

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 439 393**

21 Número de solicitud: 201331839

51 Int. Cl.:

**C12N 1/14** (2006.01)

**A01H 3/00** (2006.01)

**C12R 1/665** (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN PREVIO

B2

22 Fecha de presentación:

**17.12.2013**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**22.01.2014**

Fecha de modificación de las reivindicaciones:

**23.06.2014**

Fecha de la concesión:

**23.07.2014**

45 Fecha de publicación de la concesión:

**30.07.2014**

73 Titular/es:

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

**C/ Ramiro de Maeztu, 7  
28040 Madrid (Madrid) ES**

72 Inventor/es:

**SACRISTÁN BENAYAS, Soledad;  
CUEVA GONZÁLEZ, Evelin Elizeth y  
ALONSO GONZÁLEZ, Ángela**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

54 Título: **Método para incrementar la producción de flores, semillas y/o frutos en una planta**

57 Resumen:

Método para incrementar la producción de flores, semillas y/o frutos en una planta, que comprende la etapa de poner en contacto dicha planta con una composición que comprende el microorganismo *Colletotrichum tofieldiae* y/o extractos de dicho microorganismo y/o filtrados de dicho microorganismo. Dicho microorganismo puede ser una cepa de *Colletotrichum tofieldiae* depositada con el número de depósito CECT 20833, CECT 20834, CECT 20835 o CECT 20836.

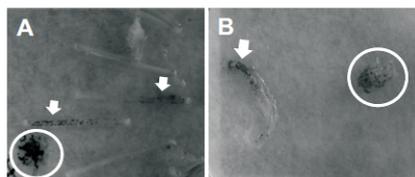


FIG. 1

ES 2 439 393 B2

**MÉTODO PARA INCREMENTAR LA PRODUCCIÓN DE FLORES, SEMILLAS Y/O  
FRUTOS EN UNA PLANTA**

**DESCRIPCIÓN**

5

**CAMPO DE LA INVENCIÓN**

El campo de la presente invención es el sector agronómico, en particular métodos para incrementar la producción de flores, semillas y/o frutos utilizando el microorganismo  
10 *Colletotrichum tofieldiae*.

**ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN**

Las plantas en la naturaleza establecen asociaciones simbióticas con microorganismos  
15 llamados mutualistas que les confieren beneficios en su crecimiento, supervivencia y multiplicación. Estos microorganismos se pueden aislar, y utilizar sus propiedades beneficiosas en cultivos para mejorar su rendimiento.

El género *Colletotrichum* (Ascomyceto, teleomorfo Glomerella) comprende más de 60  
20 especies y complejos de especies. Morfológicamente se caracteriza por tener conidiomas típicamente acervulares, que pueden llevar cerdas o no, con conidias unicelulares hialinas que pueden ser rectas o curvadas, de un tamaño preferentemente mayor de 12  $\mu$ , típicamente granuladas. Las conidias pueden formarse también a partir del micelio u otras conidias (conidias microcíclicas). Las conidias al germinar forman apresorios. Algunas  
25 especies forman estromas o esclerocios.

El género *Colletotrichum* comprende especies que son patógenos importantes de cultivos y que, por ello, son las especies más conocidas y mejor estudiadas. Sin embargo, dentro del género existen muchas especies que han sido citadas como endófitos o epífitos que no causan ningún daño a la planta huésped (llamadas comensales) o que incluso pueden ser  
30 beneficiosas para la planta (mutualistas). En Hyde y col. (Fungal Diversity 39 (2009) 147–182) se hace una descripción exhaustiva de todas las especies del género *Colletotrichum* actualmente conocidas, con la lista de huéspedes de estas especies citados en la literatura y especificando el tipo de interacciones establecidas con cada huésped (patogénica, comensal o mutualista). La evidencia citada en esta publicación indica que, dentro de las  
35 especies o complejos de especies consideradas como patógenas, pueden existir cepas asintomáticas. Incluso se dan casos de cepas que se pueden comportar como patógenos,

comensales o mutualistas dependiendo del huésped en el que se inoculen. Un ejemplo de este caso es *C. orbiculare*, que se comporta como patógeno en cucurbitáceas pero se puede comportar como mutualista en tomate, confiriendo resistencia a patógenos y a sequía y promoviendo el crecimiento vegetativo de la planta cuando es inoculada por la raíz.

5

#### DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Una realización preferida de la presente invención es un método para incrementar la producción de flores, semillas y/o frutos en una planta, caracterizado por que comprende la etapa de poner en contacto dicha planta con una composición que comprende el microorganismo *Colletotrichum tofieldiae* y/o extractos de dicho microorganismo y/o filtrados de dicho microorganismo, en adelante método de la invención.

De aquí en adelante el término “microorganismo de la invención” hace referencia al microorganismo de la especie *Colletotrichum tofieldiae*.

Se entiende por incrementar la producción de flores, semillas y/o frutos en una planta tratada según el método de la invención como el aumento de número, tamaño y/o peso de flores, semillas y/o frutos de esa planta en relación con una planta que no haya sido tratada según el método de la invención.

La especie *Colletotricum tofieldiae* se describe en Damm y col. (Fungal Diversity 39 (2009) 45–87). Esta especie se caracteriza por tener conidias curvadas y acéculos con cerdas que pueden ser de color marrón o negro. Las conidias y las cerdas se pueden formar directamente sobre las hifas. Las esporas germinan formando apresorios de variada morfología y coloración. La definición de la especie también se debe a características moleculares con respecto a secuencias de la subunidad 5.8S del ribosoma con las dos regiones flanqueantes espaciadoras (ITS), un intrón de 200-bp del gen de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), una secuencia parcial del gen de la actina (ACT), el gen de la quitina sintasa 1 (CHS-1), el gen de la beta-tubulina (Tub2) y el gen de la histona 3 (HIS3). Los aislados tipo utilizados para describir la especie *C. tofieldiae* proceden de *Tofieldia* spp. (monocotiledónea), *Lupinus polyphyllus* y *Dianthus* sp. (ambas dicotiledóneas), por lo que esta especie es capaz de colonizar distintas especies de huéspedes tanto de mono como de dicotiledóneas. *C. tofieldiae* no ha sido citado como patógeno ni mutualista de ningún huésped.

En la presente invención se han aislado, identificado y caracterizado unos nuevos aislados de *Colletotrichum tofieldiae* que sorprendentemente tienen la capacidad de aumentar significativamente la producción de flores, semillas y/o frutos en plantas. Aislados de otras especies de hongos de la misma zona no presentaban esta capacidad. Las plantas incrementan la producción de flores, semillas y/o frutos como consecuencia del contacto de cualquier parte de la planta con el microorganismo *Colletotrichum tofieldiae* para establecer una relación duradera que induce el incremento de producción identificado. En la presente invención se muestra que el microorganismo *C. tofieldiae* se trasloca o dispersa a los distintos órganos de la planta tratada, y puede permanecer en ella al menos dos meses tras el tratamiento. Esta característica hace que el efecto del microorganismo sobre la planta pueda ser más duradero, prolongándose durante el ciclo de la planta y mejorando el rendimiento al final del mismo. Esta característica hace que este microorganismo sea más efectivo que otros microorganismos utilizados para fines similares.

El método de la invención mejora la producción de flores, frutos y semillas en una mayor proporción que el aumento del crecimiento vegetativo de la planta. Es decir, la planta utiliza los recursos de una manera más eficiente, produciendo más y/o mayores flores, frutos y semillas en relación con el tamaño global de la planta. Es la primera vez que se describe esta característica en las cepas de *Colletotrichum tofieldiae* de la invención. Se trata de un fenómeno general a la especie *Colletotrichum tofieldiae* porque se han obtenido efectos similares con distintas cepas de esta especie.

El método de la invención produce un aumento del tamaño y/o peso y/o número de flores y/o frutos y/o semillas que puede ser también debido a la mejor salud o viabilidad del cultivo (por ejemplo debida a la reducción en la aplicación de riego, abonos y/o pesticidas, aumento de la resistencia sistémica o aumento de la resistencia a herbicidas) y/o al aumento de la germinación de semillas y/o características de bio-control como la disminución de enfermedades por la disminución de la sensibilidad a patógenos y/o la mejora de infecciones previas.

30

El método de la invención produce al menos uno de los efectos siguientes:

- un aumento en el rendimiento global de la planta;
- un aumento en la calidad del material de la planta;
- 35 - un aumento del número y/o tamaño de flores
- un aumento del número, tamaño y/o peso de frutos

- un aumento del número, tamaño, y/ o peso de semillas.

Un aumento en el rendimiento global indica preferiblemente un aumento en el rendimiento de las partes cosechables de la planta. El aumento en el rendimiento puede ser, por ejemplo, cualquier tipo de aumento como que el número de partes cosechables haya aumentado y/o aumento de su peso y/o aumento del contenido de sustancias de almacenamiento, metabolitos interesantes etc. Un aumento del rendimiento de las plantas significa que las partes cosechables de la planta son al menos un 2%, preferiblemente al menos un 25%, más preferiblemente un 70% y particularmente preferido al menos un 500% mayor cuando la planta se pone en contacto con la composición que comprende esporas, micelio y/o cualquier otra parte del microorganismo de la invención, el medio de cultivo o el filtrado de acuerdo a la invención en comparación con las plantas no tratadas

Un aumento en calidad preferiblemente indica una mejora de las cualidades deseables de una planta. Este aumento de la calidad puede diferir de planta a planta. Respecto a las plantas ornamentales, por ejemplo, Petunia, un aumento en la calidad puede significar un aumento en el número de flores u hojas. Respecto a los cereales un aumento de la calidad puede significar un aumento en la cantidad de proteínas o contenido de almidón en las semillas o una alteración deseada en la estructura o composición de sustancias de almacenamiento.

En el método de la invención, se pone en contacto una planta con una composición que comprende el microorganismo *Colletotrichum tofieldiae*, el medio de cultivo o el filtrado de acuerdo a la invención. La composición se puede aplicar en la totalidad de la planta o en cualquiera de sus partes, como en las hojas, en los brotes, en las flores, en los frutos, en las mazorcas, en semillas, en bulbos, en tubérculos, en raíces y en plántulas. La aplicación de la composición a la planta se puede realizar en cualquier estadio, y como ejemplo se puede aplicar a la semilla antes de la siembra, durante la siembra, después de la siembra, y antes o después de la emergencia, durante el periodo vegetativo, como durante el cultivo en semillero, o en el momento del trasplante de las plántulas, o en el momento del esquejado o enraizado de esquejes, o en el momento de crecimiento en una plantación, o incluso en el periodo reproductivo antes de la floración o durante la floración o durante el proceso de maduración del fruto.

Por tanto, otra realización es el método de la invención, donde dicha composición se aplica a las semillas de dicha planta.

Otra realización es el método de la invención, donde dicha composición se aplica a las partes aéreas de dicha planta.

- 5 Otra realización es el método de la invención, donde dicha composición se aplica a las raíces de dicha planta o a otras partes subterráneas de dicha planta.

El método de la invención incluye el tratamiento por spray o pulverización sobre plantas completas o cualquiera de sus partes de una dilución adecuada de la composición de acuerdo a la invención, o la inmersión de plantas completas o de cualquiera de sus partes en dicha dilución. El método de la invención también incluye el tratamiento por espolvoreado en seco de plantas completas o de cualquiera de sus partes de una composición de acuerdo a la invención. El método de la invención incluye el peleteado, o recubrimiento de semillas con una película fina de una composición de acuerdo a la invención. La composición de acuerdo a la invención también puede mezclarse con el líquido de irrigación. El método de la invención también incluye el tratamiento mediante fragmentos de agar con micelio que se pone en contacto con una parte de la planta, ya sea raíz, tallo u hojas o incluso sobre la superficie de la tierra cerca de las raíces del cultivo.

20 En la presente memoria, se entiende por “filtrado” a un medio de cultivo líquido obtenido del cultivo del microorganismo de la invención. Es posible obtener un medio de cultivo líquido, libre o esencialmente libre del microorganismo de la invención. Este medio de cultivo puede ser preparado primero cultivando el microorganismo de la invención en un medio de cultivo líquido y después separando el medio de cultivo líquido del microorganismo de la invención. La separación puede ser llevada a cabo por diferentes métodos conocidos por la persona experta en la materia, por ejemplo, por centrifugación o filtración. Es posible, por ejemplo, calentar el medio con el microorganismo de la invención dos veces hasta alrededor de 80 °C durante 30 min y después eliminar el material fúngico por centrifugación.

30 Preferiblemente, el filtrado se obtiene por filtración del medio de cultivo a través de un filtro con un tamaño de poro de no más de 2 µm, preferiblemente a través de un filtro con un tamaño de poro de no más de 0,2 µm. El paso de filtración permite la extracción de esencialmente todas las hifas del microorganismo de la invención, más preferiblemente la filtración también eliminaría las esporas e incluso más preferiblemente esto debería eliminar todo tipo de material fúngico.

La presente invención también se refiere a las plantas que, según el método de la invención, se han puesto en contacto con una composición que comprende el microorganismo *Colletotrichum tofieldiae* y/o extractos de dicho microorganismo y/o filtrados de dicho microorganismo, y a los productos producidos a partir de las partes cosechadas de dichas plantas.

Otra realización es el método de la invención, donde dicho microorganismo es una cepa de *Colletotrichum tofieldiae* depositada con el número de depósito CECT 20833, CECT 20834, CECT 20835 o CECT 20836.

Las cepas de *Colletotrichum tofieldiae* han sido depositadas el 30/05/2013 (cepas con números de depósito CECT 20833, CECT 20834 y CECT 20835) y el 7/05/2013 (cepa con número de depósito CECT 20836) en la autoridad internacional de depósito Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con dirección Parc Cientific Universitat de València, Catedrático Agustín Escardino, 9. 46980, Paterna, (Valencia), España, por Universidad Politécnica de Madrid, con dirección en c/ Ramiro de Maeztu, 7, 28040 Madrid, España.

El microorganismo de la invención puede ser cultivado sobre una amplia variedad de sustratos naturales o sintéticos. Por ejemplo, puede ser cultivado en diferentes tipos de medios de cultivo sólidos o líquidos, tales como medio Patata/Dextrosa/Agar (PDA) o Caldo (PDB), y puede ser propagada por técnicas per se conocidas por expertos. También puede crecer sobre varias fuentes naturales, tales como hojas de varias plantas, granos de polen, harina de avena, patata, zanahoria y celulosa. También puede crecer sobre fuentes artificiales como papel o cartón y polímeros.

El medio de cultivo puede ser constantemente agitado durante el cultivo, por ejemplo con aproximadamente 1 rps. Además, la temperatura de cultivo se puede situar en el rango entre 20 y 30 °C.

Otra realización es el método de la invención, donde dicho microorganismo está en forma de esporas, hifas, micelio o esclerocios.

Otra realización es el método de la invención, donde dicha composición se aplica al sustrato para el cultivo de dicha planta.

El sustrato es preferiblemente tratado de modo que el microorganismo de la invención se cultiva en él antes que el sustrato se use para el cultivo de plantas. Ejemplos de tratamiento del sustrato incluyen perfusión de un líquido al sustrato (por riego, inyección o goteo), pulverización, espolvoreo o mezcla directa con el sustrato. El método de la invención también comprende el tratamiento de un medio hidropónico, para el cultivo en hidroponía. El método de la invención comprende el tratamiento del sustrato o medio hidropónico con una composición que comprenda la concentración adecuada de micelio y/o esporas y/o cualquier otra parte del microorganismo de la invención, el medio de cultivo o el filtrado de acuerdo a la invención en forma líquida y/o en forma sólida como granulado o polvo.

10

El método de la invención puede realizarse con una composición que incluye el microorganismo de la invención solo o formulado con ingredientes inertes. Ejemplos de ingredientes inertes incluyen polvos finos o gránulos como minerales, como arcillas, bentonita, calcita, diatomeas y materiales orgánicos como polvo de maíz o polvo de piel de nuez, materiales orgánicos sintéticos como urea, sales como carbonato cálcico y sulfato amónico, materiales sintéticos inorgánicos como óxido de silicón; o diluyentes líquidos como hidrocarburos aromáticos como xileno, alquil benceno, metil naftaleno, alcoholes como el 2-5 propanol, etilenglicol, glicol propileno, y éter mono etil etilen glicol, cetonas como la acetona, la ciclohexanona e isoforona, aceites vegetales como aceite de soja o aceite de algodón, hidrocarburos alifáticos derivados del petróleo, ésteres, dimetil sulfóxido, acetonitrilo y agua. Ejemplos de surfactantes incluyen surfactantes aniónicos como sales de ésteres de alquil sulfato, sales de alquilaril sulfonato, sales de dialkil sulfosuccinato, sales de ésteres de éter fosfato de alquilaril de polioxietileno, sales de lignosulfonato y policondensados de formaldehído, y surfactantes no iónicos como éteres de alquil aril polioxietileno, bloques de copolímeros de alquilpolioxipropileno, polioxietileno y ésteres de ácidos grasos, y surfactantes catiónicos como sales de alquil trimetilamonio. Ejemplos de otros agentes de formulación auxiliares incluyen polímeros hidrosolubles como el alcohol de polivinilo o la polivinilpirrolidona, polisacáridos como el agar, la goma arábiga, el ácido alginico y sus sales, la carboxi metil celulosa, la goma xantano, materiales inorgánicos como el silicato de aluminio y magnesio, preservantes, agentes colorantes, agentes estabilizadores como el ácido isopropil fosfato y el BHT.

Por tanto, otra realización es el método de la invención, donde dicha composición comprende minerales, materiales orgánicos, compuestos orgánicos, compuestos inorgánicos, diluyentes líquidos, alcoholes, cetonas, aceites vegetales, hidrocarburos alifáticos, ésteres, dimetil sulfóxido, acetonitrilo, agua, surfactantes aniónicos, surfactantes

35

no iónicos, surfactantes catiónicos, polímeros hidrosolubles, polisacáridos, preservantes, agentes colorantes, y/o agentes estabilizadores. De forma particular, dichos minerales están seleccionados del grupo compuesto por arcillas, bentonita, calcita y diatomeas, dichos materiales orgánicos están seleccionados del grupo compuesto por polvo de maíz o polvo de piel de nuez, dicho compuesto orgánico es urea, dichos compuestos inorgánicos están seleccionados del grupo compuesto por carbonato cálcico, sulfato amónico, óxido de silicona, silicato de aluminio y magnesio, dichos diluyentes líquidos están seleccionados del grupo compuesto por hidrocarburos aromáticos, hidrocarburos alifáticos, alcoholes, cetonas, aceites vegetales, ésteres, dimetil sulfóxido, acetonitrilo y agua, dichos surfactantes aniónicos están seleccionados del grupo compuesto por sales de ésteres de alquil sulfato, sales de alquilaril sulfonato, sales de dialkil sulfosuccinato, sales de ésteres de éter fosfato de alquilaril de polioxietileno, sales de lignosulfonato y policondensados de formaldehído, dichos surfactantes no iónicos están seleccionados del grupo compuesto por éteres de alquil aril polioxietileno, bloques de copolímeros de alquilpolioxipropileno, polioxietileno y ésteres de ácidos grasos, dichos surfactantes catiónicos son sales de alquil trimetilamonio, dichos polímeros hidrosolubles son alcohol de polivinilo o polivinilpirrolidona, dichos polisacáridos están seleccionados del grupo compuesto por agar, goma arábiga, ácido alginico, sales de ácido alginico, carboxi metil celulosa y goma xantano y dichos agentes estabilizadores son ácido isopropil fosfato o BHT. De forma particular, dichos hidrocarburos aromáticos están seleccionados del grupo compuesto por xileno, alquil benceno, metil naftaleno, dichos alcoholes están seleccionados del grupo compuesto por 2-5 propanol, etilenglicol, glicol propileno y éter mono etil etilen glicol, dichas cetonas están seleccionadas del grupo compuesto por acetona, ciclohexanona e isoforona y dichos aceites vegetales son aceite de soja o aceite de algodón.

25 Otra realización es el método de la invención, donde dicha composición comprende sales de fertirrigación, fertilizantes, insecticidas, nematocidas, fungicidas, bactericidas y/o herbicidas.

30 Otra realización es el método de la invención, donde dicha composición es un líquido, un sólido, una pasta o un gel.

Otra realización es el método de la invención, donde dicha composición es un polvo, pastilla, comprimido, granulado o concentrado emulsionable.

35 Otra realización es el método de la invención, donde dicha composición se aplica por spray, pulverización, inmersión, irrigación o espolvoreado.

Otra realización es el método de la invención, donde dicha planta está seleccionada del grupo compuesto por gimnospermas, monocotiledóneas y dicotiledóneas. De forma particular, dicha planta es una planta de la familia *Brassicaceae*.

5

En la presente invención, la planta puede ser una planta natural o transgénica.

El método de la invención puede ser realizado con todas las posibles plantas y células o tejidos derivados de tales plantas. En particular, pueden ser llevados a cabo con todas las  
10 Gimnospermas y Angiospermas (monocotiledóneas o dicotiledóneas) o material de planta derivado de tales plantas, incluyendo árboles, arbustos, hierbas y céspedes. Preferiblemente, los usos y procesos se aplican para usar en plantas útiles o materiales o células de tales plantas, más preferiblemente para la agricultura, horticultura, plantas forestales, ornamentales, o de cualquier otro interés comercial. Entre otras, a título ilustrativo  
15 y sin que limite el alcance de la presente invención: arroz, trigo, cebada, maíz, soja, colza, tomate, judía, así como diferentes especies frutales (naranja, limonero, etc.) y de ornamentales.

Otra realización de la invención es un material de propagación de una planta que  
20 comprende una cepa del microorganismo *Colletotrichum tofieldiae* depositada con el número de depósito CECT 20833, CECT 20834, CECT 20835 o CECT 20836 y/o extractos de dicha cepa y/o filtrados de dicha cepa. De forma particular, dicho material de propagación está seleccionado del grupo compuesto por semillas, plántulas, plantas jóvenes, esquejes, bulbos y tubérculos.

25

En la presente memoria se entiende por “material de propagación” a cualquier tipo de material celular del cual pueda germinar o desarrollarse una planta. Ejemplos de material de propagación incluyen, pero no están limitados a: semillas, esquejes, suspensiones celulares, cultivo de callos, cultivo de tejidos, protocormos, explantes o germoplasma. El material de  
30 propagación puede tener distinto origen. Por ejemplo, puede estar recién recolectado, o derivar de un stock, como una muestra de semillas o un stock de células congeladas.

Otra realización de la invención es un sustrato para el cultivo de plantas que comprende el microorganismo *Colletotrichum tofieldiae* y/o extractos de dicho microorganismo y/o filtrados  
35 de dicho microorganismo.

El sustrato para el cultivo de plantas puede comprender la espora, el micelio o cualquier otra parte del microorganismo de la invención o el medio de cultivo o filtrado de los mismos o alguna de las posibles combinaciones de algunos de estos componentes. El sustrato puede ser líquido o sólido.

5

Ejemplos de sustratos para el cultivo de plantas son medios naturales o sintéticos solidificados y para el cultivo de las plantas, especialmente in vitro. Otros ejemplos son tierra, arena, humus o turba o mezclas de éstos.

10 Otra realización de la invención es una cepa del microorganismo *Colletotrichum tofieldiae*, depositada con el número de depósito CECT 20833, CECT 20834, CECT 20835 Y CECT 20836.

15 Otra realización de la invención es el uso del microorganismo *Colletotrichum tofieldiae* y/o extractos de dicho microorganismo y/o filtrados de dicho microorganismo para incrementar la producción de flores, semillas y/o frutos en una planta

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

20 Figura 1. Reaislamiento de *C. tofieldiae* de órganos no inoculados de plantas de *A. thaliana* a los 60 días post inoculación. A. Aislado CECT 20834 reaislado de hoja (círculo) y tallos (flechas). B. Aislado CECT 20833 reaislado de raíz (flecha) y cuello (círculo).

#### MODOS DE REALIZACIÓN PREFERENTE

25

Ejemplo 1: Cribado de hongos que aumentan la productividad de las plantas

30 Se recolectaron plantas de *Arabidopsis thaliana* creciendo en condiciones naturales. Estas plantas carecían de síntomas de enfermedad tales como clorosis, manchas foliares y otros tipos de lesiones inducidas por patógenos. Fragmentos de las hojas de la roseta de las plantas recolectadas se desinfectaron sumergiéndolas en 20% de lejía comercial (1% cloro activo) y agitando suavemente durante 5 minutos. Después, los fragmentos se aclararon dos veces en agua estéril y se pusieron en cámara húmeda a temperatura ambiente (20-24°C).

35 Los fragmentos se inspeccionaron periódicamente, aislando el micelio emergente en placas petri con medio patata dextrosa agar (PDA) con 200 mg/L de cloranfenicol. De entre los

aislados obtenidos, se realizó un cribado para encontrar hongos que fueran beneficiosos al producir un aumento de producción de semilla en la planta (Tabla 1). Para realizar los ensayos del cribado, semillas de *Arabidopsis thaliana* accesión Col-0 esterilizadas superficialmente se sembraron en sustrato estéril (turba y vermiculita en proporción 3:1). Se

5 estratificaron a 4 °C durante 3 días y después se mantuvieron en cámara de crecimiento controlado a 23 °C. Las plantas se trataron a las 3 semanas de edad (con 4-6 hojas) aplicando un trozo de micelio de alguno de los aislados de 3 mm de diámetro sobre una hoja. El micelio se había obtenido subcultivando el micelio del hongo, obtenido de una planta de *Arabidopsis thaliana* silvestre sin síntomas de enfermedad, en placas PDA.

10

A las plantas control no se les aplicó ningún tratamiento y se dispusieron aleatoriamente entre las plantas tratadas. Al comenzar la dehiscencia de los escapos foliares, estos se cubrieron con bolsas de papel para recoger las semillas. Cuando las plantas se secaron, se recogieron las semillas y se pesaron. También se pesó el resto de la parte aérea de la

15 planta. De entre todos los analizados, seleccionamos el aislado CECT 20833 del género *Colletotrichum*, ya que las plantas tratadas con este aislado aumentaron significativamente ( $P < 0.04$ ) su producción de semilla, siendo el peso de las semillas de las plantas tratadas tres veces mayor que el de las plantas sin tratar (Tabla 1). El peso del resto de la planta no fue significativamente distinto ( $P > 0.05$ , Tabla 1).

20

TRATAMIENTO	Plantas control		Plantas tratadas	
	Peso de semillas por planta (mg)	Peso seco resto planta (mg)	Peso de semillas por planta (mg)	Peso seco resto planta (mg)
<i>Alternaria</i> sp.	28.0 ± 2.9 <sup>a</sup>	177.9 ± 12.1 <sup>a</sup>	21.6 ± 2.2 <sup>b</sup>	151.1 ± 5.8 <sup>b</sup>
<b><i>Colletotrichum</i> sp. CECT 20833</b>	<b>2.8 ± 1.1<sup>a</sup></b>	<b>85.1 ± 7.7</b>	<b>8.8 ± 1.7<sup>b</sup></b>	<b>90.7 ± 4.1</b>
<i>Plectosphaerella</i> sp.	30.3 ± 5.8	218.9 ± 17.2	27.8 ± 4.1	233.6 ± 12.1
<i>Trichoderma</i> sp.	14.9 ± 1.6	143.8 ± 10.1 <sup>a</sup>	16.5 ± 1.5	184.8 ± 11.6 <sup>b</sup>
<i>Trichoderma</i> sp.	15.2 ± 1.8	101.5 ± 11.7	16.2 ± 1.6	126.3 ± 10.2
<i>Ulocladium</i> sp.	20.3 ± 3.1	169.7 ± 10.4	19.6 ± 1.8	166.0 ± 7.2

Tabla 1. Pesos (media ± error estándar) de las semillas y peso seco del resto de la planta de las plantas tratadas o no con micelio según se describe en el Ejemplo 1. Diferentes letras

indican diferencias significativas entre las plantas tratadas y las plantas control ( $P < 0.05$ ) según un ANOVA. Las plantas tratadas con el aislado CECT 20833 del género *Colletotrichum* (en negrita) tuvieron un peso de semilla significativamente mayor que las plantas control, mientras que el peso seco del resto de la planta no fue significativamente mayor.

Ejemplo 2: Identificación de aislados de *Colletotrichum* sp. de plantas silvestres de *Arabidopsis thaliana* como *Colletotrichum tofieldiae*.

El aislado CECT 20833 del género *Colletotrichum* del cribado del Ejemplo 1 presentaba un micelio oscuro y conidias curvas hialinas en acervulos con cerdas oscuras. Otros aislados obtenidos de la misma manera, identificados como CECT 20834, CECT 20835, y CECT 20836, presentaban una morfología similar. Todos estos aislados se identificaron como *Colletotrichum tofieldiae* según la morfología y las secuencias de varios loci descritos en Damm y col. (Fungal Diversity 39 (2009) 45–87) que se compararon con secuencias de aislados tipo depositados en la base de datos accesible en <http://www.cbs.knaw.nl/Colletotrichum/>, albergada en la Oficina Central de Cultivos de Hongos (CBS, Centraalbureau voor Schimmelcultures).

La morfología de estos aislados coincide con la descrita en Damm y col. (Fungal Diversity 39 (2009) 45–87) para *C. tofieldiae*, añadiendo que el cultivo en medio PDA (agar dextrosa patata) o equivalente, o en papel de filtro o en hojas de *A. thaliana* produce colonias muy oscuras, que el micelio en cultivo se oscurece y endurece con el tiempo y que puede presentar estructuras engrosadas tipo clamidosporas y/o tipo microesclerocios.

Las similitudes de secuencia ( $n^\circ$  de nucleótidos idénticos/ $n^\circ$  de nucleótidos solapantes) de las secuencias comparadas entre los aislados CECT 20833, CECT 20834, CECT 20835 y CECT 20836 y los aislados tipo CBS 168.49, CBS 495. 85 y IMI 288810 de la Oficina Central de Cultivos de Hongos, utilizados en Damm y col. (Fungal Diversity 39 (2009) 45–87) para definir la especie *C. tofieldiae*, fueron superiores al 92%. Las secuencias comparadas fueron las de la subunidad 5.8S del ribosoma con las dos regiones flanqueantes espaciadoras (ITS, similitud  $> 95\%$ ), un intrón de 200-bp del gen de la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH, similitud  $>92\%$ ), una secuencia parcial del gen de la actina (ACT, similitud  $>99\%$ ), y el gen de la histona 3 (HIS3, similitud  $> 98\%$ ). Estas comparaciones se han realizado con la herramienta MycoID de alineamientos

pareados de secuencias albergada en la página web MycoBank ([www.mycobank.org](http://www.mycobank.org)) de la Asociación Internacional de Micología.

El conjunto de estas características define la especie o especies de *Colletotrichum* correspondiente al microorganismo de la presente invención.

Ejemplo 3: Aislados de *Colletotrichum tofieldiae* persistieron en plantas tratadas al menos dos meses post inoculación y se traslocaron o dispersaron a otros órganos diferentes de la hoja inoculada tales como raíz, corona, otras hojas y tallos.

10

Semillas de *Arabidopsis thaliana* accesión Col-0 esterilizadas superficialmente se sembraron en sustrato estéril (turba y vermiculita en proporción 3:1). Se estratificaron a 4 °C durante 3 días y después se mantuvieron en cámara de crecimiento controlado a 23 °C, en ciclo corto (10 horas diarias de luz). Las plantas se trataron a las 3 semanas de edad con los aislados CECT 20833, CECT 20834 y CECT 20835 de *Colletotrichum tofieldiae* mediante la aplicación en tres hojas de una gota de suspensión de esporas a 10<sup>6</sup> esporas/ml. Las plantas completas se recolectaron a los 60 días post inoculación (dpi).

15

Raíces, hojas de la roseta y tallos se separaron y cortaron en fragmentos de 25 mm<sup>2</sup> aproximadamente, se desinfectaron según se ha descrito previamente y se incubaron en cámara húmeda a temperatura ambiente. Después de una semana, *Colletotrichum tofieldiae* fue reaislado de al menos una muestra de todas las plantas inoculadas. El hongo se reaisló de hojas diferentes de las inoculadas, de la corona, de las raíces y del tallo (Tabla 2, Figura 1). No se observó crecimiento de *C. tofieldiae* en ninguna de las plantas control tratadas con agua destilada.

25

<u>Aislado</u>	<u>Porcentaje de reislamiento</u>				
	<u>Hojas</u>	<u>Tallo</u>	<u>Cuello</u>	<u>Raíz</u>	<u>Total</u> <sup>1</sup>
CECT 20833	80%	0%	67%	33%	100%
CECT 20834	100%	17%	50%	83%	100%
CECT 20835	100%	8%	75%	67%	100%

Tabla 2. Porcentaje de plantas de las que reaisló *C. tofieldiae* de órganos distintos a los inoculados (hojas, tallos, cuello o raíz) a los 60 días tras el tratamiento. <sup>1</sup> Porcentaje de plantas de las que se ha reaislado *C. tofieldiae* en al menos una muestra de un órgano no inoculado.

30

Ejemplo 4: El aislado CECT 20834 de *Colletotrichum tofieldiae* incrementó la producción de semillas y el peso de semillas por planta en plantas tratadas con micelio o esporas

5 Semillas de *Arabidopsis thaliana* accesión Col-0 esterilizadas superficialmente se sembraron en sustrato estéril (turba y vermiculita en proporción 3:1), se estratificaron a 4 °C durante 3 días y después se mantuvieron en cámara de crecimiento controlado a 23 °C. A las tres semanas de edad, se sometieron a alguno de los siguientes tratamientos a) Tratamiento con un trozo de micelio del aislado CECT 20834 de la misma forma que en el ejemplo 1; b) Aplicación de una suspensión de esporas del aislado CECT 20834 en agua destilada estéril  
10 a una concentración de  $10^6$  esporas/ml aplicada en spray sobre toda la planta y el sustrato debajo de la misma; c) Tratamiento control consistente en la aplicación de agua destilada estéril en spray sobre toda la planta y el sustrato debajo de la misma.

En el caso del tratamiento b, las esporas se obtuvieron resuspendiendo en agua destilada estéril las esporas obtenidas del cultivo del hongo en medio PDA. Las plantas sometidas a  
15 cada uno de los tratamientos se dispusieron de manera aleatorizada. Al comenzar la dehiscencia de los escapos foliares, estos se cubrieron con bolsas de papel para recoger las semillas. Cuando las plantas se secaron, se recogieron las semillas y se pesaron. También se pesó el resto de la parte aérea de la planta.

20 La producción de semilla por planta se midió como el peso de todas las semillas cosechadas de cada planta al final del ciclo. La producción de semilla de las plantas tratadas con CECT 20834 fue significativamente mayor que la de las plantas control ( $P < 0.001$ ), con un incremento de peso del 37% para las plantas tratadas con micelio y del 56% para las plantas  
25 tratadas con la suspensión de esporas en spray (Tabla 2). El incremento de la producción de semilla se debe en parte a la producción de semillas de mayor peso, ya que el peso de 100 semillas de las plantas tratadas con CECT 20834 mostró un incremento significativo ( $P < 0.06$ ) de hasta el 42% respecto a las plantas control. El peso seco del resto de la planta no fue significativamente distinto ( $P > 0.10$ ). El hongo se reaisló, a las 6 semanas tras el  
30 tratamiento, del 75% de las plantas inoculadas con micelio y del 100% de las plantas inoculadas con spray. Este ejemplo demuestra que la capacidad de incrementar la producción de semillas no es exclusiva del aislado CECT 20833, sino que se puede extender a otros aislados de *C. tofieldiae* y que el tratamiento con esporas da resultados similares al tratamiento con micelio.

35

TRATAMIENTO	Peso de semillas por planta (mg)*	Peso de 100 semillas por planta (mg)*	Peso seco de la planta sin semillas (mg)*
Spray con agua destilada	35.0 ± 3.6 <sup>a</sup>	1.17 ± 0.11 <sup>a</sup>	213.9 ± 12.0
Micelio	47.5 ± 3.7 <sup>b</sup> (37%)	1.66 ± 0.13 <sup>b</sup> (42%)	249.3 ± 15.3 (16%)
Spray con suspensión de esporas	56.1 ± 2.9 <sup>b</sup> (56%)	1.65 ± 0.19 <sup>b</sup> (41%)	239.6 ± 16.9 (12%)

Tabla 3. Pesos (media ± error estándar) de las semillas por planta y de 100 semillas por cada planta y peso seco del resto de la planta (planta sin semillas) de las plantas tratadas con micelio o suspensión de esporas del aislado CECT 20834 o spray de agua destilada según se describe en el Ejemplo 4. \*Diferentes letras muestran diferencias significativas según un ANOVA (P<0.001, para el peso de semillas por planta y P<0.06 para el peso de 100 semillas). No se encontraron diferencias significativas en el peso de la planta sin semilla (P>0.10). El incremento en porcentaje, comparando plantas tratadas y no tratadas, se indica entre paréntesis.

5 Ejemplo 5: Los aislados CECT 20835 y CECT 20836 de *Colletotrichum tofieldiae* incrementan la producción de semillas (peso de semilla por planta) en plantas tratadas con una suspensión de esporas aplicadas en spray. El incremento es proporcional a la persistencia del hongo en la planta.

15 Semillas de *Arabidopsis thaliana* accesión Col-0 esterilizadas superficialmente se sembraron en sustrato estéril (turba y vermiculita en proporción 3:1), se estratificaron a 4 °C durante 3 días y después se mantuvieron en cámara de crecimiento controlado a 23°C. A las tres semanas de edad, se sometieron a alguno de los siguientes tratamientos a) Aplicación de una suspensión de esporas del aislado CECT 20835 de *Colletotrichum* sp; b) Aplicación de  
 20 una suspensión de esporas del aislado CECT 20836 de *Colletotrichum* sp; c) Tratamiento control consistente en la aplicación de agua destilada estéril. Todos los tratamientos se aplicaron en spray por toda la planta y el suelo debajo de la misma.

El inóculo de los tratamientos a, b y c procede de suspensiones esporales mantenidas en glicerol al 30% a -80°C y diluidas en agua destilada estéril a una concentración de 10<sup>6</sup>  
 25 esporas/ml. Tras la aplicación del tratamiento, las plantas se mantuvieron a 25 °C, ciclo corto. A las dos semanas tras el tratamiento, el hongo se reisoló del 17% de las plantas

inoculadas con CECT 20835, del 20% de las plantas inoculadas con CECT 20836 y de ninguna planta tratada sólo con agua. A las seis semanas tras el tratamiento, el hongo se reaisló del 60% de las plantas tratadas con CECT 20835 y de ninguna de las plantas tratadas con CECT 20836 o sólo agua. Al comenzar la dehiscencia de los escapos foliares, estos se cubrieron con bolsas de papel para recoger las semillas. Cuando las plantas se secaron, se recogieron las semillas y se pesaron. También se pesó el resto de la parte aérea de la planta.

La producción de semilla por planta se midió como el peso de todas las semillas cosechadas de cada planta al final del ciclo. El ANOVA de los pesos de las semillas indica diferencias significativas en el peso medio de semillas por planta entre plantas sometidas a los distintos tratamientos ( $P < 0.0001$ , Tabla 4): Las plantas tratadas con CECT 20835 tuvieron el mayor peso medio de semillas por planta, con un incremento del 550% respecto a las plantas tratadas con sólo agua y las plantas tratadas con CECT 20836 tuvieron un incremento del peso medio de semillas del 400% respecto a las plantas tratadas sólo con agua. No se encontraron diferencias significativas en el peso de la planta sin semilla ( $P > 0.10$ ). Este ejemplo muestra que el efecto de aplicar *Colletotrichum tofieldiae* puede ser proporcional a la persistencia del hongo en la planta.

20

TRATAMIENTO	Peso de semillas por planta (mg)*	Peso seco de la planta sin semillas (mg)
Spray con agua destilada	$5.7 \pm 2.7^a$	$273.6 \pm 14.9$
Spray con suspensión de esporas de CECT 20835	$38.7 \pm 2.5^b$ (550%)	$266.2 \pm 20.7$
Spray con suspensión de esporas de CECT 20836	$30. \pm 2.7^c$ (400%)	$232.9 \pm 15.5$

Tabla 4. Pesos (media  $\pm$  error estándar) de las semillas por planta y peso seco del resto de la planta de las plantas (planta sin semillas) tratadas según se describe en el Ejemplo 5. \* Diferentes letras muestran diferencias significativas según un ANOVA entre los distintos tratamientos ( $P < 0.0001$ ). El peso del resto de la planta no fue significativamente distinto entre los distintos tratamientos ( $P > 0.10$ ). El incremento en porcentaje, comparado entre plantas tratadas con los distintos aislados y las plantas control, se indica entre paréntesis.

25

Ejemplo 6: *Colletotrichum tofieldiae* incrementó el número de frutos de las plantas tratadas con una suspensión de esporas tanto en plantas sembradas en sustrato estéril como en plantas sembradas en sustrato no estéril.

5 Semillas de *Arabidopsis thaliana* accesión Col-0 esterilizadas superficialmente se sembraron en sustrato estéril y no estéril (turba y vermiculita en proporción 3:1). Se estratificaron a 4 °C durante 3 días y después se mantuvieron en cámara de crecimiento controlado a 23°C. A las tres semanas de edad, se sometieron a alguno de los siguientes tratamientos a) Aplicación de una suspensión de esporas del aislado CECT 20833 de *C. tofieldiae*; b) aplicación de una  
 10 suspensión de esporas del aislado CECT 20835 de *C. tofieldiae*; c) aplicación de agua destilada estéril. Todos los tratamientos se aplicaron en spray por toda la planta. El inóculo de los tratamientos a y b procede de suspensiones esporales mantenidas en glicerol al 30% a -80°C, lavadas y diluidas en agua destilada estéril a una concentración de 10<sup>6</sup> esporas/ml. Las plantas se distribuyeron al azar. El número de frutos por planta se contó en el momento  
 15 del inicio de la apertura de las silicuas. Los resultados se muestran en la Tabla 5. Las plantas tratadas con los aislados CECT 20833 y CECT 20835 de *C. tofieldiae* presentaron un incremento significativo de frutos de hasta un 39%. Este experimento demuestra que el incremento en la producción de semillas se debe en parte a la producción de un mayor número de frutos por planta. Este experimento demuestra que el efecto del hongo se  
 20 mantiene en plantas sobre sustrato no estéril.

	Nº de frutos*	
	Sustrato estéril	Sustrato no estéril
Spray con agua destilada	53.3 ± 6.5 <sup>a</sup>	11.3 ± 0.7 <sup>a</sup>
<i>C. tofieldiae</i> CECT 20833	73.9 ± 7.0 <sup>b</sup> (39%)	14.7 ± 1.4 <sup>b</sup> (31%)
<i>C. tofieldiae</i> CECT 20835	60.4 ± 5.8 <sup>b</sup> (13%)	14.3 ± 0.8 <sup>b</sup> (27%)

Tabla 5. Número de frutos (media ± error estándar) por planta tratadas con una suspensión de esporas de diferentes aislados de *C. tofieldiae* según se describe en el Ejemplo 6. \*Letras distintas indican diferencias significativas en un ANOVA (P<0.08 para el sustrato estéril y  
 25 P<0.04 para el sustrato no estéril). El incremento en porcentaje, comparado entre plantas tratadas y no tratadas, se indica entre paréntesis.

Ejemplo 7: *Colletotrichum tofieldiae* incrementó el número de frutos de las plantas sembradas en sustratos (estéril o no estéril) tratados con una suspensión de esporas.

Semillas de *Arabidopsis thaliana* accesión Col-0 esterilizadas superficialmente se sembraron en sustrato estéril y no estéril (turba y vermiculita en proporción 3:1). Se estratificaron a 4 °C durante 3 días y después se mantuvieron en cámara de crecimiento controlado a 23°C.

5 Cuando las plantas tenían tres semanas de edad se depositaron en el sustrato, al lado de la planta, 200 µl por planta de a) una suspensión de esporas del aislado CECT 20833 de *C. tofieldiae*; b) una suspensión de esporas del aislado CECT 20835 de *C. tofieldiae*; c) agua destilada estéril. El inóculo de los tratamientos a y b procede de suspensiones esporales mantenidas en glicerol al 30% a -80°C lavadas y diluidas en agua destilada estéril a una  
 10 concentración de 10<sup>6</sup> esporas/ml. Las plantas se distribuyeron al azar. El número de frutos por planta se contó en el momento del inicio de la apertura de las silicuas. Los resultados se muestran en la Tabla 6. Las plantas tratadas con los aislados CECT 20833 y CECT 20835 de *C. tofieldiae* presentan un incremento de frutos de hasta un 27%.

	Nº de frutos*	
	Sustrato estéril	Sustrato no estéril
Spray con agua destilada	53.8 ± 6.0	16.6 ± 1.5
<i>C. tofieldiae</i> CECT 20833	64.8 ± 7.0 (20%)	17.9 ± 1.5 (8%)
<i>C. tofieldiae</i> CECT 20835	68.4 ± 7.3 (27%)	17.6 ± 5.1 (6%)

15 Tabla 5. Número de frutos (media ± error estándar) por planta tratadas con una suspensión de esporas de diferentes aislados de *Colletotrichum* aplicada directamente en el sustrato según se describe en el Ejemplo 7. \* El incremento en porcentaje, comparado entre plantas tratadas y no tratadas, se indica entre paréntesis.

### REIVINDICACIONES

1. Método para incrementar la producción de flores, semillas y/o frutos en una planta, caracterizado por que comprende la etapa de poner en contacto dicha planta con una composición que comprende el microorganismo *Colletotrichum tofieldiae* y/o extractos de dicho microorganismo y/o filtrados de dicho microorganismo.  
5
2. Método según la reivindicación 1, caracterizado por que dicho microorganismo es una cepa de *Colletotrichum tofieldiae* depositada con el número de depósito CECT 20833, CECT 20834, CECT 20835 o CECT 20836.
3. Método según una de las reivindicaciones 1 ó 2, caracterizado por que dicho microorganismo está en forma de esporas, hifas, micelio o esclerocios.  
10
4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que dicha composición se aplica a las semillas de dicha planta.
5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que dicha composición se aplica a las partes aéreas de dicha planta.
6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que dicha composición se aplica a las raíces de dicha planta o a otras partes subterráneas de dicha planta.  
15
7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que dicha composición se aplica al sustrato para el cultivo de dicha planta.
8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado por que dicha composición comprende minerales, materiales orgánicos, compuestos orgánicos, compuestos inorgánicos, diluyentes líquidos, alcoholes, cetonas, aceites vegetales, hidrocarburos alifáticos, ésteres, dimetil sulfóxido, acetonitrilo, agua, surfactantes aniónicos, surfactantes no iónicos, surfactantes catiónicos, polímeros hidrosolubles, polisacáridos, preservantes, agentes colorantes, y/o agentes estabilizadores.  
20
9. Método según la reivindicación 8, caracterizado por que dichos minerales están seleccionados del grupo compuesto por arcillas, bentonita, calcita y diatomeas, dichos materiales orgánicos están seleccionados del grupo compuesto por polvo de maíz o polvo de piel de nuez, dicho compuesto orgánico es urea, dichos compuestos inorgánicos están seleccionados del grupo compuesto por carbonato cálcico, sulfato amónico, óxido de silicón, silicato de aluminio y magnesio, dichos diluyentes líquidos están seleccionados del grupo compuesto por hidrocarburos aromáticos, hidrocarburos alifáticos, alcoholes, cetonas, aceites vegetales, ésteres, dimetil sulfóxido, acetonitrilo y agua, dichos surfactantes aniónicos están seleccionados del grupo compuesto por sales de ésteres de alquil sulfato, sales de alquilaril sulfonato, sales de dialkil sulfosuccinato, sales de ésteres de éter fosfato de alquilaril de polioxietileno, sales de lignosulfonato y  
25  
30  
35

- policondensados de formaldehído, dichos surfactantes no iónicos están seleccionados del grupo compuesto por éteres de alquil aril polioxietileno, bloques de copolímeros de alkilpolioxipropileno, polioxietileno y ésteres de ácidos grasos, dichos surfactantes catiónicos son sales de alkil trimetilamonio, dichos polímeros hidrosolubles son alcohol de polivinilo o polivinilpirrolidona, dichos polisacáridos están seleccionados del grupo compuesto por agar, goma arábica, ácido alginico, sales de ácido algínico, carboxi metil celulosa y goma xantano y dichos agentes estabilizadores son ácido isopropil fosfato o BHT.
- 5
10. Método según la reivindicación 9, caracterizado por que dichos hidrocarburos aromáticos están seleccionados del grupo compuesto por xileno, alkil benceno, metil naftaleno, dichos alcoholes están seleccionados del grupo compuesto por 2-5 propanol, etilenglicol, glicol propileno y éter mono etil etilen glicol, dichas cetonas están seleccionadas del grupo compuesto por acetona, ciclohexanona e isoforona y dichos aceites vegetales son aceite de soja o aceite de algodón.
- 10
11. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, caracterizado por que dicha composición comprende sales de fertilización, fertilizantes, insecticidas, nematocidas, fungicidas, bactericidas y/o herbicidas.
- 15
12. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, caracterizado por que dicha composición es un líquido, un sólido, una pasta o un gel.
- 20
13. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, caracterizado por que dicha composición es un polvo, pastilla, comprimido, granulado o concentrado emulsionable.
14. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, caracterizado por que dicha composición se aplica por spray, pulverización, inmersión, irrigación o espolvoreado.
15. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, caracterizado por que dicha planta está seleccionada del grupo compuesto por gimnospermas, monocotiledóneas y dicotiledóneas.
- 25
16. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, caracterizado por que dicha planta es una planta de la familia *Brassicaceae*.
17. Material de propagación de una planta que comprende una cepa de *Colletotrichum tofieldiae* depositada con el número de depósito CECT 20833, CECT 20834, CECT 20835 o CECT 20836 y/o extractos de dicha cepa y/o filtrados de dicha cepa.
- 30
18. Material de propagación según la reivindicación 17, que está seleccionado del grupo compuesto por semillas, plántulas, plantas jóvenes, esquejes, bulbos y tubérculos.
19. Sustrato para el cultivo de plantas que comprende el microorganismo *Colletotrichum tofieldiae* y/o extractos de dicho microorganismo y/o filtrados de dicho microorganismo.
- 35

20. Cepa del microorganismo *Colletotrichum tofieldiae*, depositada con el número de depósito CECT 20833, CECT 20834, CECT 20835 o CECT 20836.

21. Uso del microorganismo *Colletotrichum tofieldiae* y/o extractos de dicho microorganismo y/o medios de filtrado de dicho microorganismo para incrementar la producción de flores, semillas y/o frutos en una planta.

5

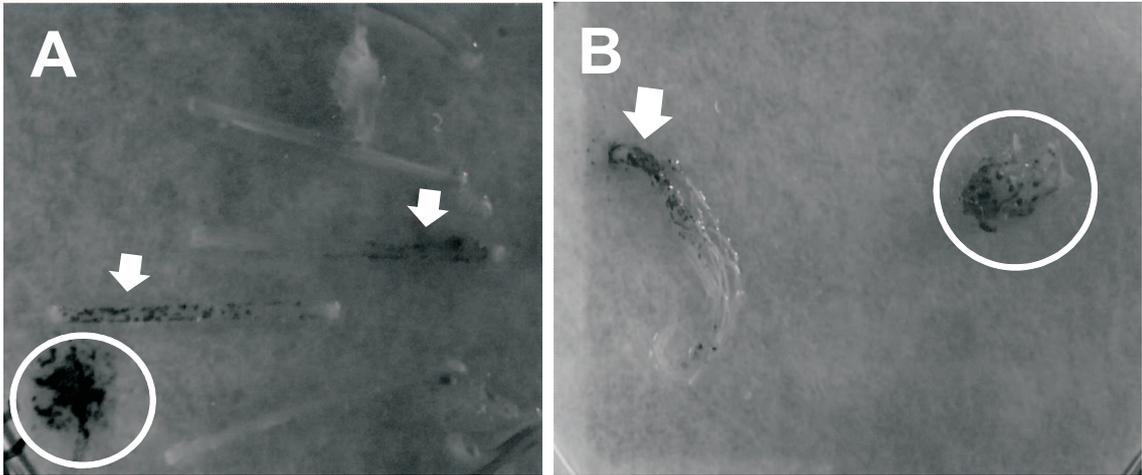


FIG. 1



②① N.º solicitud: 201331839

②② Fecha de presentación de la solicitud: 17.12.2013

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	DAMM U et al. Colletotrichum species with curved conidia from herbaceous hosts. <i>Fungal Diversity</i> . 2009 VOL: 39 Págs: 45-87 ISSN 1560-2745 (print) ISSN 1878-9129 (electronic), página 51.	17,18
A	EP 0485229 A1 (SHELL INT RESEARCH) 13.05.1992, reivindicaciones.	1-21
A	WO 9929177 A1 (MAX PLANCK GESELLSCHAFT et al.) 17.06.1999, reivindicaciones.	1-21
A	VAINGANKAR J D et al. Screening for efficient AM (arbuscular mycorrhizal) fungal bioinoculants for two commercially important ornamental flowering plant species of Asteraceae. <i>Biological Agriculture &amp; Horticulture</i> . 2012. VOL: 28 No: 3 Págs: 167-176 ISSN 0144-8765 (print) ISSN 2165-0616 (electronic) Doi: doi:10.1080/01448765.2012.727541, resumen.	1-21

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

**El presente informe ha sido realizado**

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones n.º:

Fecha de realización del informe  
09.01.2014

Examinador  
I. Rueda Molíns

Página  
1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

**C12N1/14** (2006.01)  
**A01H3/00** (2006.01)  
**C12R1/665** (2006.01)

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

C12N, A01H, C12R

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

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 09.01.2014

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-21	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-16, 19-21	<b>SI</b>
	Reivindicaciones 17, 18	<b>NO</b>

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

**Base de la Opinión.-**

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

**1. Documentos considerados.-**

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

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	DAMM U et al. <i>Colletotrichum</i> species with curved conidia from herbaceous hosts . <i>Fungal Diversity</i> . VOL: 39 Págs: 45-87 ISSN 1560-2745 (print) ISSN 1878-9129 (electronic)	2009
D02	EP 0485229 A1 (SHELL INT RESEARCH)	1992
D03	WO 9929177 A1 (MAX PLANCK GESELLSCHAFT et al.)	1999
D04	VAINGANKAR J D et al. Screening for efficient AM (arbuscular mycorrhizal) fungal bioinoculants for two commercially important ornamental flowering plant species of Asteraceae. <i>Biological Agriculture &amp; Horticulture</i> . VOL: 28 No: 3 Págs: 167-176 ISSN 0144-8765 (print) ISSN 2165-0616 (electronic) Doi: doi:10.1080/01448765.2012.727541	2011

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

**NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA (artículos 6 y 8 de la LP11/1986)**

En las reivindicaciones 1-16, de la solicitud de patente se reivindica un método para incrementar la producción de flores, semillas y/o frutos en una planta, caracterizado por que comprende la etapa de poner en contacto dicha planta con una composición que comprende el microorganismo *Colletotrichum tofieldiae* y/o extractos de dicho microorganismo y/o filtrados de dicho microorganismo.

En las reivindicaciones 17 y 18 se reivindica el material de propagación de una planta que comprende el microorganismo *Colletotrichum tofieldiae* y/o extractos de dicho microorganismo y/o filtrados de dicho microorganismo.

En la reivindicación 19 se reivindica un sustrato para el cultivo de plantas que comprende el microorganismo *Colletotrichum tofieldiae* y/o extractos de dicho microorganismo.

En la reivindicación 20 se reivindican diferentes cepas del microorganismo *Colletotrichum tofieldiae* depositadas con números de depósito específicos.

En la reivindicación 21 se reivindica el uso del microorganismo *Colletotrichum tofieldiae* y/o extractos de dicho microorganismo y/o medios de filtrado de dicho microorganismo para incrementar la producción de flores, semillas y/o frutos en una planta.

El documento D01 muestra un estudio de diferentes especies pertenecientes al género *Colletotrichum*. En la tabla 1, de la página 51, se muestra como *Colletotrichum tofieldiae* se encuentra asociado con las especies vegetales *Tofieldia calyculata* y *Lupinus polyphyllus*. Por ello, las reivindicaciones 17 y 18 de la solicitud de patente, que reivindican el material de propagación de una planta que comprende el microorganismo *Colletotrichum tofieldiae*, presentan novedad, pero no actividad inventiva, según lo establecido en los artículos 6 y 8 de la LP11/1986.

Los documentos D02, D03 y D04 reflejan el uso de diferentes especies de hongos para modificar patrones de desarrollo en determinadas especies vegetales.