*Berg, G. 2009. Appl Microbiol Biotechnol 84, 11–18*).

Debido a estas interacciones beneficiosas entre las plantas y microorganismos, y dependiendo de su modo de acción y efectos, estos productos pueden usarse como biofertilizantes, fortalecedores de plantas, fitoestimuladores y bioplaguicidas, que se aplican a diferentes cultivos con el objetivo de mejorar el crecimiento, el desarrollo y la adaptación al estrés abiótico. Son seguros para los seres humanos, el ganado, los cultivos y el medio ambiente y son capaces de colonizar las raíces de las plantas sin reacciones adversas aparentes. Tanto las formulaciones sólidas como líquidas pueden ser utilizadas para producir cantidades adecuadas de inóculos activos y viables desde que se produce el formulado hasta que se utiliza en campo.

El mercado de productos agrícolas a partir de microorganismos está experimentando una tasa de crecimiento anual de aproximadamente el 10%. El uso de microorganismos y la explotación de interacciones beneficiosas entre plantas y microbios ofrecen estrategias prometedoras y respetuosas con el medio ambiente para la agricultura convencional y orgánica en todo el mundo.

Por ello se hace necesario encontrar mecanismos y agentes microbiológicos eficientes para la agricultura y alternativos al control químico que: promuevan el crecimiento vegetal, que eleven la productividad del campo, que controlen enfermedades y plagas agrícolas, que disminuyan el riesgo ambiental y sanitario sin arriesgar la salud humana.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Los inventores han identificado un microorganismo de la especie *Rutstroemia calopus* capaz de promover el crecimiento vegetal en cultivos de una manera eficiente, siendo la primera vez que se describe en el estado de la técnica un microorganismo de dicha especie como agente bioestimulante o promotor del crecimiento vegetal en plantas, contribuyendo a la disminución del uso de compuestos fitosanitarios químicos, disminuyendo el riesgo ambiental y sanitario. Además, los inventores han observado que dicho microorganismo es capaz de promover el crecimiento vegetal en condiciones de estrés hídrico y salino.

Los inventores han aislado la cepa *Rutstroemia calopus* CG11560 (número de depósito CECT 21150), de raíces de plantas silvestres de la costa de Almería (España). Posteriormente, llevaron a cabo ensayos en condiciones de semillero y de campo con melón o pepino, sin desinfección o esterilización de los sustratos o suelos de cultivo, así como en condiciones de estrés salino. Los resultados revelaron que se incrementó el crecimiento vegetal (peso seco de partes aéreas y radicular y/o altura de plántulas) tras la aplicación de la cepa *Rutstroemia calopus* CG11560, con y sin estrés salino (Figuras 2 a 8).

Por tanto, en un primer aspecto, la invención se refiere a una cepa de la especie *Rutstroemia calopus* depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con número de acceso CECT 21150, de aquí en adelante la “cepa de la invención”. Esta cepa es capaz de estimular, incrementar y promover el crecimiento vegetal.

La cepa *Rutstroemia calopus* CG11560 fue aislada a partir de raíces de plantas silvestres de la costa de Almería (España). La cepa fue depositada el 17 de Julio de 2019 bajo el Tratado de Budapest en la Colección Española de Cultivos Tipo como Autoridad Internacional de Depósito (con sede en el Edificio 3 CUE, Parc Científic Universitat de Valencia, C/ Catedrático Agustín Escardino, 9, 46980 Paterna (Valencia) ESPAÑA). El número de depósito asignado fue el CECT 21150. El depositante de la cepa fue la Universidad de Almería.

La cepa *Rutstroemia calopus* CG11560 con número de depósito CECT 21150, es un hongo que pertenece a la familia de *Rutstroemiaceae* y al género *Rutstroemia*. Se trata

de una especie poco caracterizada típica de zonas duneras asociadas a otras plantas como endófito. Los inventores han observado que esta nueva cepa es capaz de promover o estimular el crecimiento vegetal, incluso en condiciones de estrés salino.

5 El término “estimulación del crecimiento vegetal”, “incremento del crecimiento vegetal” utilizados indistintamente a lo largo de la presente invención, se refiere a la capacidad de estimular, promover, facilitar, incrementar o ayudar en el desarrollo o crecimiento vegetal, es decir, aumentar el crecimiento o desarrollo del sistema radicular de las plantas, la elongación de los tallos, la floración y/o el desarrollo de frutos y semillas.

10

En la presente invención, también están contemplados aquellos microorganismos que derivan de la cepa de la invención y que conservan la capacidad de incrementar o promover el crecimiento de las plantas. Ejemplos de cepas o microorganismos derivados de la cepa de invención pueden ser mutantes que presentan variaciones en su genoma respecto al genoma de la cepa de la invención pero que no afectan a la capacidad de la cepa de incrementar o promover el crecimiento de las plantas. Así, cepas mutantes derivadas de la cepa de la invención que conservan la capacidad de incrementar o promover el crecimiento de las plantas también están contempladas dentro de la presente invención. Por lo tanto, en otro aspecto, la presente invención también se refiere a una cepa derivada de la cepa de la invención con capacidad para incrementar o promover el crecimiento de las plantas. En el presente documento, los términos "mutante" o “derivado”, utilizados indistintamente, se refiere a cualquier microorganismo resultante de una mutación o modificación en el ADN de un organismo que da como resultado un carácter (fenotipo) que no se encuentra en la cepa silvestre ("wild type" en inglés o "wt") y que mantiene las características de la cepa silvestre referidas a la capacidad de bioestimular el crecimiento vegetal.

15

20

25

30

La cepa derivada de la cepa de la invención puede producirse de forma natural, o bien de forma intencionada por métodos de mutagénesis conocidos en el estado de la técnica como, por ejemplo, sin limitarse a, el crecimiento de la cepa de la invención en presencia de agentes mutagénicos o causantes de estrés, o mediante ingeniería genética dirigida a la modificación de genes específicos. Así, dentro de la presente invención también se contemplan mutantes genéticamente modificados derivados de la cepa de la invención que conservan su capacidad de incrementar o mejorar el crecimiento de las plantas.

35

En otra realización preferida, la cepa de la invención puede estar en forma de células viables. El término "células viables" usado en la presente invención, se refiere a células vivas o viables que cuando, son suplementadas o incubadas en un medio adecuado, son capaz de dividirse y de reproducirse.

5

Las células viables de la cepa de la invención pueden estar en forma de micelio o de microesclerocios. Así en una realización particular, las células viables de la cepa de la invención se encuentran en forma de microesclerocios.

10

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un cultivo biológicamente puro de la cepa de la invención, de aquí en adelante el "cultivo biológicamente puro de la invención". En el presente documento se entiende por "cultivo biológicamente puro" a aquel cultivo en el que el microorganismo o la cepa de la invención se encuentra en una proporción igual o superior al 99% respecto al resto de posibles microorganismos presentes en el cultivo, y que puede contener metabolitos derivados de la cepa de la invención.

15

20

Como entiende un experto en la materia, la cepa de la invención o cultivo biológicamente puro de la invención pueden estar comprendidos dentro de una composición biofertilizante o bioestimulante del desarrollo y del crecimiento vegetal. Así, otro aspecto de la presente invención se refiere a una composición que comprende la cepa de la invención o el cultivo biológicamente puro de la invención, de aquí en adelante la "composición de la invención".

25

30

En otra realización particular de la presente invención, la composición de la invención comprende la cepa de la invención en forma de microesclerocios, preferiblemente la cepa de la invención se encuentra en forma de disolución y más preferiblemente a una concentración de entre $1 \cdot 10^3$ y $1 \cdot 10^5$ microesclerocios por mL de disolución. Considerando en la presente invención que es equivalente una Unidad Formadora de Colonia (UFC) con un microesclerocio, en otra realización particular la composición de la invención comprende una concentración de la cepa de la invención de entre $1 \cdot 10^3$ y $1 \cdot 10^5$ UFC/mL de disolución. Como entiende el experto en la materia, la cepa de la invención puede estar comprendida en cualquier disolución del estado de la técnica viable en cultivo celular. Ejemplos de disoluciones de la cepa de la invención, incluyen sin limitar a, agua y sales como KCl o NaCl.

Como entiende un experto en la materia, además la composición de la invención puede comprender al menos un coformulante que facilite y ayude al crecimiento vegetal junto a la cepa de la invención. En el presente documento el término “coformulante” se refiere a una segunda composición, disolución, mezcla, elemento o producto que no es la cepa
5 de la invención ni el cultivo biológicamente puro de la invención y que es ampliamente utilizado en agricultura o jardinería para facilitar, promover y ayudar el crecimiento de las plantas, mejorar la calidad o fertilidad del suelo de cultivo agrícola, así como mejorar sus características físico-químicas, para mejorar la calidad de la composición de la invención y sus usos como biofertilizante o para mejorar la calidad de las cosechas.

10

Por tanto, en otra realización particular de la invención, la composición de la invención además comprende al menos un coformulante.

15

Es práctica de rutina para un experto en la materia conocer los tipos de coformulantes agrícolas en el estado de la técnica. Ejemplos de coformulantes agrícolas incluyen, sin limitar a, adyuvantes, agente estimulación crecimiento o agente control biológico. Así en otra realización particular de la composición de la presente invención, el coformulante se selecciona de la lista que consiste en: adyuvante, agente estimulación crecimiento, agente control biológico y cualquier combinación de los mismos.

20

En el presente documento el término “adyuvante” se refiere a una sustancia, compuesto o producto que se incorpora a la composición de la invención para mejorar el comportamiento de los biofertilizantes o agroquímicos a través del incremento del área de contacto, la retención y la absorción, corregir problemas en el agua de aplicación, compatibilizar y estabilizar mezcla de productos. Ejemplos de adyuvantes incluyen, sin
25 limitar a, emulsionante o surfactante, tensoactivos, agentes dispersantes, correctores de pH, minerales, sales, ácidos, estabilizadores y esencias.

30

En otra realización particular de la presente invención, el adyuvante de la composición de la invención se selecciona de la lista que consiste en: emulsionante o surfactante, tensoactivos, agentes dispersantes, correctores de pH, minerales, sales, ácidos, estabilizadores, esencias, y cualquier combinación de los mismos.

35

En el presente documento el término “agente estimulación crecimiento” se refiere a una sustancia, compuesto o producto que facilita, mejora y promueve el crecimiento y

desarrollo vegetal junto a la cepa de la invención. Ejemplos de agentes estimulantes del crecimiento vegetal incluyen, sin limitar a, abonos de nitrógeno, fósforo y/o potasio y sus combinaciones dobles o triples, polisorbatos asociados a ácidos grasos, polisorbatos, asparagina, manito, ácidos orgánicos, fitohormonas (por ejemplo, auxinas, giberelinas o citocininas) quelantes de macroelementos o microelementos y algas o sus extractos.

En el presente documento el término “agente de control biológico” se refiere a un agente, medio natural, ser vivo o microorganismo, de origen natural, que controlan, eliminan, reducen, estabilizan las plagas o enfermedades causadas por patógenos en las plantas, cosechas o cultivos agrícolas. Ejemplos de agentes de control biológico incluyen, sin limitar a; fitohormonas, compuestos orgánicos como alcoholes o acetonas, aceites esenciales o ferohormonas secretados por plantas, cultivos trampa, cultivos competidores, organismos depredadores (por ejemplo coccinélidos, moscas sírfidas, ácaros, insectos o nematodos), organismos parásitos y organismos patogénicos o plaguicidas biológicos (por ejemplo bacterias como *Bacillus thuringiensis* o *Paenibacillus popilliae*, hongos entomopátogenos o virus como los *Baculovirus*).

Como entiende un experto en la materia, esta composición además puede comprender al menos una segunda cepa distinta de *Rutstroemia calopus* depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con número de acceso CECT 21150.

Como entiende un experto en la materia para la utilización o aplicación de la composición de la invención como biofertilizante en las plantas y cultivos, dicha composición puede estar tanto en estado sólido, líquido o gaseoso. En una realización particular de la presente invención, la composición de la invención está en estado sólido, líquido, gelificada o coloidal.

Como entiende el experto en la materia, para promover el crecimiento y desarrollo vegetal hay que facilitar la interacción en las plantas o cultivos agrícolas con la cepa de la invención o con el cultivo biológicamente puro de la invención, o alternativamente, facilitar el anclaje de las planta o semillas. Para ello resulta ventajoso la fijación de la composición de la invención en soportes agrícolas apropiados.

Así, en otra realización preferida la composición de la invención además comprende un soporte agrícola o soporte agrícolamente aceptable.

En el presente documento los términos “soporte agrícola” o “soporte agrícolamente aceptable” utilizados indistintamente, se refiere a un elemento, compuesto, mezcla, producto o disolución, natural o sintético, mineral u orgánico, que en forma pura o en
5 mezcla, permite el anclaje del sistema radicular de la planta, desempeñando, por tanto, un papel de soporte y sujeción para la planta o semillas, así como también facilitar la interacción en las plantas o cultivos agrícolas con la composición de la invención.

Es practica de rutina para un experto en la materia conocer los tipos de soportes
10 agrícolamente aceptables en el estado de la técnica tanto en cultivo en suelo como en cultivo hidropónico. Ejemplos de soportes agrícolas para cultivo en suelo incluyen, sin limitar a, sustratos orgánicos o inorgánicos. Ejemplos de soportes agrícolas para cultivo hidropónico incluyen, sin limitar a, agua o solución salina. Los soportes agrícolas, tanto
15 para cultivo en suelo como para cultivo hidropónico, pueden estar en forma de polvo, gránulo, polvos humectables, medios acuosos o no acuosos, suspensiones o dispersiones. Asimismo, el soporte agrícola puede ser una matriz de biopolímeros. Ejemplos de matriz de biopolímeros incluyen, sin limitar a, alginato de calcio y agar.

Así, en otra realización particular de la invención, el soporte agrícola de la composición
20 de la invención se selecciona de la lista que consiste en: sustrato orgánico, sustrato inorgánico, agua, solución salina o cualquier combinación de los mismos.

Como entiende un experto en la materia cualquier sustrato orgánico o inorgánico
25 agrícolamente aceptable es válido para ser utilizado en la presente invención. Ejemplos de sustratos orgánicos agrícolamente aceptables incluyen, sin limitar a, arcilla, residuo vegetal, polvo de corcho, celulosa, turba, fibra de coco o compost. Así en otra realización particular del soporte agrícola de la composición de la invención, el sustrato orgánico agrícolamente aceptable se selecciona de la lista que consiste en: arcilla, perlita, vermiculita, residuo vegetal, polvo de corcho, celulosa, turba (turba de Sphagnum), fibra
30 de coco, compost y cualquier combinación de los mismos.

En otra realización particular, el soporte agrícola es un compost que se obtiene de los
35 materiales vegetales que se seleccionan de la lista que consiste en: orujo de vid, champiñón, residuos hortícolas, residuos sólidos urbanos, residuos de jardinería, vermicompost y combinaciones de los mismos.

Como sabe un experto en la materia, la composición de la invención además puede comprender una semilla. Así, otra realización particular se refiere a la composición de la invención que además comprende una semilla.

5

En el presente documento, el término “semilla” se refiere a una semilla, simiente, pipa o pepita y progenie de las mismas; encargadas de originar una planta de cualquier especie, particularmente plantas con interés agronómico, forestal, alimenticio (para alimentación humana o animal), ornamental o energético.

10

La presente invención describe el uso de *Rutstroemia calopus* CG11560 (número de depósito CECT 21150), la cepa de la invención, como fertilizante o como agente promotor del crecimiento vegetal en plantas, capaz de promover el crecimiento vegetal en cultivos de una manera eficiente, incluso en condiciones de estrés hídrico y salino.

15

Por ello, otro aspecto de la presente invención es el uso de la cepa *Rutstroemia calopus* depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con número de acceso CECT 21150 (la cepa de la invención), así como del cultivo biológicamente puro de la invención como de la composición de la invención, como fertilizante o para incrementar el crecimiento o desarrollo de una planta, de aquí en adelante “el uso de la invención”.

20

Los términos “biofertilizante”, “fertilizante” o “bioestimulante”, utilizados indistintamente en la presente invención, se refiere a un producto agrícolamente aceptable que comprende microorganismos vivos, en concreto la cepa *Rutstroemia calopus* de la presente invención, que cuando se aplica a plantas, cosechas, cultivos o semillas promueve, facilita, mejora, aumenta, incrementa el desarrollo o crecimiento vegetal, es decir, promueve el crecimiento o desarrollo del sistema radicular de las plantas, la elongación de los tallos, la floración y/o el desarrollo de frutos y semillas, ayudando a la mejora del rendimiento y la calidad de cosechas agrícolas, y además protege frente a patógenos.

25

30

La cepa de la invención, *Rutstroemia calopus* CG11560 con número de depósito CECT 21150, el cultivo biológicamente puro de la invención y la composición de la invención, así como el término “incrementar el crecimiento vegetal” ya se han descrito en párrafos anteriores del presente documento y aplican de igual modo a este aspecto inventivo, así

35

como todas sus realizaciones particulares.

5 En el presente documento el término “fertilizante”, se refiere a un compuesto, elemento, composición, mezcla, producto o disolución, que comprenden microorganismos como bacterias y/o hongos, que proporcionan a las plantas los nutrientes necesarios para su desarrollo, al mismo tiempo que mejoran la calidad del suelo, ayudando a conseguir un entorno microbiológico optimizado y natural y a mejorar la producción agrícola sin perjudicar el medio ambiente.

10 Como entiende el experto en la materia, cualquier especie de planta puede ser usada para estimular su crecimiento, en particular, su crecimiento en etapas tempranas. Ejemplos de plantas incluyen, sin limitar a, plantas de interés agronómico o de cultivo (por ejemplo, plantas de interés en alimentación humana o animal o plantas de interés forestal) y plantas de interés ornamental.

15 En una realización preferida, la planta del uso de la invención es una planta de cultivo o una planta ornamental.

20 Ejemplos de plantas de interés agronómico incluyen, sin limitar a, avena, cebada, maíz, trigo, olivo, vid, almendro, soja, abeto, roble, pino, centeno, remolacha, patata, zanahoria, ajo, arroz, cebolla, tomates, girasol, pimiento, melón, fresa, judías, naranja, manzana, melocotón, limón y pera. Ejemplos de plantas de interés ornamental incluyen, sin limitar a, césped, sorgo, rosal, geranio, gladiolo, paniculata, clavel, jacinto, petunia, cactus y crasas.

25 Tal como se ha descrito anteriormente, además dicho incremento del crecimiento vegetal se da también en condiciones de estrés hídrico o salino cuando se aplica la cepa de la invención. Por ello, una realización particular del uso de la invención se refiere al uso de la cepa de la invención, del cultivo biológicamente puro o de la composición de la invención, en donde el crecimiento o desarrollo de la planta se da en condiciones de estrés hídrico o salino.

30 Tal como se describe en la presente invención, la aplicación de la cepa *Rutstroemia calopus* CG11560 (número de depósito CECT 21150) en diferentes cultivos, promueve e incrementa el crecimiento y desarrollo vegetal de dichos cultivos, incluso cuando los

cultivos se encuentran en condiciones de estrés hídrico y salino, describiendo así un procedimiento de bioestimulación del crecimiento vegetal.

Por tanto, otro aspecto de la presente invención es un método para incrementar o promover el crecimiento de las plantas o cultivos, de aquí en adelante el “método de la invención”, que consiste en:

- (i) poner en contacto una planta o la semilla de una planta con un fertilizante que se selecciona de la lista que consiste en la cepa de la invención, el cultivo biológicamente puro de la invención y la composición de la invención; y
- (ii) desarrollar la semilla o la planta de la etapa (i).

La cepa de la invención, *Rutstroemia calopus* CG11560 con número de depósito CECT 21150, el cultivo biológicamente puro de la invención y la composición de la invención, ya se han descrito en párrafos anteriores del presente documento y aplican de igual modo a este aspecto inventivo, así como todas sus realizaciones particulares. Así mismo, el término “incrementar el crecimiento de una planta” ha sido descrito anteriormente en el presente documento y se aplica de igual modo a este aspecto inventivo.

Alternativamente, la etapa (i) del método de la invención se refiere a sembrar una semilla comprendida en la composición de la invención (descrita anteriormente en una realización particular de la presente invención), y posteriormente desarrollar dicha semilla.

Como entiende el experto en la materia, la aplicación de la cepa de la invención, el cultivo biológicamente puro de la invención o de la composición de la invención en las plantas o semillas se puede llevar a cabo de forma líquida o sólida en cultivos en suelo o de forma líquida en cultivos hidropónicos. Así, en una realización particular del método de la invención la cepa de la invención, el cultivo biológicamente puro de la invención o de la composición biofertilizante de la invención, se aplican de forma líquida o sólida en cultivo en suelo o de forma hidropónica.

La aplicación del fertilizante en el método de la invención, es decir, de la cepa, el cultivo biológicamente puro o la composición de la invención, puede llevarse a cabo de manera que se pueda recubrir total o parcialmente la semilla, planta o partes de una planta. Este

recubrimiento se puede llevar a cabo por procesos convencionales que incluyen, sin limitar a, sumergir o pulverizar la semilla, de la planta o sus partes con el fertilizante.

5 También como entiende el experto en la materia, la aplicación de la cepa de la invención, el cultivo biológicamente puro de la invención o de la composición de la invención, se puede llevar a cabo de forma radicular (raíces) mediante métodos convencionales conocidos en el estado de la técnica como riego al sustrato.

10 Como entiende el experto en la materia, cualquier especie de planta puede ser usada para estimular su crecimiento, en particular, su crecimiento en etapas tempranas. Ejemplos de plantas de interés agronómico o cultivo y de interés ornamental han sido descritas anteriormente y aplican de igual modo a este aspecto de la invención.

15 A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

20

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Crecimiento micelial *in vitro* de *Rutstroemia calopus* CG11560 a diferentes concentraciones salinas (0, 1, 2, 5, 10, 15, 20 g·L⁻¹) y temperatura (25°C y 35°C).

25

Figura 2. Efecto de la aplicación de *Rutstroemia calopus* CG11560 en diferentes parámetros morfológicos de plántulas de melón. A) Peso Seco Aéreo de Plántulas de Melón (g) y B) Peso Seco Raíz de Plántulas de Melón (g). El asterisco indica diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos.

30

Figura 3. Crecimiento vegetal de plántulas de melón sometidas a estrés salino (0,5 g/L, 1 g/L, 1,5 g/L y 2 g/L de sal) tras la aplicación de *Rutstroemia calopus* CG11560. El asterisco indica diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos.

35

Figura 4. Crecimiento vegetal de plántulas de pimiento tras la aplicación de *Rutstroemia calopus* CG11560. El asterisco indica diferencia estadísticamente significativa entre los

tratamientos.

Figura 5. Crecimiento vegetal de plántulas de pepino tras la aplicación de *Rutstroemia calopus* CG11560 en condiciones de estrés salino (I). Las letras a, y b, indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos.

5 **Figura 6.** Crecimiento vegetal de plántulas de pepino tras la aplicación de *Rutstroemia calopus* CG11560 en condiciones de estrés salino (II). Las letras a, y b, indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos.

10 **Figura 7.** Crecimiento vegetal de plántulas de pepino tras la aplicación de *Rutstroemia calopus* CG11560 en condiciones de reducción de fertilización al 50%. Las letras a, y b, indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos.

15 **Figura 8.** Crecimiento vegetal de plántulas de pepino tras la aplicación de *Rutstroemia calopus* CG11560 en condiciones de reducción de fertilización al 80%. Las letras a, y b, indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos.

EJEMPLOS

20 A continuación, se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto la efectividad del producto de la invención.

Materiales y Métodos

25 Los inventores aislaron la cepa de género *Rutstroemia*, *Rutstroemia calopus* CG11560, de raíces de plantas silvestres de la costa de Almería (España).

Se realizó una siembra de raíces desinfectadas en placa de Petri con medio PDA y se realizó una posterior identificación de las colonias formadas. La cepa pura resultante se denominó CG11560, se identificó mediante PCR (*Polymerase Chain Reaction* en inglés) y se secuenció posteriormente la región ITS (*Internal Transcriber Spacer* en inglés) del ADN ribosómico (ADNr), perteneciendo a la especie *Rutstroemia calopus*. Se ha identificado mediante la secuenciación de la región ITS (Internal Transcriber Spacer) del ADNr utilizando los cebadores ITS-1 (SEQ ID NO: 1) e ITS-4, (SEQ ID NO: 2). La secuencia obtenida con el cebador ITS1, que es un fragmento de ADN del gen ribosomal de CG11560 es una secuencia no codificante, identificada como SEQ ID NO 1.

La cepa se creció en medio de cultivo agarizado PDA (*Potato Dextrose Agar*) a temperatura ambiente y se procedió a evaluar la cantidad de conidias producidas por Placa de Petri a diferentes concentraciones salinas (0, 1, 2, 5, 10, 15, 20 g·L⁻¹)

5

Para determinar el efecto promotor de *Rutstroemia calopus* CG11560, semillas de melón de la variedad Piñonet piel de sapo fueron desinfectadas y pregerminadas; se plantaron en macetas de 300 mL en turba comercial. Se colocó una semilla por maceta. Simultáneamente a la siembra, se aplicó 5 mL de agua (T0) o 5 mL de suspensión de microesclerocios (40-50 unidades formadoras de Colonia (UFC) o microesclerocios/ mL de agua) por maceta. El ensayo se llevó a cabo en condiciones de invernadero, es decir, en condiciones de temperatura y humedad no constantes ni controladas (condiciones pasivas en las que la temperatura varía de 20-35°C y la humedad de 70% a 90%). Cada tratamiento estaba constituido por 25 repeticiones. Las plantas fueron fertilizadas diariamente con un fertilizante comercial (1 g/L de Nitrofoska 13(N) + 9(P₂O₅) + 16(K₂O) [+4 (MgO) + 17(SO₃)).

10

15

Para determinar el efecto promotor de *Rutstroemia calopus* CG11560 en condiciones salinas, semillas de melón de la variedad Piñonet piel de sapo fueron desinfectadas y pregerminadas se plantaron en macetas de 300 mL en turba comercial. Se colocó una semilla por maceta. Simultáneamente a la siembra, se aplicó 5 mL de agua (T0) o 5 mL de suspensión de microesclerocios (40-50 unidades formadoras de Colonia (UFC) o microesclerocios/ mL de agua) por maceta. El ensayo se llevó a cabo en condiciones de invernadero. Cada tratamiento estaba constituido por 25 repeticiones. Las plantas fueron fertilizadas diariamente con un fertilizante comercial (1 g/L de Nitrofoska 13(N) + 9(P₂O₅) + 16(K₂O) [+4 (MgO) + 17(SO₃)). Cuando la primera hoja verdadera estaba expandida se comenzó el riego de las plantas con las diferentes concentraciones salinas, (0, 0,5, 1, 1,5 and 2 g·L⁻¹) correspondientes a una conductividad eléctrica de 4,00, 4,31, 5,30, 6,39 y 7,16 dS/m. Después de 45 días las plantas fueron analizadas.

20

25

30

Para determinar el efecto de *Rutstroemia calopus* CG11560 en el desarrollo de plántulas de pimiento en condiciones de semillero, se aplicó *Rutstroemia calopus* CG11560 a la dosis de 40 microesclerocios/mL de agua. La aplicación se realizó mediante riego (R) al sustrato. Se añadió 1 mL de la suspensión por planta en una única aplicación. La duración del ensayo fue de 40 días, y posteriormente, se procedió a la toma de datos

35

de algunos parámetros morfológicos antes de la siembra en suelo.

Para determinar el efecto de *Rutstroemia calopus* CG11560 en el desarrollo de plántulas de pepino en condiciones salinas, se sembraron las plántulas en macetas de un volumen
5 de 1 L y el sustrato empleado fue turba. Se aplicó 4 discos de 0,5 cm de diámetro conteniendo micelio de *Rutstroemia calopus* CG11560 en el sustrato. Se realizaron riegos con una solución salina de 2 g/L correspondiente a una conductividad eléctrica de aproximadamente 7 dS/m. La duración del ensayo fue de 60 días, y posteriormente, se procedió a la toma de datos de algunos parámetros morfológicos.

10 Para determinar el efecto de *Rutstroemia calopus* CG11560 en el desarrollo de plántulas de pepino en condiciones de reducción de fertilización al 50%, se sembraron las plántulas en macetas de un volumen de 1 L y el sustrato empleado fue turba. Se aplicó
15 4 discos de 0,5 cm de diámetro conteniendo micelio de *Rutstroemia calopus* CG11560 en el sustrato. Se realizaron riegos con una solución que contenía un 50% de reducción de fertilización con respecto a la fertilización estándar (1g/L de fertilizante comercial NPK 15-15-15). La duración del ensayo fue de 60 días, y posteriormente, se procedió a la toma de datos de los parámetros morfológicos.

20 Para determinar el efecto de *Rutstroemia calopus* CG11560 en el desarrollo de plántulas de pepino en condiciones de reducción de fertilización al 80%, se sembraron las plántulas en macetas de un volumen de 1 L y el sustrato empleado fue turba. Se aplicó
25 4 discos de 0,5 cm de diámetro conteniendo micelio de *Rutstroemia calopus* CG11560 en el sustrato. Se realizaron riegos con una solución que contenía un 80% de reducción de fertilización con respecto a la fertilización estándar (1g/L de fertilizante). La duración del ensayo fue de 60 días, y posteriormente, se procedió a la toma de datos de los parámetros morfológicos.

Resultados

30 En la Figura 1 se observan los resultados de crecimiento micelial de *Rutstroemia calopus* CG11560 a diferentes concentraciones salinas y temperatura. La valoración de las esporas no pudo realizarse porque carece de esporulación en este medio agarizado. Solo produce micelio y microesclerocios en altas cantidades. Se produce inhibición del
35 crecimiento micelial en las diferentes concentraciones salinas ensayadas a 25° C,

suponiendo una reducción del 50% a $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. Se observa una reducción drástica del crecimiento a 35°C . Por tanto, el crecimiento se ve afectado tanto por la concentración de sales como por la temperatura.

5 En la Figura 2, se muestran los resultados obtenidos tras la aplicación de *Rutstroemia calopus* CG11560 en el desarrollo de plántulas de melón. Los resultados revelan que se produce un incremento de los parámetros morfológicos evaluados tras la aplicación de *Rutstroemia calopus* CG11560. Se observa un incremento de un 27,08% y 64,69% en el peso seco de la parte aérea y radical, respectivamente.

10

En la Figura 3, se muestran los resultados obtenidos tras la aplicación de *Rutstroemia calopus* CG11560 en el desarrollo de plántulas de melón sometidas a estrés salino. La incorporación de *Rutstroemia calopus* CG11560 en el sustrato sometido a altas conductividades eléctricas, amortigua el efecto del estrés salino, no produciéndose
15 disminución ni del peso seco de la parte aérea ni radical, salvo a concentración de 0,5 g/l que se produce una disminución del peso seco de raíz, aunque sin diferencias significativas. Se observa un incremento de un 90,13, 58,37, 54,73 y 47,13% en el peso seco de la parte aérea a 0,5, 1, 1,5 and $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente. En el caso de la raíz se produce variaciones en el porcentaje de peso seco del -16,21, 20, 19,11 y 26,15%, a
20 0,5, 1, 1,5 and $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente.

En la Figura 4, se muestran los resultados obtenidos tras la aplicación de *Rutstroemia calopus* CG11560 en el desarrollo de plántulas de pimiento en condiciones de semillero. Los resultados revelan que se produce un incremento del 7%, en la altura de las
25 plántulas de pimiento, 8,2% en el diámetro, 5,5% en el número de hojas y 15,45% tras la aplicación de *Rutstroemia calopus* CG11560.

En la Figura 5 y 6, se muestran los resultados obtenidos tras la aplicación de *Rutstroemia calopus* CG11560 en el desarrollo de plántulas de pepino en condiciones
30 salinas. Los resultados revelan que se produce un incremento del 56% en el área foliar y un 44,4% en el peso seco de la raíz comparado con el control en condiciones salinas tras la aplicación de *Rutstroemia calopus* CG11560 (Figura 5). Asimismo, se produce un incremento del 13,5% del área foliar y del 85,1% en el peso seco de la raíz cuando se compara con el testigo a 0 g/L de sal. Igualmente, se produce un incremento del
35 20,45% en la longitud del tallo y un 68,18% en el peso seco total comparado con el

control en condiciones salinas tras la aplicación de *Rutstroemia calopus* CG11560 (Figura 6). Asimismo, se produce un incremento del 8% en la longitud del tallo y un 51,63% en el peso seco total cuando se compara con el testigo a 0 g/L de sal.

5 En la Figura 7, se muestran los resultados obtenidos tras la aplicación de *Rutstroemia calopus* CG11560 en el desarrollo de plántulas de pepino en condiciones de reducción de fertilización al 50%. Los resultados revelan que se produce un incremento del 28,44% en el peso total de la planta, tras la aplicación de *Rutstroemia calopus* CG11560 cuando se reduce la fertilización. Asimismo, se produce un incremento del 66,66% del peso seco
10 de la raíz cuando se compara con la fertilización estándar.

En la Figura 8, se muestran los resultados obtenidos tras la aplicación de *Rutstroemia calopus* CG11560 en el desarrollo de plántulas de pepino en condiciones de reducción de fertilización al 80%. Los resultados revelan que se produce un incremento del 33,8%
15 en el área foliar de la planta, tras la aplicación de *Rutstroemia calopus* CG11560 cuando se reduce la fertilización. Asimismo, se produce un incremento del 30,43% del peso seco total cuando se compara con la fertilización estándar.

REIVINDICACIONES

1. Una cepa de la especie *Rutstroemia calopus* depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con número de acceso CECT 21150.
5
2. Cepa según la reivindicación 1, en donde la cepa está en la forma de células viables.
3. Cepa según la reivindicación 2, donde las células viables se encuentran en forma de microesclerocios.
10
4. Un cultivo biológicamente puro de la cepa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
5. Una composición que comprende la cepa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o el cultivo biológicamente puro según la reivindicación 4.
15
6. La composición según la reivindicación 5 donde la cepa está en forma de microesclerocios a una concentración de entre $1 \cdot 10^3$ y $1 \cdot 10^5$ UFC por mL de disolución.
20
7. La composición según cualquiera de las reivindicaciones 5 o 6 que además comprende al menos un coformulante.
8. La composición según la reivindicación 7 en donde el coformulante se selecciona de la lista que consiste en: adyuvante, agente estimulación crecimiento, agente control biológico y cualquier combinación de los mismos.
25
9. La composición según la reivindicación 8 en donde el adyuvante se selecciona de la lista que consiste en: emulsionante o surfactante, tensoactivos, agentes dispersantes, correctores de pH, minerales, sales, ácidos, estabilizadores, esencias, y cualquier combinación de los mismos.
30
10. La composición según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 9, donde la composición está en estado sólido, líquido, gelificada o coloidal.
35
11. La composición según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 10, donde además

comprende un soporte agrícola.

- 5 12. La composición según la reivindicación 11, donde el soporte se selecciona de la lista que consiste en: sustrato orgánico, sustrato inorgánico, agua, disolución salina y cualquier combinación de los mismos.
- 10 13. La composición según la reivindicación 12, donde el sustrato orgánico se selecciona de la lista que consiste en arcilla, residuo vegetal, polvo de corcho, celulosa, turba, fibra de coco, compost y cualquiera de sus combinaciones.
- 15 14. La composición según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 13, donde además comprende una semilla.
- 15 15. Uso de la cepa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, del cultivo biológicamente puro según la reivindicación 4 o de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 13 como fertilizante o para incrementar o promover el crecimiento de una planta.
- 20 16. Uso según la reivindicación 15, en el que la planta es una planta de cultivo o una planta ornamental.
17. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 15 o 16 en donde el crecimiento de la planta se da en condiciones de estrés hídrico o salino.
- 25 18. Método para incrementar o promover el crecimiento de las plantas que comprende:
(i) poner en contacto una planta o la semilla de una planta con un fertilizante que se selecciona de la lista que consiste en la cepa descrita en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, el cultivo biológicamente puro según la reivindicación 4 y la composición según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 14; y
30 (ii) desarrollar la semilla o la planta de la etapa (i).
19. El método según la reivindicación 18, donde el contacto en el paso (i) se lleva a cabo mediante la aplicación del fertilizante en forma líquida, sólida o de forma hidropónica.

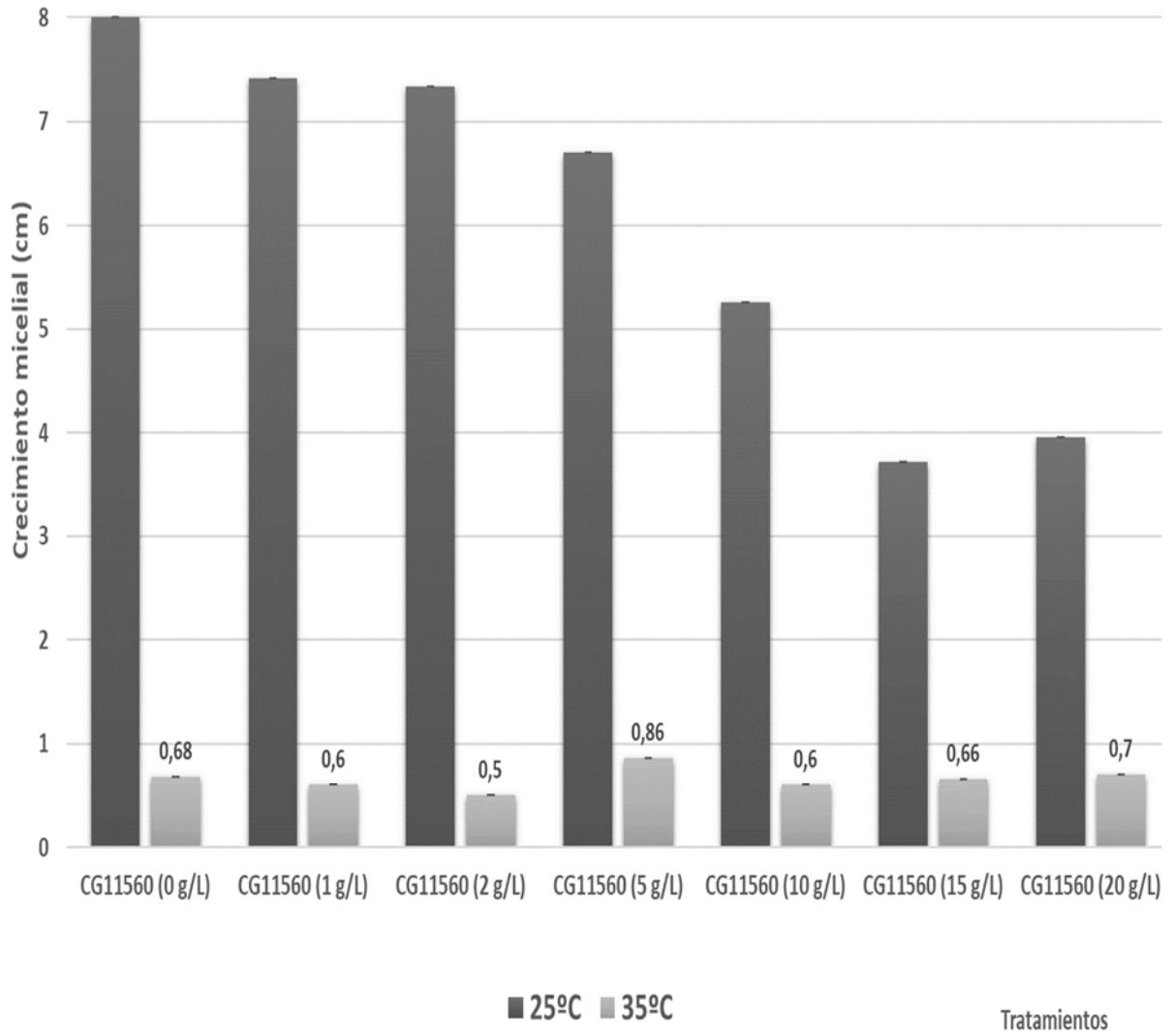


Figura 1

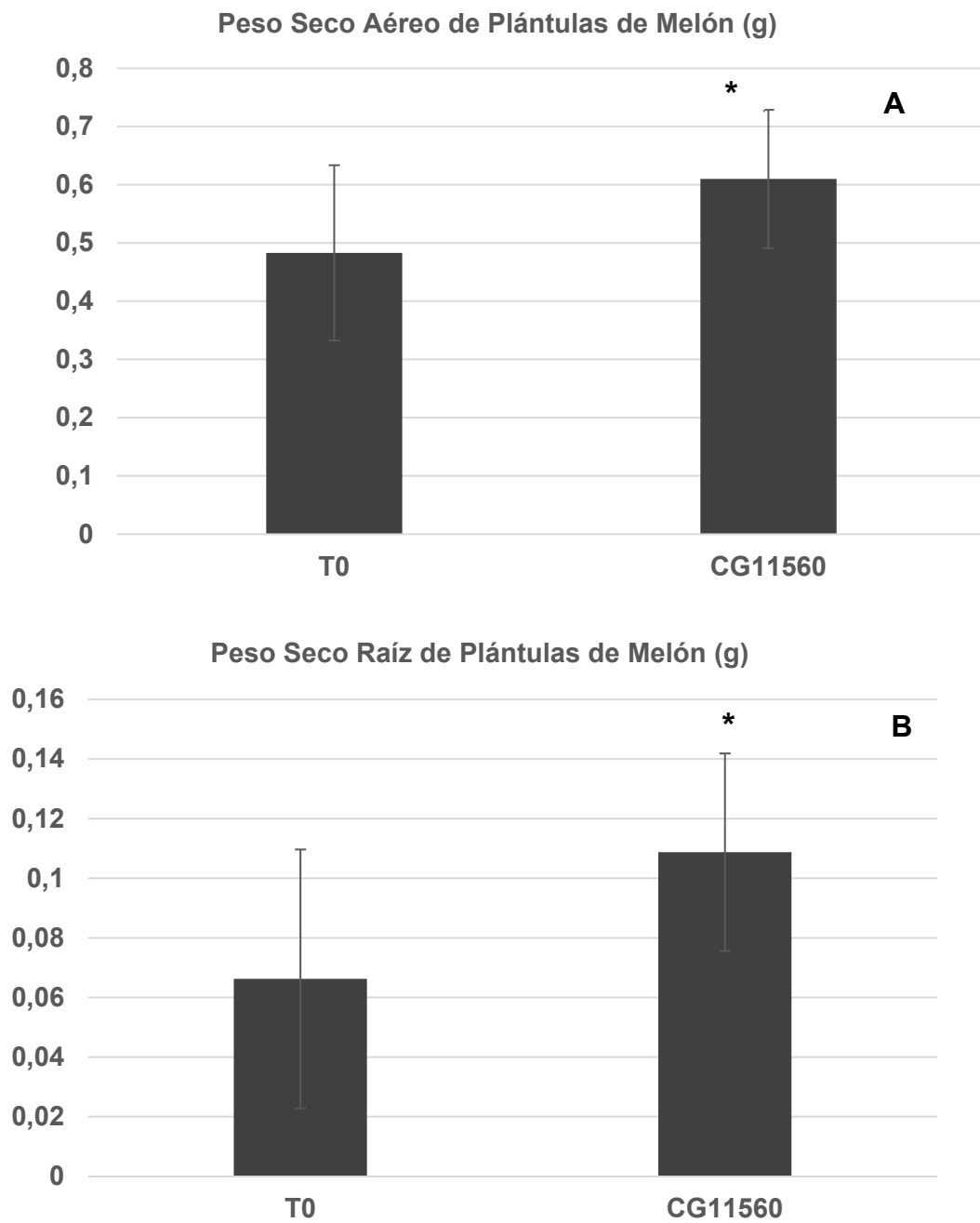


Figura 2

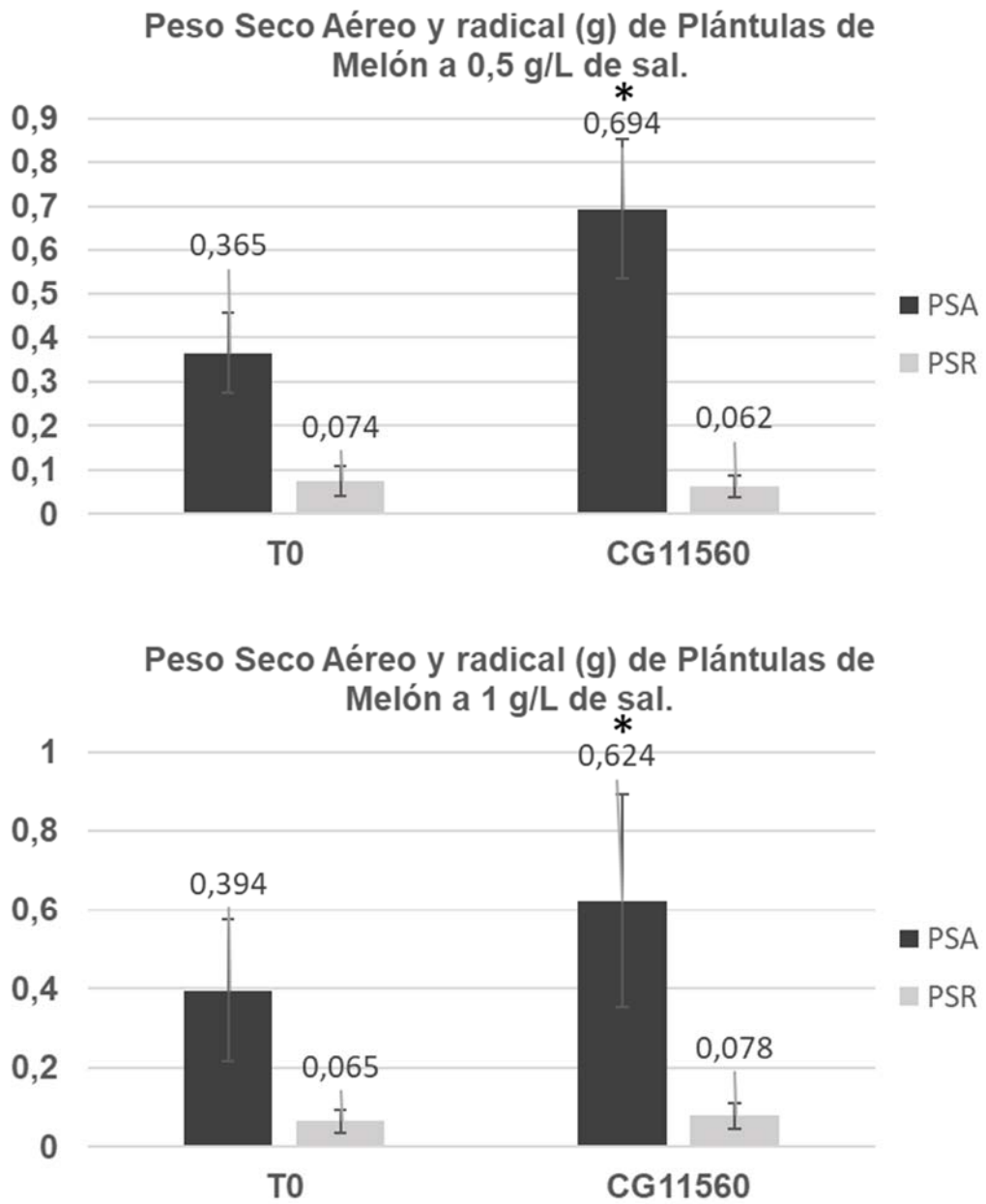


Figura 3

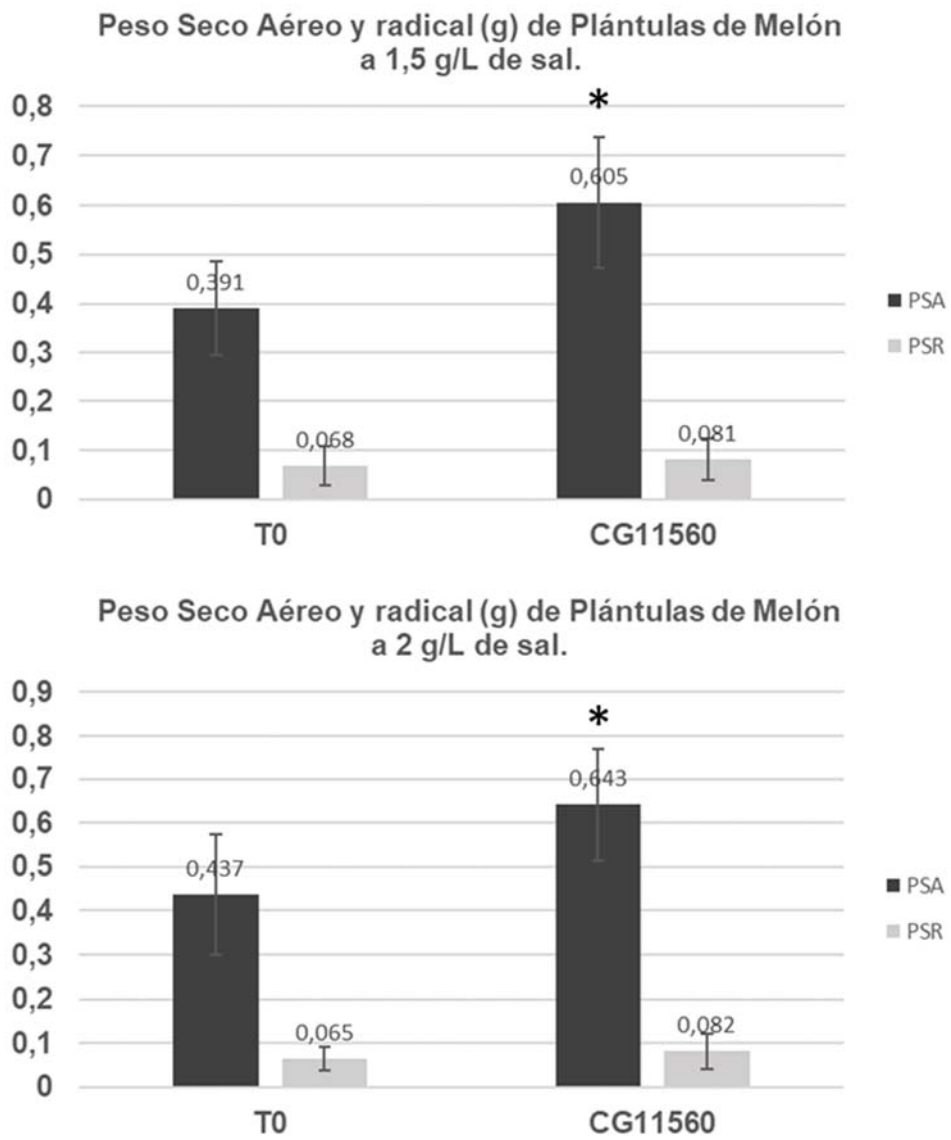


Figura 3 (continuación)

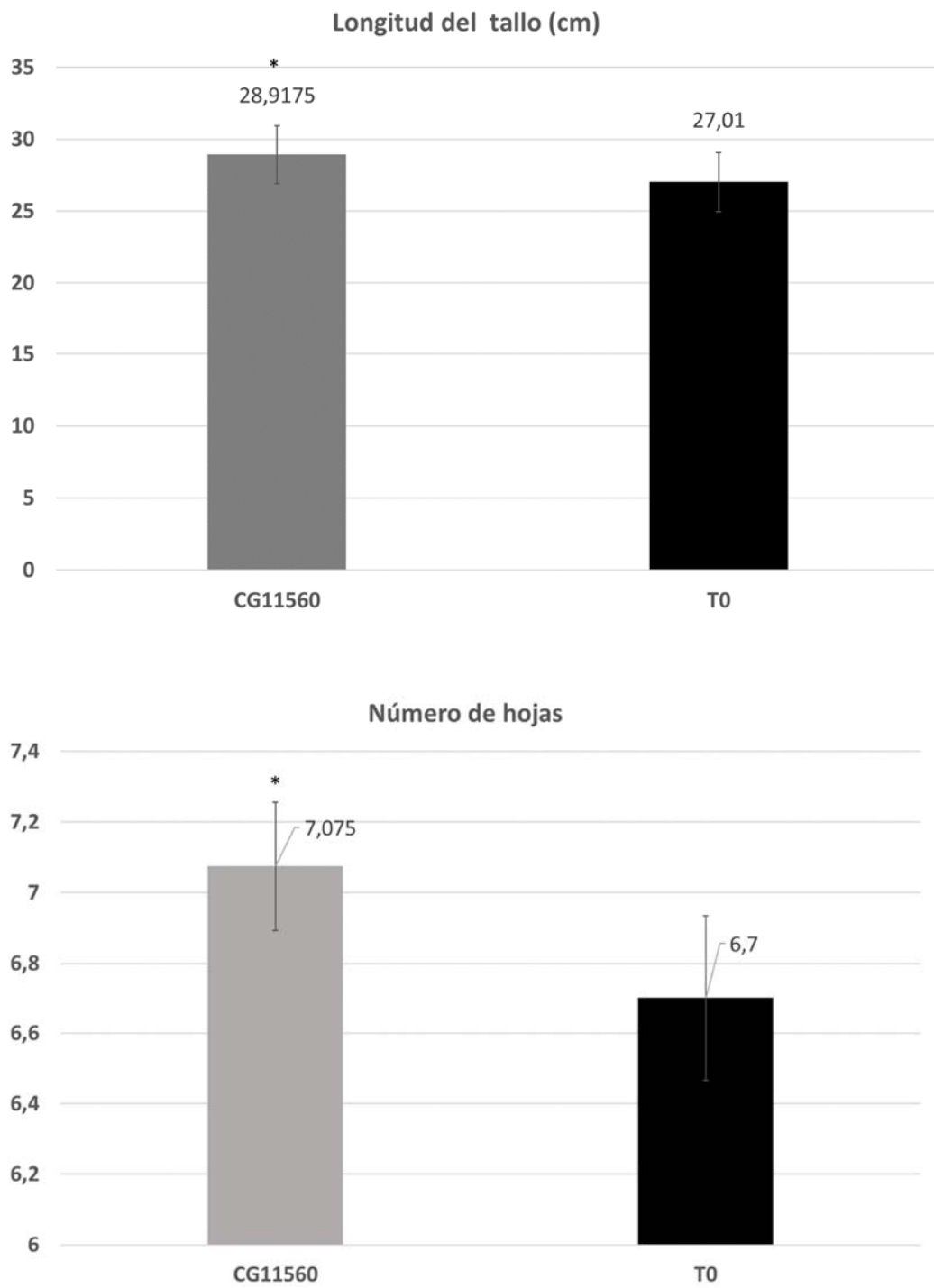


Figura 4

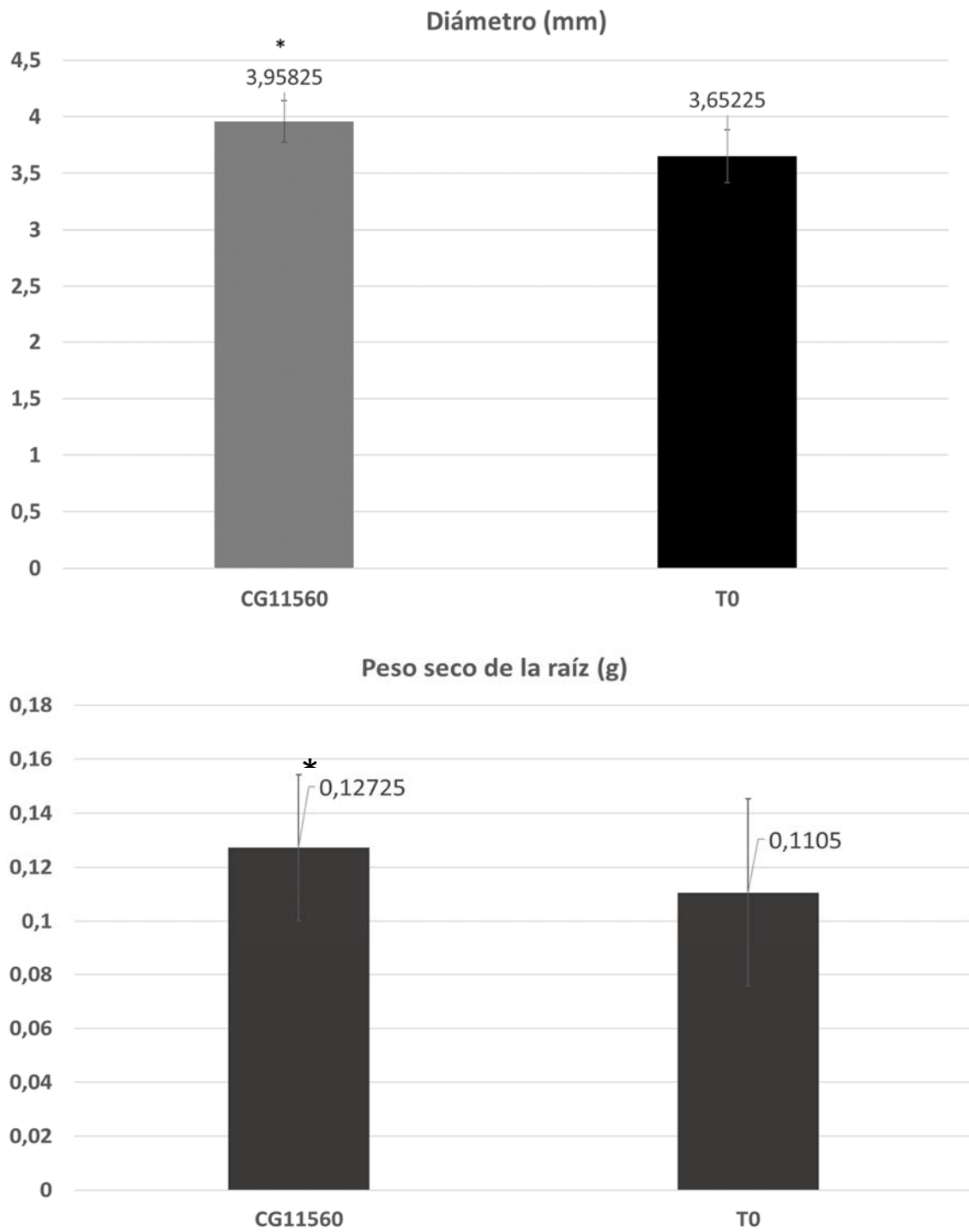


Figura 4 (continuación)

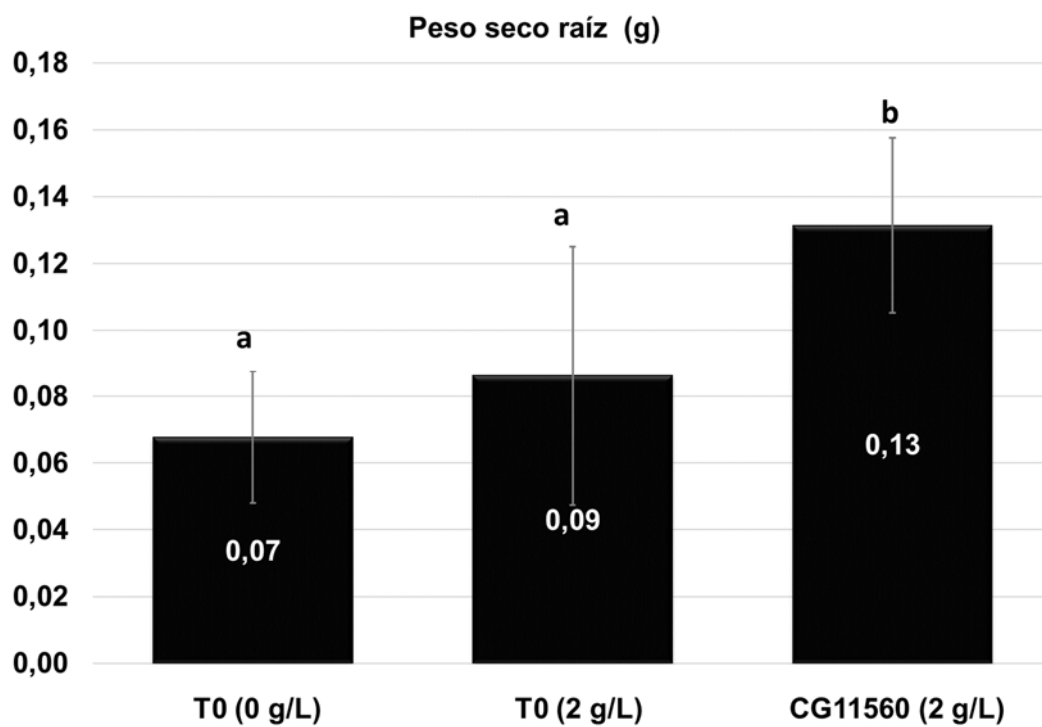
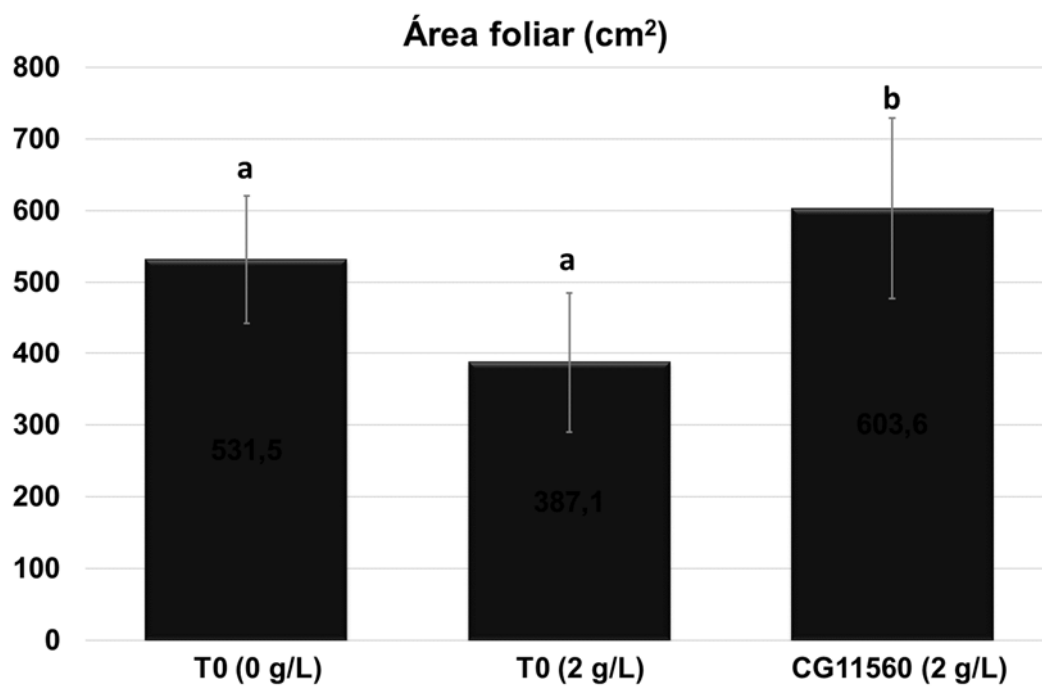


Figura 5

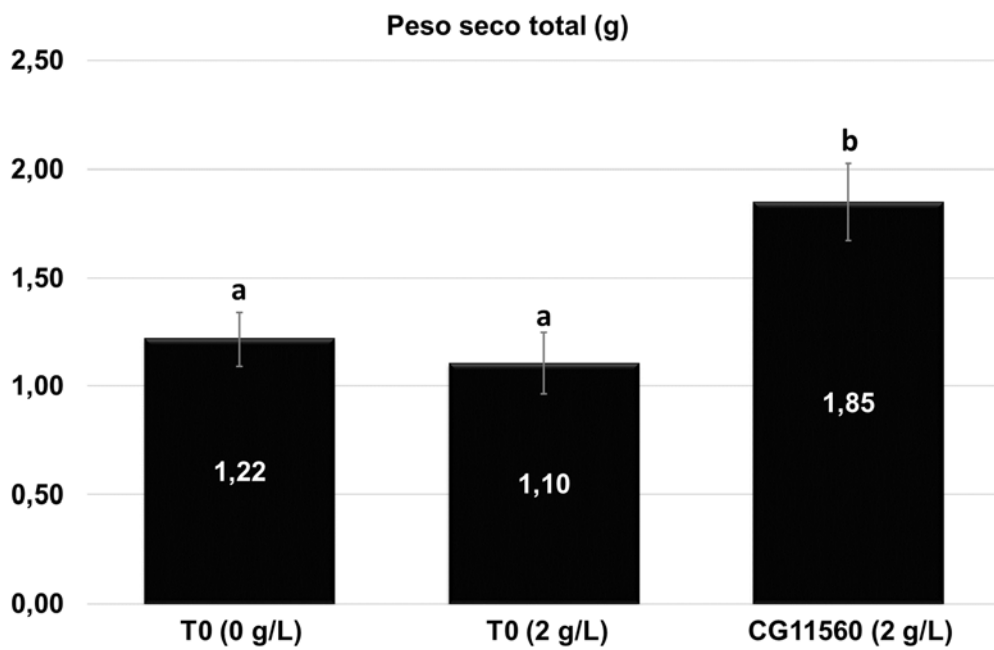
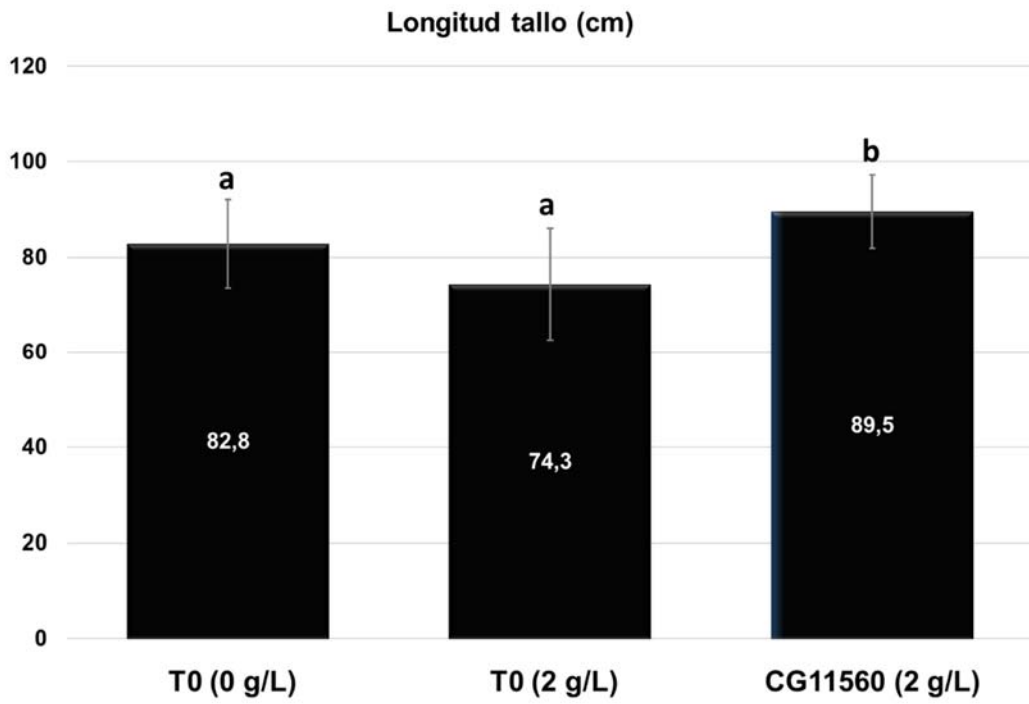


Figura 6

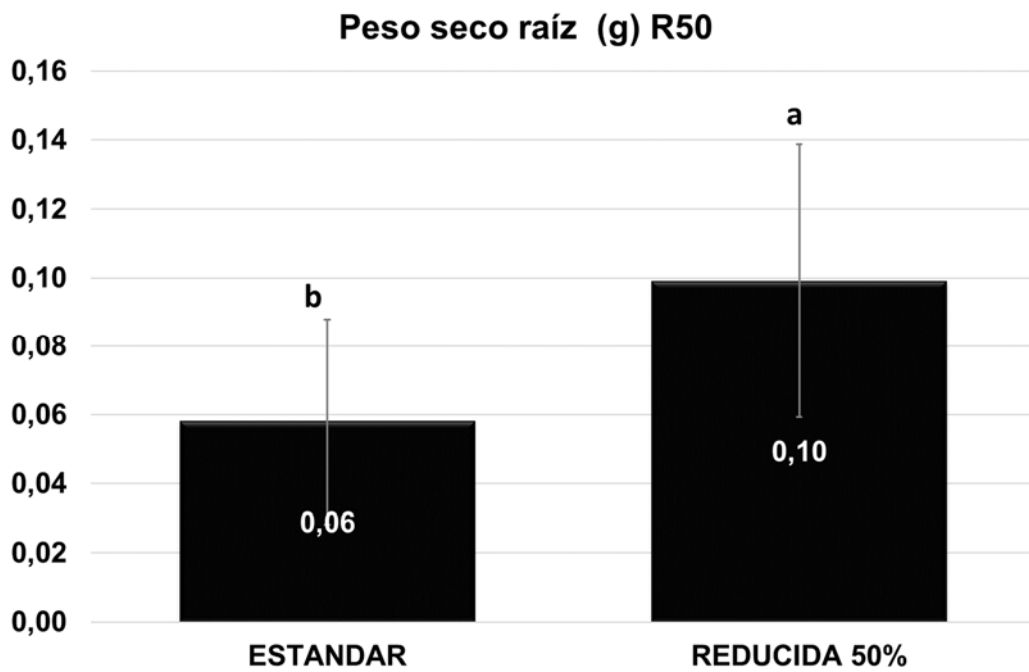
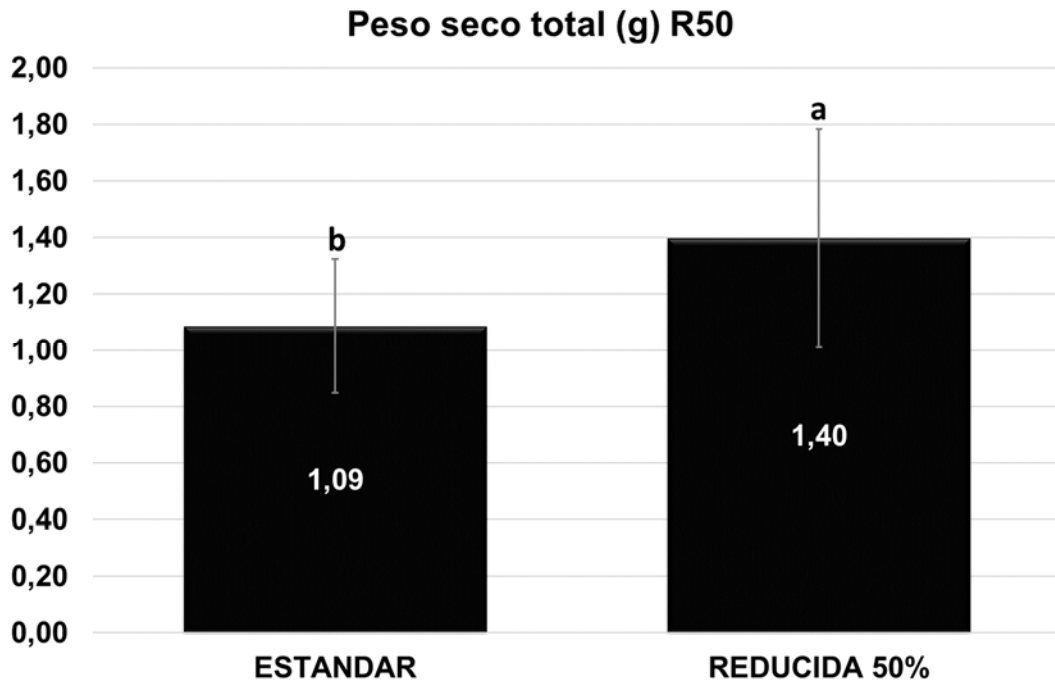


Figura 7

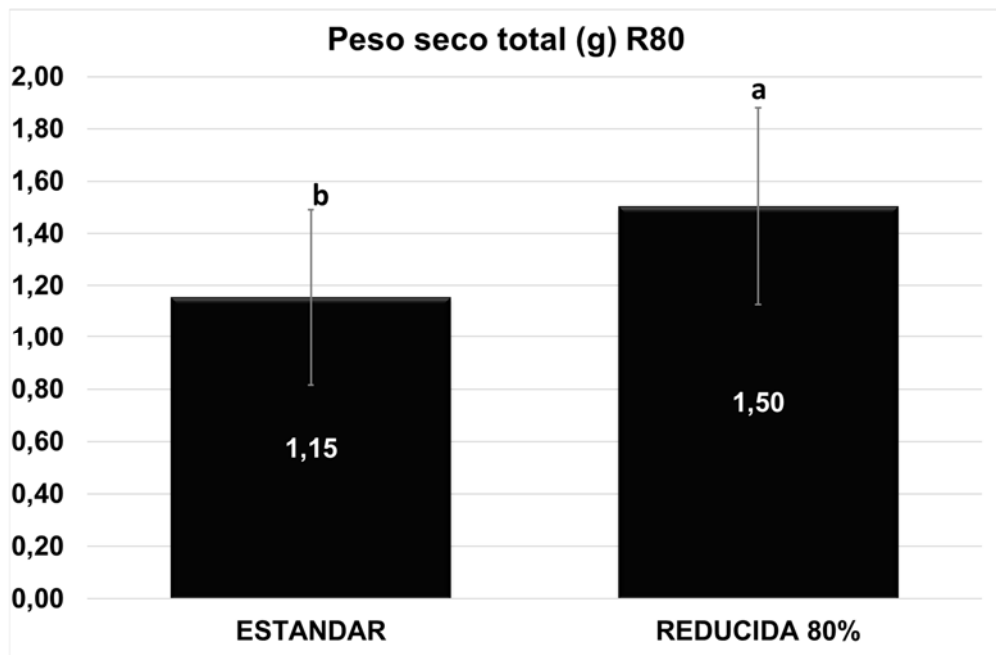
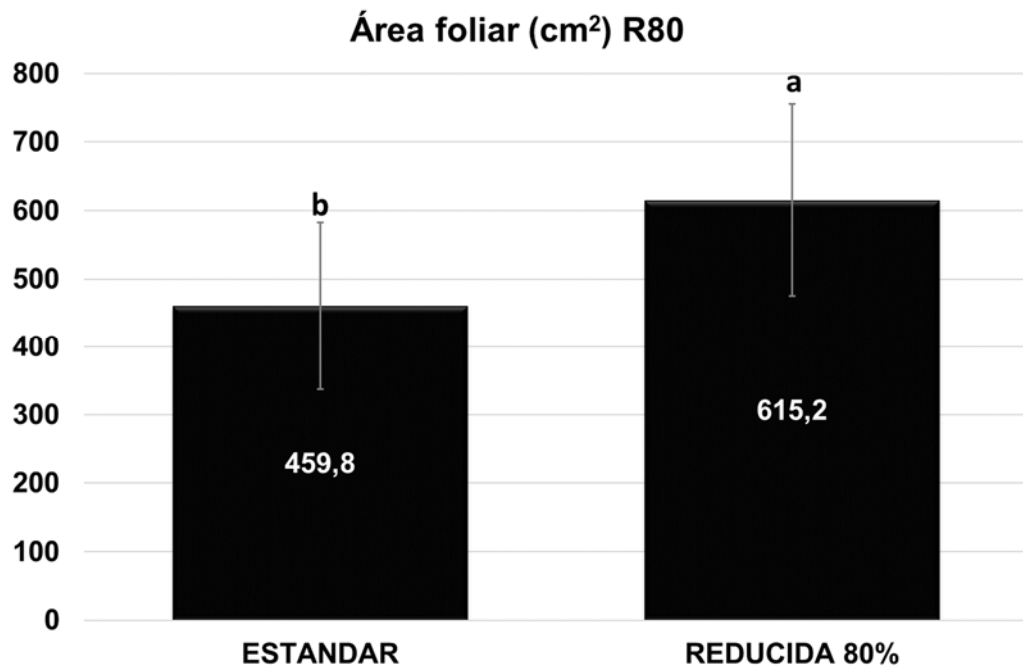


Figura 8