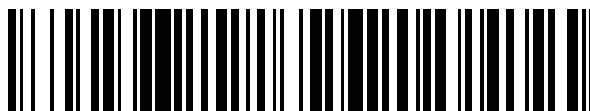


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 776 162**

51 Int. Cl.:

A01N 63/04 (2006.01)

C12N 1/14 (2006.01)

A01H 3/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.12.2014** **PCT/ES2014/070930**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.06.2015** **WO15092104**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.12.2014** **E 14835701 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.02.2020** **EP 3085233**

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

30 Prioridad:

17.12.2013 ES 201331839

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
29.07.2020

73 Titular/es:

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID (50.0%)
C/ Ramiro de Maeztu 7
28040 Madrid, ES y
PLANT RESPONSE BIOTECH, S.L. (50.0%)

72 Inventor/es:

RAMÍREZ ZAPATA, DIANA;
SACRISTÁN BENAYAS, MARÍA SOLEDAD;
CUEVA GONZALEZ, EVELIN ELIZETH;
ALONSO GONZALEZ, ANGELA;
BORJA Y TOME, MARISE;
ANTÓN RODRÍGUEZ, DIEGO y
PÉREZ JIMÉNEZ, ROSA MARÍA

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 776 162 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método para aumentar la producción de flores, semillas y/o frutas en una planta.

5 Campo de la Invención

El campo de la presente invención es el sector de la agronomía, en particular, los métodos para aumentar la producción de flores, semillas y/o frutas usando el microorganismo *Colletotrichum tofieldiae*.

10 Antecedentes de la Invención

Las plantas en la naturaleza forman asociaciones simbióticas con microorganismos llamados mutualistas que le confieren beneficios en su crecimiento, supervivencia y multiplicación. Estos microorganismos pueden aislarse, y sus propiedades beneficiosas usarse en cultivos para mejorar el rendimiento.

15

Género *Colletotrichum* (Ascomycota, teleomorfo Glomerella) comprende más de 60 especies y complejos de especies. Morfológicamente se caracteriza por tener típicamente acervuli conidioma, que puede tener cerdas o no, con conidios hialinos unicelulares que pueden ser rectos o curvos, con un tamaño preferiblemente mayor de 12 µ, típicamente granular. Los conidios también pueden formarse a partir del micelio u otros conidios (conidios microcíclicos). Los conidios forman apresorios cuando germinan. Algunas especies forman estroma o esclerocios.

20

25

Género *Colletotrichum* comprende especies que son patógenos importantes de los cultivos y, por lo tanto, son las especies más conocidas y mejor estudiadas. Sin embargo, hay muchas especies dentro del género que han sido citadas como endófitas o epífitas que no causan daño a la planta huésped (llamadas comensales) o que incluso pueden ser beneficiosas para la planta (mutualista). Hyde y otros. (Diversidad fúngica 39 (2009) 147-182) presentan una descripción completa de todas las especies del género *Colletotrichum* actualmente conocido, con la lista de huéspedes de estas especies citada en la literatura y especificando el tipo de interacciones establecidas con cada huésped (patógena, comensal o mutualista). La evidencia citada en esta publicación indica que, dentro de las especies o complejos de especies considerados patógenos, pueden existir cepas asintomáticas. También hay casos de cepas que pueden comportarse como patógenas, comensales o mutualistas dependiendo del huésped en el que se inoculan. Un ejemplo de este caso es *C. orbiculare*, que se comporta como un patógeno en las cucurbitáceas, pero puede comportarse como mutualista en el tomate, lo que confiere resistencia a los patógenos y la sequía y promueve el crecimiento vegetativo de las plantas cuando se inocula a través de la raíz.

30

35

Descripción de la invención

Una modalidad preferente de la presente invención es un método para aumentar la producción de flores, semillas y/o frutas en una planta, caracterizado porque 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.

40

En adelante, el término "microorganismo de la invención" se refiere al microorganismo de la especie *Colletotrichum tofieldiae*.

45

El aumento de la producción de flores, semillas y/o frutas en una planta tratada de acuerdo con el método de la invención se entiende como el aumento del número, tamaño y/o peso de flores, semillas y/o frutas de esa planta contra una planta que no ha sido tratado de acuerdo con el método de la invención.

50

La especie *Colletotrichum tofieldiae* se describe en Damm y otros. (Diversidad fúngica 39 (2009) 45-87). Esta especie se caracteriza por conidios curvos y acervuli con cerdas que pueden ser de color marrón oscuro o negro. Los conidios y cerdas pueden formarse directamente en las hifas. Las esporas germinan para formar apresorios de diferente morfología y coloración. La definición de la especie también se debe a las características moleculares con respecto a las secuencias de la subunidad ribosómica 5.8S con las dos regiones flanqueantes espaciadoras (ITS), un intrón de 200 pb 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 aislamientos estándar usados para describir la especie *C. tofieldiae* viene de *Tofieldia* spp. (monocotiledóneas), *Lupinus polyphyllus* y *Dianthus* sp. (ambos dicotiledóneas), por lo que esta especie puede colonizar diferentes especies de huéspedes tanto mono como dicotiledóneas. *C. tofieldiae* no ha sido citado como patógeno o mutualista de ningún huésped.

55

60

En la presente invención, un nuevo *Colletotrichum tofieldiae* Se ha aislado, identificado y caracterizado aislamientos que sorprendentemente tienen la capacidad de aumentar significativamente la producción de flores, semillas y/o frutas en las plantas. Los aislamientos de otras especies de hongos de la misma área no mostraron esta capacidad. Las plantas aumentan 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 induzca el aumento de producción identificado. La presente invención muestra que el microorganismo *C. tofieldiae* se transloca o dispersa a los diversos órganos de la planta tratada, y puede permanecer allí al menos cuatro meses después del tratamiento. Esta característica

65

hace que el efecto del microorganismo en la planta sea más duradero, que dure durante el ciclo de la planta y mejore el rendimiento al final de la misma. Esta característica hace que este microorganismo sea más efectivo que otros microorganismos usados para fines similares.

5 El método de la invención mejora la producción de flores, frutas y semillas en una proporción mayor que el aumento del crecimiento vegetativo de la planta. Es decir, la planta usa los recursos de manera más eficiente, produciendo flores, frutas y semillas más y/o más grandes en relación con el tamaño general de la planta. Es la primera vez que esta característica se describe en cepas de *Colletotrichum tofieldiae* de la invención. Este es un fenómeno general para la especie *Colletotrichum tofieldiae* porque se han obtenido efectos similares con diferentes cepas de esta especie.

10 El método de la invención produce un aumento en el tamaño y/o peso y/o número de flores y/o frutas y/o semillas que también pueden deberse a la mejor salud o viabilidad del cultivo (por ejemplo, debido a la reducción en la aplicación de riego, fertilizantes y/o pesticidas, mayor resistencia sistémica o mayor resistencia a los herbicidas) y/o al aumento de la germinación de semillas y/o características de biocontrol, tal como una disminución de las enfermedades debido a la disminución de la sensibilidad a los patógenos y/o la mejora de infecciones previas.

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

- un aumento en el rendimiento general de la planta;
- un aumento en la calidad del material de la planta;
- 20 – un aumento en el número y/o tamaño de las flores;
- un aumento en el número, tamaño y/o peso de las frutas;
- un aumento en el número, tamaño y/o peso de las semillas.

25 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 aumento tal como un aumento en el número de partes cosechables y/o un aumento en la ganancia de peso y/o un aumento en el contenido de sustancias de almacenamiento, metabolitos interesantes, etcétera. Un aumento en el rendimiento de la planta significa que las partes cosechables de la planta son al menos 2 %, preferiblemente al menos 25 %, más preferiblemente 70 % y particularmente preferente al menos 500 % más 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 con la invención en comparación con las plantas no tratadas.

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

35 En el método de la invención, una planta se pone en contacto con una composición que comprende el microorganismo *Colletotrichum tofieldiae*, el medio de cultivo o el filtrado de acuerdo con la invención. La composición se puede aplicar en toda la planta o en cualquier parte de la misma, como en las hojas, en los brotes, en las flores, en los frutos, en las mazorcas, en las semillas, en los bulbos, en los tubérculos, en las raíces y en plántulas. La aplicación de la composición a la planta se puede realizar en cualquier etapa y, por ejemplo, se puede aplicar a la semilla antes de plantar, al plantar, después de plantar y antes o después de la emergencia, durante el período de crecimiento y durante el cultivo en el semillero, o en el momento del trasplante de las plántulas, o en el momento del corte o enraizamiento de esquejes, o en el momento del crecimiento en una plantación, o incluso en el período reproductivo antes de la floración o durante la floración o durante el proceso de maduración de los frutos.

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

Otra modalidad es el método de la invención, en el que dicha composición se aplica a las partes aéreas de dicha planta.

45 Otra modalidad es el método de la invención, en el que dicha composición se aplica a las raíces de dicha planta o a otras partes subterráneas de dicha planta.

50 El método de la invención incluye el tratamiento por atomización o pulverización sobre plantas completas o cualquier parte de las mismas de una dilución apropiada de la composición según la invención o inmersión de plantas enteras o cualquier parte de las mismas en dicha dilución. El método de la invención también incluye el tratamiento por empolvado en seco de plantas enteras o cualquier parte de las mismas de una composición de acuerdo con la invención. El método de la invención incluye la granulación o el revestimiento de semillas con una película delgada de una composición de acuerdo con la invención. La composición según la invención también se puede mezclar con el fluido de riego. El método de la invención también incluye el tratamiento mediante fragmentos de agar con micelio que se ponen en contacto con una parte de la planta, ya sea raíz, tallo u hojas, o incluso en la superficie del suelo cerca de las raíces del cultivo.

- En la presente especificación, "filtrado" significa 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 se puede preparar cultivando primero el microorganismo de la invención en un medio de cultivo líquido y luego separando el medio de cultivo líquido del microorganismo de la invención. La separación se puede llevar a cabo mediante diferentes métodos conocidos por el experto 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 aproximadamente 80 °C durante 30 minutos y luego eliminar el material fúngico por centrifugación.
- 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 que tiene un tamaño de poro de no más de 0,2 µm. La etapa de filtración permite la extracción de sustancialmente todas las hifas del microorganismo de la invención, más preferiblemente la filtración también eliminaría las esporas y aún más preferiblemente esto debería eliminar cualquier material fúngico.
- La presente invención también está relacionada con 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 modalidad es el método de la invención, en donde dicho microorganismo es una cepa *Colletotrichum tofieldiae* depositada bajo los números de depósito CECT 20833, CECT 20834, CECT 20835 o CECT 20836.
- Las cepas *Colletotrichum tofieldiae* se han depositado 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 depositaria internacional Spanish Type Culture Collection (CECT) con domicilio en Parc Científic Universitat de València, Catedrático Agustín Escardino, 9. 46980, Paterna, (Valencia), España, por la Universidad Politécnica de Madrid, con domicilio en c/ Ramiro de Maeztu, 7, 28040 Madrid, España.
- El microorganismo de la invención puede cultivarse en una amplia variedad de sustratos naturales o sintéticos. Por ejemplo, puede cultivarse en diferentes tipos de medios de cultivo sólidos o líquidos, como los medios de Papa/Dextrosa/Agar (PDA) o Caldo (PDB), y puede propagarse mediante técnicas conocidas por los expertos. También puede crecer en varias fuentes naturales, como hojas de varias plantas, granos de polen, harina de avena, papa, zanahoria y celulosa. También puede crecer en fuentes artificiales como papel o cartulina y polímeros.
- El medio de cultivo puede agitarse constantemente durante el cultivo, por ejemplo con aproximadamente 1 rps. Además, la temperatura de cultivo se puede establecer en el rango entre 20 y 30 °C.
- Otra modalidad es el método de la invención, en donde dicho microorganismo está en forma de esporas, hifas, micelio o esclerocios.
- Otra modalidad es el método de la invención, en donde dicha composición se aplica al sustrato para el cultivo de dicha planta.
- El sustrato se trata preferiblemente de modo que el microorganismo de la invención se cultive en él antes de que el sustrato se use para el cultivo de plantas. Los ejemplos de tratamiento del sustrato incluyen la perfusión de un líquido en el sustrato (por riego, inyección o goteo), pulverización, polvo o mezcla directa con el sustrato. El método de la invención también comprende el tratamiento de un medio hidropónico para cultivo hidropónico. El método de la invención comprende el tratamiento del sustrato o medio hidropónico con una composición que comprende la concentración apropiada de micelio y/o esporas y/o cualquier otra parte del microorganismo de la invención, el medio de cultivo o el filtrado de acuerdo con la invención en forma líquida y/o sólida como gránulos o en forma de polvo.
- El método de la invención puede llevarse a cabo con una composición que incluye el microorganismo de la invención solo o formulado con ingredientes inertes. Los ejemplos de ingredientes inertes incluyen polvos finos o gránulos como minerales, como arcillas, bentonita, calcita, diatomáceas y materiales orgánicos como polvo de maíz o polvo de piel de nuez, materiales orgánicos sintéticos como urea, sales como carbonato de calcio y sulfato de amonio, materiales inorgánicos sintéticos como el óxido de silicio; o diluyentes líquidos tales como hidrocarburos aromáticos como xileno, alquilbenceno, metil naftaleno, alcoholes tales como 2-5 propanol, etilenglicol, propilenglicol y etilenglicol monoetil éter, cetonas tales como acetona, ciclohexanona e isoforona, aceites vegetales tales como aceite de soja o aceite de semilla de algodón, hidrocarburos alifáticos derivados del petróleo, ésteres, dimetilsulfóxido, acetonitrilo y agua. Los ejemplos de tensioactivos incluyen tensioactivos aniónicos tales como sales de ésteres de alquil sulfato, sales de alquil aril sulfonato, sales de dialquil sulfosuccinato, sales de polioxietilén alquil aril fosfato éter, sales de lignosulfonato y policondensados de formaldehído y tensioactivos no iónicos tales como polioxietilén alquil aril éteres, copolímeros de alquil polioxipropileno, ésteres de polioxietileno y ácidos grasos y tensioactivos catiónicos tales como sales de alquil trimetilamonio. Los ejemplos de otros agentes auxiliares de la formulación incluyen polímeros solubles en agua como el alcohol polivinílico o polivinilpirrolidona, polisacáridos tales como agar, acacia, ácido algínico y sus sales, carboximetilcelulosa, goma xantana, materiales inorgánicos tales como silicato de aluminio y magnesio, conservantes, agentes colorantes, estabilizadores como el fosfato de ácido isopropílico y BHT.

Por lo tanto, otra modalidad es el método de la invención, en donde dicha composición comprende minerales, materiales orgánicos, compuestos orgánicos, compuestos inorgánicos, diluyentes líquidos, alcoholes, cetonas, aceites vegetales, hidrocarburos alifáticos, ésteres, dimetilsulfóxido, acetonitrilo, agua, tensioactivos aniónicos, tensioactivos no iónicos, tensioactivos catiónicos, polímeros solubles en agua, polisacáridos, conservantes, agentes colorantes y/o estabilizadores.

5 En particular, dichos minerales se seleccionan del grupo que consiste en arcillas, bentonita, calcita y diatomeas, dichos materiales orgánicos se seleccionan del grupo que consiste en polvo de maíz o polvo de piel de nuez, dicho compuesto orgánico es urea, dichos compuestos inorgánicos se seleccionan del grupo que consisten en carbonato de calcio, sulfato de amonio, óxido de silicio, silicato de aluminio y magnesio, dichos diluyentes líquidos se seleccionan del grupo que consiste en hidrocarburos aromáticos, hidrocarburos alifáticos, alcoholes, cetonas, aceites vegetales, ésteres, sulfóxido

10 de dimetilo, acetonitrilo y agua, dichos tensioactivos aniónicos se seleccionan del grupo que consiste en sales de ésteres de alquil sulfato, sales de alquil aril sulfonato, sales de dialquil sulfosuccinato, sales de éster de éter de polioxietilen alquil aril fosfato, sales de lignosulfonato y policondensados de formaldehído, dichos tensioactivos no iónicos se seleccionan del grupo que consiste en polioxietilen alquil aril éteres, copolímero de bloques de alquilpolioxipropileno, polioxietileno y ésteres de ácidos grasos, dichos tensioactivos catiónicos son sales de alquil trimetilamonio, dichos polímeros solubles en

15 agua son alcohol polivinílico o polivinilpirrolidona, dichos polisacáridos se seleccionan del grupo que consiste en agar, acacia, ácido algínico, sales de ácido algínico, carboximetil celulosa y goma de xantana y dichos estabilizadores son fosfato de ácido isopropílico o BHT. Particularmente, dichos hidrocarburos aromáticos se seleccionan del grupo que consiste en xileno, alquilbenceno, metil naftaleno, dichos alcoholes se seleccionan del grupo que consiste en 2-5 propanol, etilenglicol, propilenglicol y etilenglicol mono etil éter, se seleccionan dichas cetonas del grupo que consiste en acetona, ciclohexanona e isoforona y dichos aceites vegetales son aceite de soja o aceite de semilla de algodón.

Otra modalidad es el método de la invención, en donde dicha composición comprende sales de fertiriego, fertilizantes, insecticidas, nematocidas, fungicidas, bactericidas y/o herbicidas.

25 Otra modalidad es el método de la invención, en donde dicha composición es un líquido, un sólido, una pasta o un gel.

Otra modalidad es el método de la invención, en donde dicha composición es un polvo, píldora, tableta, granulado o concentrado emulsionable.

30 Otra modalidad es el método de la invención, en donde dicha composición se aplica por atomización, pulverización, inmersión, riego o empolvado.

Otra modalidad es el método de la invención, en donde dicha planta se selecciona del grupo que consiste en gimnospermas, monocotiledóneas y dicotiledóneas. Particularmente, dicha planta es una planta de la familia *Brassicaceae*.

35

Otra modalidad es el método de la invención, en donde dicha planta es una planta monocotiledónea.

Otra modalidad es el método de la invención, en donde dicha planta es una planta de cebada (*Hordeum vulgare*).

40

Otra modalidad es el método de la invención, en donde dicha planta es una planta de maíz (*Zea mays*).

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

45 El método de la invención puede llevarse a cabo con todas las plantas y células posibles o tejidos derivados de tales plantas. En particular, se puede llevar a cabo con todas las Gimnospermas y Angiospermas (monocotiledóneas o dicotiledóneas) o material vegetal derivado de dichas plantas, incluidos árboles, arbustos, hierbas y pasto. Preferiblemente, los usos y procesos son aplicables para usarse en plantas o materiales o células útiles de tales plantas, más preferiblemente para agricultura, horticultura, plantas forestales, plantas ornamentales, o de cualquier otro interés

50 comercial. Entre otros, con fines ilustrativos y sin limitar el alcance de la presente invención: arroz, trigo, cebada, maíz, soja, colza, tomate, frijol, y diferentes frutas (naranja, limón, etcétera) y especies ornamentales.

Otra modalidad de la invención es un 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 particular, dicho

55 material de propagación se selecciona del grupo que consiste en semillas, plántulas, plantas jóvenes, esquejes, bulbos y tubérculos.

En la presente especificación, "material de propagación" significa cualquier tipo de material celular a partir del cual una planta puede germinar o crecer. Los ejemplos de material de propagación incluyen, pero sin limitación: semillas, esquejes,

60 suspensiones celulares, cultivo de callos, cultivo de tejidos, protocolos, explantes o germoplasma. El material de propagación puede tener diferentes orígenes. Por ejemplo, puede ser recién cosechado, o derivado de un stock, como una muestra de semillas o un stock de células congeladas.

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

65

El sustrato para el crecimiento de las plantas puede comprender la espora, el micelio o cualquier otra parte del microorganismo de la invención o el medio de cultivo o el filtrado del mismo o cualquiera 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, turba o humus o mezclas de los mismos.

Otra modalidad de la invención es una cepa del microorganismo *Colletotrichum tofieldiae*, depositados bajo los números de depósito CECT 20833, CECT 20834, CECT 20835 y CECT 20836.

10

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

15

Otra modalidad de la invención es el uso del microorganismo *Colletotrichum tofieldiae* y/o extractos de dicho microorganismo y/o medios filtrantes de dicho microorganismo para aumentar la producción de clorofila en una planta.

Otra modalidad de la invención es el uso del microorganismo *Colletotrichum tofieldiae* y/o extractos de dicho microorganismo y/o medios filtrantes de dicho microorganismo para aumentar la producción de flores, semillas y/o frutas en una planta que está sujeta a sequía o condiciones de riego limitadas.

20

Otra modalidad de la invención son los cebadores identificados por las secuencias Sec. con núm. de ident.: 1 y 2.

Breve descripción de las figuras

25

Figura 1. Re-aislamiento de *C. tofieldiae* de órganos no inoculados de plantas de *A. thaliana* 60 días después de la inoculación. A. Aislado CECT 20834 re-aislado de la hoja (círculo) y tallos (flechas). B. Aislado CECT 20833 re-aislado de raíz (flecha) y cuello (círculo).

30

Modalidades preferentes

Ejemplo 1: El cribado de los hongos que aumentan la productividad de las plantas

Se cosecharon plantas de *Arabidopsis thaliana* que crecen en condiciones naturales. Estas plantas no tenían síntomas de enfermedad tales como clorosis, manchas en las hojas y otros tipos de lesiones inducidas por patógenos. Los fragmentos de las hojas de la roseta de las plantas cosechadas se desinfectaron sumergiéndolos en lejía comercial al 20% (cloro activo al 1%) y agitando suavemente durante 5 minutos. Luego los fragmentos se enjuagaron dos veces en agua estéril y se colocaron en una cámara húmeda a temperatura ambiente (20 - 24 °C).

40

Los fragmentos fueron inspeccionados regularmente, aislando el micelio emergente en placas de petri con medio agar papa dextrosa (PDA) con 200 mg/l de cloranfenicol. Entre los aislamientos obtenidos, se realizó un cribado para encontrar hongos que son beneficiosos al dar como resultado un aumento en la producción de semillas de la planta (Tabla 1). Para realizar las pruebas de cribado, se sembraron semillas de acceso Col-0 de *Arabidopsis thaliana* superficialmente esterilizadas en sustrato estéril (turba y vermiculita en una relación de 3:1). Se estratificaron a 4 °C durante 3 días y luego se mantuvieron en una cámara de crecimiento controlada a 23 °C. Las plantas fueron tratadas a las 3 semanas de edad (4-6 hojas) aplicando un pedazo de micelio de cualquiera de los aislamientos de 3 mm de diámetro en una hoja. El micelio se obtuvo subcultivando el micelio fúngico obtenido de una planta silvestre de *Arabidopsis thaliana* sin síntomas de enfermedad, en placas PDA.

45

50

Las plantas control no estaban sujetas a ningún tratamiento y se colocaron al azar entre las plantas tratadas. Cuando comenzó la dehiscencia de los escamos de las hojas, estas se cubrieron con bolsas de papel para recoger las semillas. Cuando las plantas se secaron, las semillas se cosecharon y se pesaron. El resto de la parte aérea de la planta también se pesó. Entre todos los analizados, seleccionamos el aislado CECT 20833 del género *Colletotrichum*, dado que las plantas tratadas con este aislado aumentaron significativamente ($P < 0,04$) su producción de semillas, el peso de las semillas de las plantas tratadas fue tres veces mayor que el de las plantas no tratadas (Tabla 1). El peso del resto de la planta no fue significativamente diferente ($P > 0,05$, Tabla 1).

55

Tabla 1. Pesos (media $\pm$ error estándar) de las semillas y peso seco del resto de la planta de las plantas tratadas o no tratadas con micelio como se describe en el Ejemplo 1. Diferentes letras indican diferencias significativas entre las plantas tratadas y las plantas de control ($P < 0,05$) de acuerdo con ANOVA. Las plantas tratadas con el aislado CECT 20833 del género *Colletotrichum* (negrita) tuvo un peso de semilla significativamente mayor que las plantas control, mientras que el peso seco del resto de la planta no fue significativamente mayor.

60

65

TRATAMIENTO	Peso de semillas de las plantas Control por planta (mg)	Peso seco del resto de la planta (mg)	Peso de semillas de las plantas Tratadas por planta (mg)	Peso seco del resto de la planta (mg)
<i>Alternaria</i> sp.	28,0 ± 2,9 ^a	177,9 ± 12,1 ^a	21,6 ± 2,2 ^b	151,1 ± 5,8 ^b
<i>Colletotrichum</i> sp. CECT 20833	2,8 ± 1,1^a	85,1 ± 7,7	8,8 ± 1,7^b	90,7 ± 4,1
<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 ^a	16,5 ± 1,5	184,8 ± 11,6 ^b
<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 ± 72

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

20 El aislado CECT 20833 del género *Colletotrichum* del cribado del Ejemplo 1 tenía micelio oscuro y conidios curvos hialinos en acervulus con cerdas oscuras. Otros aislados obtenidos de la misma manera, identificados como CECT 20834, CECT 20835 y CECT 20836, mostraron una morfología similar. Todos estos aislados fueron identificados como *Colletotrichum tofieldiae* de acuerdo con la morfología y las secuencias de varios loci descritos en Damm y otros. (Diversidad fúngica 39 (2009) 45-87) que se compararon con secuencias de aislados estándares depositados en la base de datos accesible en <http://www.cbs.knaw.nl/Colletotrichum/>, alojada en el Centro de Biodiversidad Fúngica (CBS, Centraalbureau voor Schimmelcultures).

30 La morfología de estos aislados coincide con la descrita en Damm y otros. (Diversidad fúngica 39 (2009) 45-87) para *C. tofieldiae*, añadiendo ese cultivo en medio PDA (patata dextrosa agar) o equivalente, o en papel de filtro o en *A. thaliana* las hojas producen colonias muy oscuras, que el micelio en cultivo se oscurece y endurece con el tiempo y puede tener estructuras engrosadas del tipo de clamidosporas y/o tipo de microesclerocios.

35 Las similitudes de secuencia (número de nucleótidos idénticos/número de nucleótidos superpuestos) de las secuencias comparadas entre los aislados CECT 20833, CECT 20834, CECT 20835 y CECT 20836 y los aislados estándar CBS 168.49, CBS 495. 85 e IMI 288810 del Centro de Biodiversidad Fúngica, usado en Damm y otros. (Diversidad fúngica 39 (2009) 45-87) para definir las especies *C. tofieldiae*, fueron superiores al 92 %. Las secuencias comparadas fueron las de la subunidad ribosómica 5.8S con las dos regiones flanqueantes espaciadoras (ITS, similitud > 95 %), un intrón de 200-pb del gen de la gliceraldehído-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 realizaron con la herramienta de alineamiento de secuencias emparejadas MycolD alojada en el sitio web MycoBank (www.mycobank.org) de la Asociación Internacional de Micología.

45 El conjunto de estas características define las especies de *Colletotrichum* que corresponden al microorganismo de la presente invención.

Ejemplo 3: Los aislados de *Colletotrichum tofieldiae* persistieron en plantas tratadas al menos dos meses después de la inoculación y se translocaron o dispersaron a otros órganos diferentes de la hoja inoculada, tal como la raíz, la corona, otras hojas y tallos.

50 Se sembraron semillas de acceso Col-0 de *Arabidopsis thaliana* superficialmente esterilizadas en sustrato estéril (turba y vermiculita en una relación de 3:1). Se estratificaron a 4 °C durante 3 días y luego se mantuvieron en una cámara de crecimiento controlada a 23 °C, en ciclo corto (10 horas de luz por día). Las plantas fueron tratadas a las 3 semanas de edad con el aislado de *Colletotrichum tofieldiae* CECT 20833, CECT 20834 y CECT 20835 mediante la aplicación a tres hojas de una gota de una suspensión de esporas a 10⁶ esporas/ml. Las plantas completas se cosecharon 60 días después de la inoculación (dpi).

60 Las raíces, las hojas de la roseta y los tallos fueron removidos y cortados en fragmentos de aproximadamente 25 mm², desinfectados como se describió previamente e incubados en una cámara húmeda a temperatura ambiente. Después de una semana, *Colletotrichum tofieldiae* se re-aisló de al menos una muestra de todas las plantas inoculadas. El hongo se re-aisló de las hojas que no sean 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.

65 Tabla 2. Porcentaje de plantas de las cuales *C. tofieldiae* se re-aislaron de órganos distintos de los inoculados (hojas, tallos, cuello o raíz) 60 días después del tratamiento. ¹ Porcentaje de plantas de las cuales *C. tofieldiae* se re-aislaron en al menos una muestra de un órgano no inoculado.

Aislado	Porcentaje de re-aislamiento				
	Hojas	Tallo	Cuello	Raíz	Total ¹
CECT 20833	80 %	0 %	67 %	33 %	100 %
CECT 20834	100 %	17 %	50 %	83 %	100 %
CECT 20835	100 %	8 %	75 %	67 %	100 %

10

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

15

Se sembraron semillas de acceso Col-0 de *Arabidopsis thaliana* superficialmente esterilizada en sustrato estéril (turba y vermiculita en una relación de 3:1), se estratificó a 4 °C durante 3 días y luego se mantuvo en una cámara de crecimiento controlada a 23 °C. A las tres semanas de edad, fueron sometidos a uno de los siguientes tratamientos a) Tratamiento con un trozo de micelio del aislado CECT 20834 de la misma manera que en el ejemplo 1; b) Aplicación de una suspensión de esporas del aislado CECT 20834 en agua destilada estéril a una concentración de 10⁶ esporas/ml aplicadas por atomización sobre toda la planta y el sustrato debajo de la misma; c) Tratamiento de control que consiste en la aplicación de agua destilada estéril por atomización sobre toda la planta y el sustrato debajo de la misma.

20

25

En el caso del tratamiento b, las esporas se obtuvieron resuspendiendo en agua destilada estéril las esporas obtenidas del cultivo de hongos en medio PDA. Las plantas sometidas a cada uno de los tratamientos se organizaron de forma aleatoria. Al comenzar la dehiscencia de los escamos de las hojas, estos se cubrieron con bolsas de papel para recoger las semillas. Cuando las plantas se secaron, las semillas se recogieron y pesaron. El resto de la parte aérea de la planta también se pesó.

30

La producción de semillas por planta se midió como el peso de todas las semillas cosechadas de cada planta al final del ciclo. La producción de semillas de las plantas tratadas con CECT 20834 fue significativamente mayor que la de las plantas control ($P < 0,001$), con un aumento en peso del 37 % para las plantas tratadas con micelio y del 56 % para las plantas tratadas con el aerosol de la suspensión de esporas (Tabla 2). El aumento en la producción de semillas se debe en parte a la producción de semillas más pesadas, ya que el peso de 100 semillas de las plantas tratadas con CECT 20834 mostró un aumento significativo ($P < 0,06$) de hasta 42 % con respecto a las plantas control. El peso seco del resto de la planta no fue significativamente diferente ($P > 0,10$). El hongo se re-aisló, 6 semanas después del tratamiento, del 75 % de las plantas inoculadas con micelio y del 100 % de las plantas inoculadas con atomización. Este ejemplo muestra que la capacidad de aumentar la producción de semillas no es exclusiva para el aislado CECT 20833, pero se puede extender a otros *C. tofieldiae* aislados y que el tratamiento con esporas produce resultados similares al tratamiento con micelio.

35

40

Tabla 3. Pesos (media $\pm$ 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 atomización de agua destilada como se describe en el Ejemplo 4. * Diferentes letras muestran diferencias significativas de acuerdo con 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 semillas ($P > 0,10$). El aumento en porcentaje, comparando plantas tratadas y no tratadas, se muestra entre paréntesis.

45

TRATAMIENTO	Peso de semillas por planta (mg)*	Peso de 100 semillas por planta (mg)*	Peso seco de la planta sin semillas (mg)*
Atomización con agua destilada	35,0 $\pm$ 3,6 ^a	1,17 $\pm$ 0,11 ^a	213,9 $\pm$ 12,0
Micelio	47,5 $\pm$ 3,7 ^b (37 %)	1,66 $\pm$ 0,13 ^b (42 %)	249,3 $\pm$ 15,3 (16 %)
Atomización con suspensión de esporas	56,1 $\pm$ 2,9 ^b (56 %)	1,65 $\pm$ 0,19 ^b (41 %)	239,6 $\pm$ 16,9 (12 %)

55

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

60

Se sembraron semillas de acceso Col-0 de *Arabidopsis thaliana* superficialmente esterilizada en sustrato estéril (turba y vermiculita en una relación de 3:1), se estratificó a 4 °C durante 3 días y luego se mantuvo en una cámara de crecimiento controlada a 23 °C. A las tres semanas de edad, fueron sometidos a cualquiera de los siguientes tratamientos a) Aplicación de una suspensión de esporas del aislado de *Colletotrichum* sp CECT 20835; b) Aplicación de una suspensión de esporas del aislado de *Colletotrichum* sp CECT 20836; c) Tratamiento control que consiste en la aplicación de agua destilada estéril. Todos los tratamientos se aplicaron por atomización en toda la planta y el suelo debajo de la misma.

65

El inóculo de los tratamientos a, b y c proviene de suspensiones de esporas mantenidas en glicerol al 30 % a -80 °C y diluidas en agua destilada estéril a una concentración de 10^6 esporas/ml. Después de la aplicación del tratamiento, las plantas se mantuvieron a 25 °C, ciclo corto. Dos semanas después del tratamiento, el hongo se re-aisló del 17 % de las plantas inoculadas con CECT 20835, del 20 % de las plantas inoculadas con CECT 20836 y de ninguna planta tratada solo con agua. Seis semanas después del tratamiento, el hongo se re-aisló del 60 % de las plantas tratadas con CECT 20835 y de ninguna de las plantas tratadas con CECT 20836 o solo con agua. Cuando comenzó la dehiscencia de los escamos de las hojas, estas se cubrieron con bolsas de papel para recoger las semillas. Cuando las plantas se secaron, las semillas se cosecharon y se pesaron. El resto de la parte aérea de la planta también se pesó.

La producción de semillas 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 promedio de semillas por planta entre las plantas sometidas a los diferentes tratamientos ($P < 0,0001$, Tabla 4): Las plantas tratadas con CECT 20835 tuvieron el mayor peso promedio de semillas por planta, con un aumento del 550 % con respecto a las plantas tratadas solo con agua y las plantas tratadas con CECT 20836 tuvieron un aumento del peso promedio de semillas del 400 % con respecto a las plantas tratadas solo con agua. No se encontraron diferencias significativas en el peso de la planta sin semillas ($P > 0,10$). Este ejemplo muestra que el efecto de aplicar *Colletotrichum tofieldiae* puede ser proporcional a la persistencia del hongo en la planta.

TRATAMIENTO	Peso de semillas por planta (mg)*	Peso seco de la planta sin semillas (mg)
Atomización con agua destilada	$5,7 \pm 2,7^a$	$273,6 \pm 14,9$
Atomización con suspensión de esporas de CECT 20835	$38,7 \pm 2,5^b$ (550 %)	$266,2 \pm 20,7$
Atomización 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 como se describe en el Ejemplo 5. * Diferentes letras muestran diferencias significativas según ANOVA entre los diferentes tratamientos ($P < 0,0001$). El peso del resto de la planta no fue significativamente diferente entre los diferentes tratamientos ($P > 0,10$). El aumento en porcentaje, comparado entre las plantas tratadas con los diferentes aislados y las plantas control, se muestra entre paréntesis.

Ejemplo 6: El *Colletotrichum tofieldiae* aumentó 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.

Se sembraron semillas de acceso Col-0 de *Arabidopsis thaliana* superficialmente esterilizadas en sustrato estéril y no estéril (turba y vermiculita en una relación de 3:1). Se estratificaron a 4 °C durante 3 días y luego se mantuvieron en una cámara de crecimiento controlada a 23 °C. A las tres semanas de edad, fueron sometidos a cualquiera de los siguientes tratamientos a) Aplicación de una suspensión de esporas del aislado de *C. tofieldiae* CECT 20833; b) Aplicación de una suspensión de esporas de *C. tofieldiae* aislado CECT 20835; c) aplicación de agua destilada estéril. Todos los tratamientos se aplicaron por atomización en toda la planta. El inóculo de los tratamientos a y b proviene de suspensiones de esporas mantenidas en glicerol al 30 % a -80 °C, lavadas y diluidas en agua destilada estéril a una concentración de 10^6 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 siliques. Los resultados se muestran en la Tabla 5. Las plantas tratadas con los aislados de *C. tofieldiae* CECT 20833 y CECT 20835 mostraron un aumento significativo en frutos de hasta 39 %. Este experimento demuestra que el aumento 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 permanece en las plantas sobre sustrato no estéril.

Tabla 5. Número de frutos (media $\pm$ error estándar) por planta tratada con una suspensión de esporas de diferentes aislados de *C. tofieldiae* como se describe en el Ejemplo 6. * Letras diferentes muestran diferencias significativas en ANOVA ($P < 0,08$ para el sustrato estéril y $P < 0,04$ para el sustrato no estéril). El aumento en porcentaje, comparado entre plantas tratadas y no tratadas, se muestra entre paréntesis.

	No. de frutos* Sustrato estéril	Sustrato no estéril
Atomización con agua destilada	$53,3 \pm 6,5^a$	$11,3 \pm 0,7^a$
<i>C. tofieldiae</i> CECT 20833	$73,9 \pm 7,0^b$ (39 %)	$14,7 \pm 1,4^b$ (31 %)
<i>C. tofieldiae</i> CECT 20835	$60,4 \pm 5,8^b$ (13 %)	$14,3 \pm 0,8^b$ (27 %)

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

Se sembraron semillas de acceso Col-0 de *Arabidopsis thaliana* superficialmente esterilizadas en sustrato estéril y no estéril (turba y vermiculita en una relación de 3:1). Se estratificaron a 4 °C durante 3 días y luego se mantuvieron en una cámara de crecimiento controlada a 23 °C. Cuando las plantas tenían tres semanas de edad 200 µl por planta de a) una suspensión de esporas del aislado de *C. tofieldiae* CECT 20833; b) una suspensión de esporas del aislado de *C. tofieldiae* CECT 20835; c) se depositó agua destilada estéril en el sustrato, al lado de la planta. El inóculo de los tratamientos a y b proviene de suspensiones de esporas mantenidas en glicerol al 30 % a -80 °C lavadas y diluidas en agua destilada estéril a una concentración de 10⁶ 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 siliques. Los resultados se muestran en la Tabla 6. Las plantas tratadas con los aislados de *C. tofieldiae* CECT 20833 y CECT 20835 muestran un aumento de frutos de hasta el 27 %.

Tabla 6. Número de frutos (media ± error estándar) por planta tratada con una suspensión de esporas de aislados de *Colletotrichum* aplicados directamente al sustrato como se describe en el Ejemplo 7. * El aumento en porcentaje, comparado entre plantas tratadas y no tratadas, se muestra entre paréntesis.

	No. de frutos* Sustrato estéril	Sustrato no estéril
Atomización 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 %)

Ejemplo 8: El *Colletotrichum tofieldiae* persistió en plantas de maíz y colza tratadas, al menos 38 días después de la inoculación.

Las semillas de maíz de la variedad FAO700, y las semillas de colza de la variedad Westar esterilizadas superficialmente se sembraron en sustrato estéril (turba y vermiculita en una proporción de 3:1) y luego se mantuvieron en una cámara de crecimiento controlada a 23 °C, en ciclo corto (10 horas de luz por día). Las plantas fueron tratadas a las 3 semanas de edad con el aislado de *C. tofieldiae* CECT 20833 mediante atomización de 120 ml de una suspensión de esporas a 10⁶ esporas/ml en presencia de 0,75 % de tensioactivo (alquil polisacárido). La primera y la segunda hojas de siete plantas se cosecharon 23 dpi, mientras que la tercera y la cuarta hojas se recogieron 38 dpi.

Las hojas se separaron y se cortaron en fragmentos de aproximadamente 25 mm², desinfectados como se describió previamente e incubados en una cámara húmeda a temperatura ambiente. Después de una semana, *C. tofieldiae* se re-aisló de al menos el 64,3 % de las muestras recolectadas 38 dps de siete plantas inoculadas de maíz y el 7 % de las muestras recolectadas de siete plantas inoculadas de colza (Tabla 7). No se observó crecimiento de *C. tofieldiae* en ninguna de las plantas control tratadas con agua destilada.

Tabla 7. Número de hojas de maíz o colza y porcentaje de las cuales *Colletotrichum tofieldiae* se re-aisló 23 (primera y segunda hojas) y 38 días (tercera y cuarta hojas) después del tratamiento.

Cosecha	Días post atomización	Hoja muestreada (siete plantas)	Número de hojas de maíz que tienen acervuli (siete hojas)	Porcentaje de re-aislamiento por hoja	Porcentaje de re-aislamiento por hoja de la misma planta.
Maíz	23	Hoja 1	1	14,3 %	42,8 %
		Hoja 2	5	71,4 %	
	38	Hoja 3	5	71,4 %	64,3 %
		Hoja 4	4	57,1 %	
Colza	23	Hoja 1	7	100 %	78,6 %
		Hoja 2	4	57,14 %	
	38	Hoja 3	0	0 %	
		Hoja 4	1	14,28 %	7 %

Ejemplo 9: El *Colletotrichum tofieldiae* puede inocularse mediante diferentes métodos en el maíz y la cebada, se transloca desde las semillas y las raíces hasta las hojas, y aumenta el contenido de clorofila.

Las semillas de maíz lavadas de la variedad FAO700 y las semillas de cebada de la variedad Arturo fueron sometidas a diferentes tratamientos (36 plantas por tratamiento):

1. Tratamiento de inmersión: las semillas se inocularon por inmersión durante 2 h en una suspensión de micelio batido del aislado CECT 20833, crecieron en PDB durante 10 días, a una densidad óptica de 1,2 y se sembraron en una mezcla de sustrato de turba y vermiculita en una relación 3:1.
- 5 2. Tratamiento de centeno: las semillas se sembraron en una mezcla de sustrato de turba y vermiculita en una relación de 3:1 a la que se agregaron semillas de centeno (35 g/l de sustrato) que se habían inoculado 8 días antes con discos de micelio del aislado CECT 20833.
- 10 3. Tratamiento de turba: las semillas se sembraron en una mezcla de sustrato de turba y vermiculita en una relación de 3:1 a la que se agregó una mezcla de turba y salvado (20 g/l de sustrato) que se había inoculado dos semanas antes con esporas del aislado CECT 20833. Una cantidad de $1,5 \times 10^4$ esporas/gramo de mezcla de turba y salvado.
- 15 4. Tratamiento por atomización: las semillas se sembraron en una mezcla de sustrato de turba y vermiculita en una relación de 3:1 y a las 3 semanas de edad se inoculó mediante la aplicación por atomización de 120 ml de una suspensión de micelio del aislado CECT 20833, que se había crecido en PDB durante 10 días, ajustados a una densidad óptica de 1,2, en presencia de 0,75 % de tensioactivo (alquil polisacárido).
- 20 5. Tratamiento de riego: las semillas se sembraron en una mezcla de sustrato de turba y vermiculita en una relación de 3:1 y se inocularon mediante riego (5 ml) con una suspensión de micelio batido del aislado CECT 20833 que se había crecido en PDB durante 10 días, ajustado a una densidad óptica de 1,2.

Una vez sembradas, las plantas se mantuvieron en un invernadero a 23 °C, en ciclo corto (10 horas de luz por día). Después de 25 días, las hojas se separaron y se cortaron en fragmentos de aproximadamente 25 mm², desinfectados como se describió previamente e incubados en una cámara húmeda a temperatura ambiente. Después de una semana, *C. tofieldiae* se re-aisló de todos los tratamientos de centeno y de todos los tratamientos de maíz, excepto de la inmersión de semillas (Cuadro 8). No se observó crecimiento de *C. tofieldiae* en ninguna de las plantas control tratadas con agua destilada. Además, después de tres meses, se tomaron muestras de las plantas y se tomó tejido foliar, que se mantuvo durante 18 horas en etanol al 80 %. Después de este tiempo, se midió la absorbancia (OD₆₆₃) de la suspensión como un indicador de la concentración de clorofila a. Se encontró que en los tratamientos de centeno y turba la absorbancia fue significativamente mayor que en las plantas control no inoculadas (Tabla 9).

Tabla 8. Porcentaje de re-aislamiento del aislado CECT 20833 de plantas de maíz y cebada después de los diferentes tratamientos y absorbancia de muestras de maíz OD₆₆₃ (clorofila a). * Letras diferentes muestran diferencias significativas en ANOVA (P < 0,05) Ejemplo 10: El Colletotrichum tofieldiae puede inocularse tanto como conidios y como micelio tanto en el sustrato como en forma de aerosol en el maíz. Se moviliza desde la raíz hasta las hojas y viceversa, aumentando el contenido de clorofilas.

Tratamiento	N	Maíz: porcentaje de re-aislamiento	Cebada: porcentaje de re-aislamiento	Maíz: absorbancia OD ₆₆₃ (clorofila a)*
Control de inmersión	32	0 %	0 %	-
Inmersión	32	0 %	20 %	-
Control de centeno	32	0 %	0 %	0,24 ± 0,02 ^a
Centeno	32	90 %	40 %	0,33 ± 0,03 ^b
Control de turba	32	0 %	0 %	0,15 ± 0,02 ^a
Turba	32	80 %	10 %	0,25 ± 0,02 ^b
Control de atomización	32	0 %	0 %	0,42 ± 0,02 ^a
Atomización	32	30 %	50 %	0,37 ± 0,02 ^a
Control de riego	32	0 %	0 %	0,17 ± 0,02 ^a
Riego	32	70 %	50 %	0,16 ± 0,02 ^a

Las semillas de maíz lavadas de la variedad FAO700 fueron sometidas a diferentes tratamientos (54 plantas por tratamiento):

1. Tratamiento de turba-micelio: las semillas se sembraron en un sustrato de turba:vermiculita (3:1) más una mezcla de turba y salvado (20 g/l) inoculada con una suspensión de micelio batido del aislado CECT 20833 como se describe en el ejemplo 9.
2. Tratamiento de esporas de turba: las semillas se sembraron en un sustrato de turba:vermiculita (3:1) más una mezcla de turba y salvado (20 g/l) inoculadas dos semanas antes con una suspensión de esporas a 10^6 esporas/ml de aislado CECT 20833.
3. Tratamiento de esporas con atomización: las semillas se sembraron en un sustrato turba:vermiculita (3:1) y las plantas se inocularon a las 3 semanas de edad con el aislado de *C. tofieldiae* CECT 20833 mediante aplicación por atomización de 120 ml de una suspensión de esporas a 10^6 esporas/ml en presencia de 0,5 % de tensioactivo (polisacárido de alquilo).
4. Tratamiento con atomización de micelio: las semillas se sembraron en un sustrato de turba: vermiculita (3:1) y las plantas se inocularon a las 3 semanas de edad con el aislado de *C. tofieldiae* CECT 20833 mediante aplicación por atomización de 120 ml de una suspensión de micelio a una densidad óptica de 1,5 en presencia de 0,5 % de tensioactivo (polisacárido de alquilo).

Una vez sembradas, las plantas se mantuvieron en un invernadero a 23 °C, en ciclo corto (10 horas de luz por día) durante ocho semanas. Las hojas o las raíces se separaron y se cortaron en fragmentos de aproximadamente 25 mm², desinfectados como se describió previamente e incubados en una cámara húmeda a temperatura ambiente. Después de 30 días *C. tofieldiae* se re-aisló de todos los tratamientos (Tabla 9). No se observó crecimiento de *C. tofieldiae* en ninguna de las plantas control tratadas con una atomización de agua destilada o sembradas con turba. Además, el índice de contenido de clorofila (CCI) se midió usando el medidor opti-ciencias CCM 200. Se observó que en todos los tratamientos las plantas inoculadas tenían un CCI más alto que las plantas de control no inoculadas, a excepción del tratamiento por atomización de las esporas (Tabla 9).

Tabla 10. Porcentaje de re-aislamiento en raíces y hojas de plantas de maíz y contenido de clorofila (CCI) (media $\pm$ error estándar) después de los diferentes tratamientos. * Letras diferentes muestran diferencias significativas en ANOVA (P <0,05).

Tratamiento	N	Raíz: porcentaje de re-aislamiento	Hoja: porcentaje de re-aislamiento	N (número de mediciones)	CCI*
Control de micelio de turba	54	0 %	0 %	50	2,82 $\pm$ 0,09 ^a
Micelio de turba	54	67 %	20 %	38	3,57 $\pm$ 0,12 ^b
Control de esporas de turba	54	0 %	0 %	56	3,27 $\pm$ 0,14 ^a
Esporas de turba	54	67 %	25 %	34	3,78 $\pm$ 0,16 ^b
Control de atomización de micelio	54	0 %	0 %	60	3,97 $\pm$ 0,13 ^a
Atomización de micelio	54	33 %	45 %	48	5,84 $\pm$ 0,44 ^b
Control de atomización de esporas			0 %	70	3,46 $\pm$ 0,10 ^a
Atomización de esporas	54	42 %	35 %	64	2,99 $\pm$ 0,10 ^b

Ejemplo 11: El *Colletotrichum tofieldiae* aumentó el número de granos por mazorca y el peso por mazorca en las plantas de maíz tratadas con el aislado CECT 20833 bajo riego normal y condiciones de riego limitadas.

Las semillas de maíz lavadas de la variedad FAO700 se inocularon por inmersión durante 16 h en una suspensión de esporas a las 10^6 esporas/ml, sembradas en sustrato (turba y vermiculita en una relación de 3:1) y mantenidas en una cámara de crecimiento controlada a 23 °C. Cuando las plantas tenían tres semanas de edad, fueron llevadas al campo, donde fueron trasplantadas al suelo en cuatro filas separadas por 70 cm y con una distancia de 25 cm entre las plantas dentro de cada fila. Las plantas control y las plantas inoculadas con *C. tofieldiae* fueron plantados en bloques al azar dentro de cada fila. Después de un mes con riego normal (100 % de agua), dos de las filas fueron sometidas a riego limitado con un riego de 30 % con respecto a las plantas control. Al final de la temporada de crecimiento, se registró el

número de granos por mazorca y el peso de cada mazorca. Los resultados se muestran en la Tabla 10. Las plantas tratadas con *C. tofieldiae* mostró un aumento de granos de hasta 47 % y de peso promedio por mazorca de hasta 70 % cuando las plantas fueron sometidas a riego limitado.

- 5 Tabla 10. Producción promedio del número de granos (media $\pm$ error estándar) y peso por mazorca (media $\pm$ error estándar) de plantas germinadas de semillas tratadas con una suspensión de esporas de *C. tofieldiae* bajo riego normal y condiciones de riego limitadas. * El aumento en el porcentaje comparado entre plantas tratadas y no tratadas se muestra entre paréntesis. Diferentes letras muestran diferencias significativas en ANOVA ($P < 0,05$)

Tratamiento	N	Número de granos por mazorca	Valor-P	Peso promedio por mazorca	Valor-P
<u>Riego normal (100 %)</u>					
Control	19	439 $\pm$ 51	-	169 $\pm$ 19	-
<i>C. tofieldiae</i> Inoculación	28	450 $\pm$ 36 (2 %)*	0,866	211 $\pm$ 17 (25 %)	0,119
<u>Riego limitado (30 %)</u>					
Control	17	267 $\pm$ 27	-	102 $\pm$ 24	-
<i>C. tofieldiae</i> Inoculación	20	393 $\pm$ 56 (47 %)	0,063	173 $\pm$ 22 (70 %)	0,034 *

Ejemplo 12: Cuando *Colletotrichum tofieldiae* coloniza las plantas, produce un aumento en el número de granos por mazorca y en el peso de las mazorcas por planta de maíz tratada con el aislado CECT 20833.

25

Las semillas de maíz lavadas de la variedad FAO700 se sembraron en el suelo en cuatro filas separadas por 70 cm y con una distancia de 25 cm entre las plantas dentro de cada fila. Para la inoculación con *C. tofieldiae*, Se depositaron 200 ml/semilla de mezcla de vermiculita turba en el fondo del surco de siembra a una concentración de 10^6 UFC/ml que se había inoculado dos semanas antes con esporas con una concentración de 10^6 esporas/ml del aislado CECT 20833. Las plantas control y las plantas inoculadas con *C. tofieldiae* se sembraron en bloques al azar dentro de cada fila. Al final de la temporada de crecimiento, se registró el número de granos por mazorca. La PCR en tiempo real (RT PCR) del tejido de las raíces ortopédicas de las plantas de maíz se realizó en paralelo con los cebadores CT_RTPCR L (Sec. con núm. de ident.: 1) y CT_RTPCR_R (Sec. con núm. de ident.: 2) específicos para *C. tofieldiae*. Los resultados se muestran en la Tabla 11. Las plantas colonizadas con *C. tofieldiae* muestran una mayor producción de mazorcas de hasta 43 % y una mayor producción de semillas de hasta 35 % cuando las plantas están sujetas a riego limitado con un riego de 30 % con respecto a las plantas control.

30

35

Tabla 11. Producción promedio (peso de mazorca por planta (media $\pm$ error estándar) y número de granos por planta (media $\pm$ error estándar)) de plantas germinadas de semillas tratadas con una suspensión de esporas de *C. tofieldiae* en condiciones de riego normal. El aumento del porcentaje comparado entre plantas colonizadas y no colonizadas se muestra entre paréntesis. Diferentes letras muestran diferencias significativas en ANOVA ($P < 0,05$)

40

Grupo	N	Peso promedio de mazorca por planta	Valor-P	Número promedio de granos por planta.	Valor-P
Control	26	237 $\pm$ 19	-	574 $\pm$ 122	-
<i>C. tofieldiae</i>	7	339 $\pm$ 76 (42 %)	0,063	775 $\pm$ 48 (35 %)	0,079

REIVINDICACIONES

1. Un método para aumentar la producción de flores, semillas y/o frutas en una planta, que comprende la etapa de poner en contacto dicha planta con una composición, la composición que comprende el microorganismo *Colletotrichum tofieldiae* y/o filtrados de dicho microorganismo.
2. Método de acuerdo a la reivindicación 1, caracterizado porque dicho microorganismo es una cepa de *Colletotrichum tofieldiae* seleccionado de los números de identificación de depósito CECT 20833, CECT 20834, CECT 20835 o CECT 20836.
3. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, caracterizado porque dicho microorganismo está en forma de esporas, hifas, micelio o esclerocios.
4. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque dicho contacto comprende la aplicación de la composición a las semillas.
5. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque dicho contacto comprende la aplicación de la composición a partes aéreas de la planta.
6. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque dicho contacto comprende la aplicación de la composición a raíces, bulbos o tubérculos de la planta.
7. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque dicho contacto comprende la aplicación de la composición a un sustrato capaz de cultivar dicha planta.
8. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado porque dicha composición comprende minerales, materiales orgánicos, compuestos orgánicos, compuestos inorgánicos, diluyentes líquidos, alcoholes, cetonas, aceites vegetales, hidrocarburos alifáticos, ésteres, dimetilsulfóxido, acetonitrilo, agua, tensioactivos aniónicos, tensioactivos no iónicos, tensioactivos catiónicos, polímeros solubles en agua, polisacáridos, conservantes, agentes colorantes y/o agentes estabilizantes.
9. Método de acuerdo con la reivindicación 8, caracterizado porque dichos minerales se seleccionan del grupo que consiste en arcilla, bentonita, calcita y mazorca de diatomeas; los materiales orgánicos se seleccionan del grupo que consiste en polvo de maíz y polvo de piel de nuez; dicho compuesto orgánico es urea; dichos compuestos inorgánicos se seleccionan del grupo que consiste en carbonato de calcio, sulfato de amonio, óxido de silicio y silicato de aluminio y magnesio; dichos diluyentes líquidos se seleccionan del grupo que consiste en hidrocarburos aromáticos, hidrocarburos alifáticos, alcoholes, cetonas, aceites vegetales, ésteres, dimetilsulfóxido, acetonitrilo y agua; dichos tensioactivos aniónicos se seleccionan del grupo que consiste en sales de alquil ésteres de sulfato, sales de alquilaril sulfonato, sales de dialquil sulfosuccinato, sales de ésteres de polioxietilen alquil éter fosfato, sales de polioxietilen lignosulfonato y policondensados de formaldehído; dichos tensioactivos no iónicos se seleccionan del grupo que consiste en éteres de alquilaril polioxietileno, copolímeros de bloques de alquilpolioxipropileno y ésteres de ácidos grasos de polioxietileno; dichos tensioactivos catiónicos son sales de alquil trimetilamonio; dichos polímeros son alcohol polivinílico soluble en agua o polivinilpirrolidona; dichos polisacáridos se seleccionan del grupo que consiste en agar, acacia, ácido algínico, sales de ácido algínico, carboximetilcelulosa y goma de xantana; y dichos agentes estabilizantes son ácido isopropil fosfato o BHT.
10. Método de acuerdo con la reivindicación 9, caracterizado porque dichos hidrocarburos aromáticos se seleccionan del grupo que consiste en xileno, alquilbenceno y metil naftaleno; dichos alcoholes se seleccionan del grupo que consiste en 2-5 propanol, etilenglicol, propilenglicol y etilenglicol monoetiléter; dichas cetonas se seleccionan del grupo que comprende acetona, ciclohexanona e isoforona; y dichos aceites vegetales son aceite de soja o aceite de semilla de algodón.
11. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, caracterizado porque dicha composición comprende sales de fertiriego de sustrato, fertilizantes, insecticidas, nematocidas, fungicidas, bactericidas y/o herbicidas.
12. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, caracterizado porque dicha composición es un líquido, un sólido, una pasta o un gel.
13. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, caracterizado porque dicha composición es un polvo, píldora, tableta, gránulo o un concentrado emulsionable.
14. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, caracterizado porque dicho contacto comprende la aplicación por atomización, pulverización, inmersión, riego o empolvado.

15. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, caracterizado porque dicha planta es una gimnosperma o una dicotiledónea.
- 5 16. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, caracterizado porque dicha planta es de la familia *Brassicaceae*.
17. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, caracterizado porque dicha planta es una monocotiledónea.
- 10 18. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, caracterizado porque dicha planta es cebada (*Hordeum vulgare*).
19. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, caracterizado porque dicha planta es maíz (*Zea mays*).
- 15 20. Material de propagación de plantas que comprende una cepa de *Colletotrichum tofieldiae* seleccionado de los números de identificación de depósito CECT 20833, CECT 20834, CECT 20835 o CECT 20836.
21. Material de propagación de plantas de acuerdo con la reivindicación 20, en el que dicho material se selecciona del grupo que consiste en semillas, plántulas, plantas jóvenes, esquejes, bulbos y tubérculos.
- 20 22. Sustrato para el cultivo de plantas que comprende el microorganismo *Colletotrichum tofieldiae* y/o dichos filtrados de microorganismos.
- 25 23. Cepa del microorganismo *Colletotrichum tofieldiae* seleccionados de los números de identificación de depósito CECT 20833, CECT 20834, CECT 20835 o CECT 20836.
24. Uso del microorganismo *Colletotrichum tofieldiae* y/o medios filtrantes de dicho microorganismo, para aumentar la producción de flores, semillas y/o frutas en una planta.
- 30 25. Uso del microorganismo *Colletotrichum tofieldiae* y/o medios filtrantes de dicho microorganismo para aumentar la producción de clorofila
26. Uso del microorganismo *Colletotrichum tofieldiae* y/o medios de filtrantes de dicho microorganismo para aumentar la producción de flores, semillas y/o frutas en una planta que está bajo sequía o condiciones de riego limitadas.
- 35 27. Cebadores identificados por secuencias Sec. con núm. de ident.: 1 y 2.

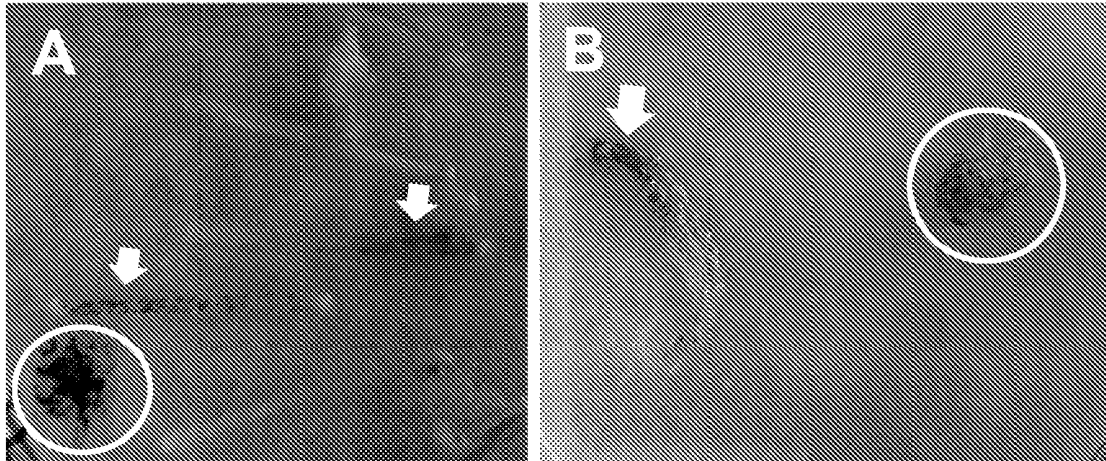


FIG. 1