

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 920 805**

51 Int. Cl.:

A01P 15/00	(2006.01) C12R 1/02	(2006.01)
A01N 25/22	(2006.01)	
C12N 1/20	(2006.01)	
A01N 25/30	(2006.01)	
A01N 25/00	(2006.01)	
A01N 63/20	(2010.01)	
C05G 3/50	(2010.01)	
C05G 5/27	(2010.01)	
C05F 11/08	(2006.01)	
C12R 1/01	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.07.2015 PCT/GB2015/052170**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **04.02.2016 WO16016629**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.07.2015 E 15754282 (0)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.05.2022 EP 3174394**

54 Título: **Método de inoculación de plantas**

30 Prioridad:

28.07.2014 GB 201413333

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.08.2022

73 Titular/es:

**AZOTIC TECHNOLOGIES LIMITED (100.0%)
Heritage House, Murton Way, Osbaldwick
York YO19 5UW, GB**

72 Inventor/es:

**DENT, DAVID y
CLARKE, IAN**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 920 805 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 de inoculación de plantas

La presente invención se refiere a un método para inocular plantas con *Gluconacetobacter diazotrophicus*, a composiciones y kits adecuados para ello, y a una cepa de *Gluconacetobacter diazotrophicus*.

- 5 La bacteria fijadora de nitrógeno *Gluconacetobacter diazotrophicus*, anteriormente conocida como *Acetobacter diazotrophicus* (Gillis, M. et al. Int. J. Syst. Bacteriol. 39: 361-364; 1989), se aisló originalmente del interior de las raíces y tallos de la caña de azúcar (Cavalcante, V. A., et al. (1988) Plant Soil Vol. 108, pág. 23-31). Se ha demostrado mediante incorporación de $^{15}\text{N}_2$ que *G. diazotrophicus* fija nitrógeno dentro de las plantas de caña de azúcar (Sevilla, M. et al. Mol. Plant Microbe Interact. 14:358-366; 2001; Boddey, R. M. et al. Plant Soil 252:139-149; 2003), y que tiene la capacidad de excretar casi la mitad del nitrógeno fijado en una forma potencialmente disponible para las plantas (Cojho, E. H et al. Fed. Eur. Microbiol. Soc. Microbiol. Lett. 106:341-346; 1993). La bacteria invade entre las células de los meristemos de la raíz de la caña de azúcar y en los puntos de emergencia de las raíces laterales, colonizando intercelularmente, y también en el xilema, sin nodulación (James, E. K. et al. Exp. J. Bot. 52:747-760; 2001). Se han demostrado las condiciones bajo las cuales podría ocurrir la colonización intracelular de Gd, permitiendo la fijación de nitrógeno endosimbiótica no nodular (documento EP-B-1422997, y Cocking, E.C., et al. (2006) In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant Vol. 42, No. 1, págs. 74-82). En particular, las bacterias se administran al medio de crecimiento de la planta a medida que la planta crece en la germinación o dentro de los 7 días siguientes.

- 20 Taghavi et al han publicado un artículo titulado "Estudio del genoma y caracterización de bacterias endófitas que exhiben un efecto beneficioso sobre el crecimiento y desarrollo de los álamos" (véase Appl. Environ Microbiol, 2009, Vol 75, No 9(3), páginas 748-757). Este explica que la comprensión de las interacciones entre las bacterias endófitas y sus plantas hospedantes debería dar como resultado, en última instancia, el diseño de estrategias para mejorar la producción de biomasa de álamos en suelos marginales como materia prima para biocombustibles.

- 25 Karthikeyan et al han publicado un artículo titulado "Eficacia de Azotobacter chroococcum en el enraizamiento y crecimiento de esquejes de Eucalyptus camaldulensis" (véase Research Journal of Microbiology, 2011, Vol 6, No 7, páginas 618-624). Este explica que *A. chroococcum* produjo cantidades significativas de IAA para la iniciación de raíces, que los esquejes inoculados con *A. chroococcum* tuvieron un mayor crecimiento que los esquejes tratados con IBA.

- 30 Gagné et al han publicado un artículo titulado "Bacterias que residen en el xilema en raíces de alfalfa" (véase Canadian Journal of Microbiology, 2011, Vol 33, No 11, páginas 996-1000). Este explica que la mayor incidencia de bacterias en el xilema de la raíz ocurriera cuando las raíces estaban heridas.

- 35 Amalarj et al han publicado un artículo titulado "Efecto de aditivos, adyuvantes, tensioactivos poliméricos sobre la supervivencia, la estabilidad, y la capacidad promotora del crecimiento vegetal de bioinoculantes líquidos" (véase J. Plant Physiol. Pathol, 2013, Vol 1: No 2, páginas 1 a 6). Este explica que las semillas de maíz tratadas con consorcio de polisorbato (PSB) y *Azospirillum brasilense* mejoraron el crecimiento de la planta positivamente por una multitud de mecanismos sinérgicos, en comparación con la aplicación de un solo inoculante.

- Feng-Jiao et al han publicado un artículo titulado "Inoculación de diazótrofos entófitos en pasto bermuda híbrido (véase Pratacultural Science, 2013, Vol 30, No 12, páginas 1953-1959). Este explica que el remojo microbiano es óptimo para la inoculación de diazótrofos endófitos con pasto bermuda híbrido, pero que los efectos de los métodos de inoculación sobre la densidad de la nitrogenasa de azotobacter endógena no fueron significativos.

- 40 El documento WO2011/144741 sugiere que se pueden inyectar bacterias tales como Gd en tallos de caña de azúcar para mejorar la fijación de nitrógeno. Claramente, una técnica de este tipo no se puede aplicar en ninguna operación agrícola a gran escala.

El solicitante ha encontrado que las plantas en crecimiento pueden ser inoculadas con éxito con bacterias fijadoras de nitrógeno.

- 45 Según la presente invención, se proporciona un método para inocular una planta en crecimiento con *Gluconacetobacter diazotrophicus*, que comprende herir dicha planta sobre el nivel del suelo en una etapa preliminar, y, posteriormente al etapa preliminar, administrar la *Gluconacetobacter diazotrophicus* a la herida de la planta producida por dicha herida.

- 50 Se ha encontrado que cuando se aplica a una herida, en particular a la superficie de una herida en tejido vegetal, se potencia el crecimiento subsiguiente de la planta. Por ejemplo, se puede mejorar la biomasa o el rendimiento, y/o se puede aumentar el número de flores. Esto puede deberse a la colonización del tejido vegetal por *Gluconacetobacter diazotrophicus* de manera similar a la descrita, por ejemplo, en el documento EP-B-1422997, aunque sorprende el hecho de que esto pueda ocurrir cuando se aplica de esta manera. La *Gluconacetobacter diazotrophicus* colonizada dentro del tejido de la planta puede proporcionar una fuente de nitrógeno intracelular que mejora el crecimiento de la planta. Por lo tanto, el método de la invención proporciona un medio útil para administrar un tratamiento potenciador del crecimiento de plantas a plantas en crecimiento.

La bacteria fijadora de nitrógeno usada en el método es la bacteria fijadora de nitrógeno simbiótica colonizadora intracelularmente *Gluconacetobacter diazotrophicus* (Gd), por ejemplo *Gluconacetobacter diazotrophicus* cepa IMI 504998 (anteriormente IMI 501986) o IMI 504958 (anteriormente IMI 504853), ambas depositadas en CABI (Reino Unido) el 21 de septiembre de 2012 y 22 de mayo de 2015 respectivamente. Tales cepas son nuevas y forman un aspecto adicional de la invención.

En una realización particular, *Gluconacetobacter diazotrophicus* puede administrarse junto o en combinación con una cepa de *Terribacillus*, como se describe en la solicitud de patente internacional en trámite junto con la presente del solicitante que reivindica la prioridad de la solicitud de patente británica No. 1400840.3. El solicitante ha descubierto que dicha cepa puede potenciar la actividad de la *Gluconacetobacter diazotrófico*. Las cepas adecuadas de *Terribacillus* incluyen *Terribacillus psychrophiles*, *Terribacillus halophilus*, *Terribacillus goriensis*, o *Terribacillus aidingensis*, pero en particular es una cepa de *Terribacillus saccharophilus*. La *Terribacillus* puede suministrarse por separado o mezclada con *Gluconacetobacter diazotrophicus*. La *Terribacillus* puede estar en mezcla íntima con *Gluconacetobacter diazotrophicus*, (y de hecho, IMI501986 (ahora IMI 504998) se ha clasificado como un consorcio de Gd y *Terribacillus*) o puede administrarse en forma de cocultivo, o cultivo mixto.

La herida de la planta puede ser el resultado de un daño accidental o natural, por lo que la disponibilidad adicional de nitrógeno puede facilitar el crecimiento reparador. Sin embargo, en una realización particular, la herida es el resultado del daño causado por acciones tales como siega (hierba recreativa), corte (cultivos de ensilado y heno), retoñado (plátano, piña, caña de azúcar, sorgo, arroz, guandú, algodón, abacá, ramio), poda (frutales, vid), consumo por ganadería o por recolección. Otros procedimientos, tal como el desgarrado, en el que las plantas pueden dañarse inadvertidamente o de forma incompleta, pueden no ser adecuados en algunos casos. En particular, la herida se encontrará en una parte 'sobre el suelo' de la planta, tal como hojas o tallos.

Por lo tanto, el método de la invención incluye una etapa preliminar de herir una planta en crecimiento por encima del nivel del suelo. Esto inflige 'daño' a la planta, por ejemplo mediante siega, corte, retoñado, poda, o recolección. *Gluconacetobacter diazotrophicus* se aplica adecuadamente dentro de un período de tiempo relativamente corto de llevar a cabo tales acciones, por ejemplo dentro de las 48 horas, por ejemplo dentro de las 24 horas, tal como dentro de las 10 horas, y adecuadamente dentro de 1-2 horas de haber causado el daño a la planta.

El suministro de *Gluconacetobacter diazotrophicus* se logra mediante la aplicación de una formulación adecuada al área de la herida, en particular a la superficie de la herida, en forma de una composición. La composición puede estar en forma de líquido, gel, pasta que se puede aplicar directamente o en forma diluida, o puede estar en forma de una composición sólida, tal como una composición en polvo o gránulos, que se disolverá en un líquido, tal como agua, antes del uso. En composiciones sólidas, las bacterias se usarán generalmente en forma seca, por ejemplo en forma liofilizada, que son reconstituibles por adición de agua. Si se desea, las bacterias pueden microencapsularse usando métodos conocidos en la técnica, para mantener una alta viabilidad y estabilidad de las bacterias.

En una realización particular, la composición se encuentra en una forma adecuada para pulverizar sobre las plantas, y de este modo comprenderá un concentrado para dilución que puede presentarse en forma líquida o sólida, en particular en forma líquida, o puede comprender una composición acuosa diluida que se puede rociar directamente. Alternativamente, la composición puede ser aquella en la que la superficie de la herida de una planta pueda sumergirse por inmersión, por ejemplo.

La cantidad de *Gluconacetobacter diazotrophicus* que se administre en cualquier caso particular variará dependiendo de factores tales como el tipo de semilla que se está tratando, la cepa particular usada, el nivel de mejora de la germinación requerido, y el método de administración, así como el efecto requerido. Sin embargo, por lo general, a las heridas de una planta se administra una disolución que contiene de $1 \text{ a } 1 \times 10^7$ bacterias por mililitro de composición aplicada, por ejemplo de $10\text{-}10^3$ bacterias por mililitro de composición, por ejemplo de 50-200 bacterias por mililitro de composición, tal como 100 bacterias por mililitro de composición. Dicha disolución se puede obtener cultivando las bacterias hasta un nivel fácilmente detectable, por ejemplo examinando la densidad óptica y después diluyendo la disolución en consecuencia.

El solicitante ha descubierto, por ejemplo, que, en el caso de determinadas bacterias, los efectos sobre una propiedad tal como la biomasa se ven afectados por la cantidad de bacterias aplicadas de forma dependiente de la dosis. Esto significa que se pueden administrar diferentes dosis dependiendo del objetivo del tratamiento. En el caso de las gramíneas, por ejemplo, puede ser necesario que la biomasa se maximice en la gramínea de pasto, mientras que en la hierba recreativa o césped, puede ser preferible un crecimiento lento. En tales casos, la cantidad de bacterias administrada se seleccionará para proporcionar una producción de biomasa óptima para la especie de hierba diana, como se ejemplifica a continuación.

En una realización particular, una composición usada en el método puede comprender un nutriente para *Gluconacetobacter diazotrophicus*. Por ejemplo, la composición puede comprender sacarosa al 3% p/v, como se describe en el documento EP-B-1422997.

Las *Gluconacetobacter diazotrophicus* puede ser el único componente activo de una composición usada en el método, o puede combinarse con componentes agroquímicamente activos adicionales, tales como insecticidas, fungicidas o reguladores del crecimiento de las plantas, según se requiera.

5 Una composición usada en el método puede comprender además aditivos o excipientes tales como agentes espesantes, dispersantes, diluyentes, humectantes, vehículos sólidos, etc., como se conocen en la técnica.

Una composición usada en el método puede comprender además un polisacárido o un tensioactivo agrícolamente aceptable, o una combinación de estos.

10 Una composición usada en el método puede comprender además un tensioactivo aceptable en agricultura. La presencia de un tensioactivo asegura que la composición pueda fluir con relativa libertad sobre toda la superficie de las heridas para facilitar la entrada de las bacterias fijadoras de nitrógeno.

Los tensioactivos o detergentes adecuados incluyen detergentes no iónicos tales como los vendidos con el nombre comercial 'Tween'®, por ejemplo Tween 80.

15 Tween 80 es un detergente no iónico; compuesto al 70% por el ácido graso ácido oleico, y el resto es una combinación de ácidos linoleico, palmítico y esteárico. El pH de una disolución al 1% está en el intervalo de 5,5-7,2. Es ampliamente usado para emulsionar y dispersar sustancias en productos medicinales y alimentarios. Tiene poca o ninguna actividad como agente antibacteriano (Dawson et al. (1986) Data for Biochemical Research, 3ª ed., Oxford University Press (Nueva York, NY: 1986), pág. 289).

20 La cantidad de tensioactivo administrada a la herida de una planta debería ser suficiente para producir un efecto mejorado de crecimiento de la planta cuando se combina con las bacterias fijadoras de nitrógeno (y opcionalmente también con un polisacárido como se describe más adelante). Esto variará según los diversos factores, tales como el tensioactivo particular, el tipo de planta que se está tratando, la naturaleza de la herida, la cepa particular de bacterias fijadoras de nitrógeno empleada, y el método de administración. Sin embargo, típicamente, una composición puede comprender de 0,0005 a 10% v/v de tensioactivo, tal como de 0,0005 a 0,5% v/v, por ejemplo de 0,0005 a 1% v/v, incluyendo de 0,0005 a 0,2% v/v, por ejemplo de 0,0005 a 0,15% v/v, tal como alrededor de 0,1% v/v.

25 Una composición usada en el método puede comprender un polisacárido. Los polisacáridos adecuados para uso en tal composición incluyen polisacáridos hidrocoloides derivados de fuentes vegetales, animales o microbianas.

30 En particular, estos incluyen polisacáridos de goma exudada, tales como goma arábica, goma ghatti, goma karaya y goma tragacanto, derivados celulósicos, tales como carboximetilcelulosa, metilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, o celulosa microcristalina, almidones y derivados, que incluyen, por ejemplo, almidón de maíz, almidón de tapioca, almidón de patata, almidón de arroz, almidón de trigo, y versiones modificadas de los mismos, tales como almidón pregelatinizado, almidón oxidado, almidón etilado, dextrinas de almidón o maltodextrina, pectina, polisacáridos derivados de algas marinas, tales como agar, alginatos, carragenina, y fucellarano, gomas de semillas, tales como goma guar y goma de algarrobo, polisacáridos derivados de la fermentación microbiana, tales como goma xantana y goma gellan, y polisacáridos que contienen nitrógeno, tales como quitosano; o mezcla de estos.

35 El polisacárido puede ser un polisacárido de goma exudada, tal como goma arábica, goma ghatti, goma karaya, o goma tragacanto.

40 Un ejemplo particular del polisacárido es la goma arábica. La goma arábica es una goma natural recolectada como exudados de diferentes especies de árboles de Acacia (Fang et al. 2010 (2010) Biomolecules: 11, 1398-1405); un polisacárido complejo que se ha usado ampliamente en una amplia gama de sectores industriales que incluyen pintura, pegamento, productos farmacéuticos, textiles y alimentos. Se cree que la goma arábica del árbol de Acacia es un polímero ramificado de galactosa, ramnosa, arabinosa, y ácido glucurónico como sales de calcio, magnesio y potasio con un peso mol. de aprox. 250.000. Se ha mostrado (Badar, K.V. et al. (2011) Recent Research in Science and Technology 3 (5) 6-7) que tiene un efecto sobre la germinación de semillas cuando las semillas de ciertas plantas se sumergen en disoluciones de goma arábica al 1% durante 24 horas antes de la germinación. Es más, el documento 45 WO02/058466 da a conocer que ciertas composiciones que comprenden combinaciones de polisacáridos y péptidos pueden aumentar los rendimientos de los cultivos.

50 La cantidad de polisacárido administrado a la herida de la planta debería ser suficiente para producir un efecto mejorado de fijación de nitrógeno cuando se combina con las bacterias fijadoras de nitrógeno y opcionalmente también con un tensioactivo. Esto variará dependiendo de diversos factores tales como el polisacárido particular usado, el tipo de planta que se está tratando, la naturaleza de la herida, la cepa particular de bacterias fijadoras de nitrógeno empleada, y el método de administración. Sin embargo, típicamente, se puede usar una composición que comprende de 0,1 a 1% p/p, por ejemplo de 0,1 a 0,5% p/p, tal como alrededor de 0,3% p/p de polisacárido.

55 Una composición usada en el método puede comprender tanto un polisacárido como un tensioactivo agrícolamente aceptable. Se ha encontrado que, en algunas circunstancias, estos componentes mejoran el efecto de las bacterias fijadoras de nitrógeno, y parecen trabajar juntos sinérgicamente para producir una mejora más significativa. Las plantas

tratadas con una composición que comprende estos componentes pueden mostrar un aumento del crecimiento, como lo demuestra el aumento del peso seco de las plantas tratadas.

Las nuevas composiciones y kits son aspectos de la invención. La presente invención incluye una composición o kit que comprende *Gluconacetobacter diazotrophicus*, un detergente no iónico y goma arábica (como se expone en la reivindicación 8).

La goma arábica se puede incluir, por ejemplo, en una concentración de 0,1 a 1% p/p. El tensioactivo es un detergente no iónico, por ejemplo un tensioactivo que está compuesto en un 70% por el ácido graso ácido oleico, y el resto por una combinación de ácidos linoleico, palmítico y esteárico. En una realización particular, la composición comprenderá de 0,0005 a 10% v/v de tensioactivo, por ejemplo de 0,0005 a 0,2% v/v de tensioactivo.

Puede usarse un kit para preparar una composición de la invención. En tal kit, la *Gluconacetobacter diazotrophicus* puede mantenerse separada de otros componentes de la composición, por ejemplo en recipientes separados. *Gluconacetobacter diazotrophicus* puede estar liofilizada. Los otros componentes pueden estar en forma de concentrado, para facilitar el almacenamiento o el transporte, listos para diluir, por ejemplo con agua, en el punto de uso. Los concentrados de esta naturaleza contendrán los mismos componentes que las composiciones, pero generalmente en niveles más altos. Así, por ejemplo, un concentrado puede contener de 1 a 10% p/p, por ejemplo de 1 a 5% p/p, tal como alrededor de 3% p/p de polisacárido, y una dilución diez veces dará como resultado la composición adecuada para uso en, por ejemplo, el método de la invención. De manera similar, el tensioactivo puede estar presente en una cantidad de 0,005 a 2% v/v en el concentrado. Se pueden incluir en el concentrado otros componentes, tal como, por ejemplo, un nutriente para *Gluconacetobacter diazotrophicus*, a la concentración requerida.

Se pueden usar kits de este tipo para producir una composición de la invención, que se puede usar directamente. En particular, cualquier concentrado se puede diluir con agua hasta un volumen apropiado, después de lo cual se le puede añadir *Gluconacetobacter diazotrophicus*.

La invención permite que se aplique y se suministre *Gluconacetobacter diazotrophicus* intracelular a una amplia gama de cultivos. En particular, estos pueden ser perennes, bienales, o anuales persistentes, incluyendo, entre otros, árboles frutales y arbustos (por ejemplo, arándanos, frambuesas y plantas de té), vides, cultivos forrajeros (alfalfa y pasto para ensilaje, heno o consumo directo del ganado) hierba recreativa y setos, silvicultura, horticultura y hierbas (por ejemplo, cebollino, espárragos, berenjena).

Se ha dado a conocer anteriormente que Gd puede mejorar la producción de cultivos ricos en sacarosa, tales como la remolacha azucarera o la caña de azúcar (documento WO2010/022517). Sin embargo, el solicitante ha encontrado que, al usar un método de la invención, se observa una mejora en los cultivos no ricos en sacarosa, y estos forman una realización particular de la invención.

En una realización particular, el método y la composición de la invención se aplican a hierba, tal como hierba recreativa, césped o hierba de pasto, inmediatamente o poco después de la siega. Este tratamiento conduce a un mayor crecimiento de la hierba, como es evidente por un aumento en el peso seco de la hierba inoculada frente a la no inoculada. Parece que *Gluconacetobacter diazotrophicus* es capaz de entrar en la hierba a través de las heridas resultantes del procedimiento de siega, y puede colonizar las plantas de gramíneas intracelularmente, lo que mejora las características de crecimiento.

Además, se ha descubierto que la colonización por Gd puede aumentar los niveles de clorofila en las plantas, y en particular en las especies de hierbas tales como pastos, hierbas recreativas, o céspedes. Dado que el aumento de la clorofila está relacionado no solo con el contenido de nitrógeno sino también con el nivel de verdor de las plantas, esta propiedad es muy deseable en aplicaciones como la hierba recreativa, en la que los altos niveles de verdor son beneficiosos.

La invención se describirá ahora en particular a modo de ejemplo con referencia a los diagramas adjuntos, en los que:

la Figura 1 es un gráfico que muestra los pesos secos medios (g) de hierba cortada inoculada y no inoculada;

la Figura 2 es un gráfico que muestra los pesos secos por encima del suelo de hierba cortada inoculada tratada con Gd y sacarosa, Tween y/o goma arábica, o combinaciones de los mismos;

la Figura 3 ilustra un ejemplo de preparación de propagación vegetativa de té, en la que (A) ilustra la eliminación del corte, y (B) es una representación esquemática de las subsecciones de cada corte tomadas para el aislamiento de ADN;

la Figura 4 muestra una imagen de un gel de productos de PCR obtenidos a partir de muestras de plantas de té que habían sido inoculadas con Gd; todas las bandas en las plantas de control se secuenciaron y se confirmaron como unión no específica. Las bandas secuenciadas de las plantas inoculadas se confirmaron como *Gluconacetobacter diazotrophicus*;

la Figura 5 es un gráfico que muestra los efectos de diversos tratamientos sobre la biomasa de hierba cortada;

la Figura 6 muestra los resultados de un ensayo para determinar el efecto de Gd sobre el número de inflorescencias de hierba; y

la Figura 7 es un gráfico que muestra los resultados de tratamientos con diversas composiciones sobre la biomasa de hierba cortada.

- 5 Los ejemplos se presentan con fines ilustrativos. No pretenden ser exhaustivos ni limitar la invención:

Ejemplo 1: Aplicación a hierba cortada

Metodología

Cultivo de *G. diazotrophicus*:

- 10 *G. diazotrophicus* cepa IMI 501986 (ahora IMI 50998), con el plásmido pRGS561 que expresa GUS, se cultivó en medio ATGUS, [agar al 0,8% (p/v), extracto de levadura ($2,7 \text{ g l}^{-1}$), glucosa ($2,7 \text{ g l}^{-1}$), manitol ($1,8 \text{ g l}^{-1}$), amortiguador MES ($4,4 \text{ g l}^{-1}$), K_2HPO_4 ($4,8 \text{ g l}^{-1}$), y KH_2PO_4 ($0,65 \text{ g l}^{-1}$), pH 6,5] según se requiera. La expresión del gen de la β -glucuronidasa (*gusA*) se analizó sembrando en medio ATGUS que contenía X-Gluc (sal de ciclohexilamonio del ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-glucurónico) a 50 mg l^{-1} ; la formación de colonias de color azul oscuro indicó la expresión del gen *gusA*.

- 15 Procedimientos de inoculación:

- Se preparó una suspensión acuosa de la *G. diazotrophicus* para dar una densidad óptica a 600 nm de 1,1, c. 10^9 unidades formadoras de colonias (UFC) por mililitro. El número de UFC se determinó por dilución en serie, sembrando en medio ATGUS (con antibióticos según sea apropiado) y contando las colonias bacterianas después de 4 días de incubación en placas de Petri (28°C , oscuridad). La suspensión se diluyó hasta 10^{-4} para producir una disolución que contenía aproximadamente 100 bacterias por ml lista para rociar como se describe a continuación.

- 20 Se sembró un peso estándar de 0,5 g de semillas de hierba *Lolium perenne* variedad Cassiopeia en bandejas de plántulas de compost John Innes No. 1, y se cubrieron ligeramente con compost.

- 25 Las bandejas individuales se colocaron en bandejas más grandes, y se les proporcionó agua adecuada en una sala de crecimiento en un ciclo de 16/8h día/noche $21^\circ\text{C}/15^\circ\text{C}$, durante 20 días. Posteriormente la hierba se cortó hasta una altura de 2 cm por encima del nivel del suelo usando unas tijeras (se retiraron los recortes), y se aplicaron los siguientes tratamientos usando un pulverizador manual doméstico:

Tratamientos del Experimento 1

Control de agua + 3% sacarosa

Gd + agua + 3% sacarosa

- 30 Tratamientos del Experimento 2

Gd + agua

Gd + agua + 3% sacarosa

Gd + agua + 0,1% Tween

Gd + agua + 0,3% goma arábica

- 35 Gd + agua + 3% sacarosa + 0,1% Tween

Gd + agua + 3% sacarosa + 0,3% goma arábica

Gd + agua + 3% sacarosa + 0,1% Tween + 0,3% goma arábica

Peso seco de plántulas germinadas

- 40 Las plántulas se retiraron del agar con fórceps, y todo el agar restante se eliminó de las raíces por lavado. Cada plántula se colocó en una bolsa de papel y se colocó en un horno a 80°C durante 48 horas, y después se pesó.

Los resultados de los Experimentos 1 y Experimento 2 se muestran en las Figuras 1 y 2 respectivamente.

Los resultados de la Figura 1 muestran un aumento significativo en el peso seco medio de la hierba (0,09676 g para el gráfico sin inocular y 0,1276 g para el inoculado). Estos pesos secos fueron significativamente diferentes a $P < 0,01$. Por lo tanto, la inoculación de esta manera conduce claramente a una mejora significativa del crecimiento.

Estos resultados que se muestran en la Figura 2 muestran una diferencia significativa ($P < 0,001$) entre Gd/S/T/GA y el siguiente peso seco más alto (Gd/T) y Gd/S/T, lo que demuestra un efecto sinérgico de la combinación de tres componentes. Gd y Gd/S no son significativamente diferentes a $P = 0,05$.

Ejemplo 2: Colonización del té (*Camellia sinensis*) por *Gluconacetobacter diazotrophicus* (*Azoticus*)

5 Reproducción vegetativa a partir de un esqueje de tallo

El medio estándar de propagación vegetativa de los clones de té es un esqueje de una sola hoja. A partir de tallos más grandes que comprenden aproximadamente cuatro a seis nudos y una punta de brote, se seleccionaron secciones de tallo y hoja en función de la salud del tejido (es decir, libre de insectos y enfermedades). La sección escogida para el esqueje fue entre madera roja y verde, según lo recomendado por Yamasaki et al. Soil and Crop Management, (2008) SCM-23). Se ha encontrado que los brotes recientemente maduros que contienen una corteza ligeramente enrojecida adyacente a las hojas maduras con yemas axilares que se rompen activamente dan como resultado el mejor éxito de enraizamiento.

De las secciones preferidas, se seleccionó una muestra que constaba de una sección de tallo de 3-5 cm y una hoja sana. Cada sección de tallo se extirpó con un corte diagonal (1) aproximadamente 0,5 cm por encima de la hoja (2) y otro corte diagonal debajo de la hoja alrededor de un entrenudo (3) para evitar pellizcos o magulladuras en el sitio de la herida (véase la Figura 3A).

La parte inferior de cada esqueje de tallo de té se sumergió en una disolución de ácido indol-butírico al 1% y se colocó en recipientes individuales; plantándose el esqueje con el tallo recto o ligeramente inclinado para que la hoja no toque el suelo. Cada maceta contenía arena y mezcla para esquejes John Innes number 1 en una relación de 4:1, saturada con agua. En la superficie superior del corte de cada esqueje, se aplicaron 20 μ l de agua o 20 μ l de Gd a $2,5 \times 10^5$ ufc/ml en agua, y la humedad de cada muestra se mantuvo cubriendo cada recipiente con una lámina de plástico y rociándolas ligeramente con agua.

Después de 3 meses de crecimiento, y para confirmar la colonización exitosa de los esquejes de tallo con Gd, los esquejes de tallo sin inocular e inoculados se retiraron de las macetas. Cada esqueje se subdividió en secciones, las cuales eran (a) la parte superior del brote, incluido el sitio de inoculación (4) en la (Figura 3B), (b) la sección nodal (5) en la Figura 3B, y (c) la sección inferior del tallo, incluyendo cualquier tejido radicular (6) en la Figura 3B. Estas secciones se congelaron entonces en nitrógeno líquido.

El aislamiento de ADN de cada sección del esqueje (es decir, 4, 5 y 6 en la Figura 3B) se llevó a cabo usando el reactivo TRIzol según el protocolo del fabricante, y se llevó a cabo la PCR. La reacción de PCR llevada a cabo fue una reacción de dos etapas según lo descrito por Tian et al., (2009); la primer etapa usando GDI-25F (5'-TAGTGGCGGACGGGTGAGTAACG-3') y GDI-923R (5'-CCTTGCGGGAACAGCCATCTC-3') que amplificó un producto de 899 pb que contenía el amplicón de los cebadores GDI139F (5'TGAGTAACGCGTAGGGATCTG-3') y GDI916R (5'-GGAAACAGCCATTCTGACTG-3'), este último diseñado en base a la información de secuencia de 16S rDNA disponible en la base de datos GenBank. Después de un etapa de desnaturalización inicial a 95°C durante 3 minutos, se ejecutó el siguiente perfil de temperatura 32 veces; desnaturalización durante 20 segundos a 95°C, hibridación durante 45 segundos a 55°C, y extensión durante 20 segundos a 72°C, con un etapa final de extensión de 5 minutos a 72°C. Después, se tomó un microlitro de este producto de PCR y se usó como plantilla para la segunda etapa de la PCR usando GDI39F y GDI916R. Las modificaciones a los parámetros en la segunda ronda incluyeron aumentar la temperatura de hibridación hasta 62°C durante 15 segundos y aumentar el número de ciclos a 39. Los productos de amplificación de PCR se analizaron en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio, y se secuenciaron para confirmar la identidad del producto (Figura 4.).

Curiosamente, *AzGd* no se detectó en la sección 4 del esqueje de té, lo que sugiere que *AzGd* se movió de forma basipétalo desde el sitio de la herida después de la inoculación, detectándose en las secciones 5 y 6 respectivamente.

La secuenciación y los resultados posteriores de BLAST confirmaron que las bandas observadas en la sección 1 de las plantas de control se debieron a la unión no específica de los conjuntos de cebadores usados, identificándose las 4 bandas observadas en las secciones 2 y 3 del tejido inoculado como *Gluconacetobacter diazotrophicus Pal5* (al 100% de identificación, 86% de cobertura de consultas, y un valor E de $7e-04$). Los resultados sugieren que *AzGd*, aunque con un bajo número de copias en el tejido inoculado, colonizó con éxito *Camellia sinensis* tras la inoculación del sitio de la herida. Este es posiblemente el primer ejemplo de colonización de una planta perenne por Gd.

50 Ejemplo 3: Investigación del efecto del tratamiento sobre la biomasa de hierba

La hierba se cultivó en una cámara de crecimiento de plantas (Fitotron®) (23°C/15°C a 65% de humedad) en bandejas de semillas usando compost John Innes No. 1, durante 2 semanas. Después, se cortó a una altura de 8 cm, y se pulverizó inmediatamente con 10 ml de tratamiento como se expone a continuación, usando un pulverizador doméstico.

Tratamientos

1. Agua
2. 3% sacarosa + 0,1% Tween + 0,3% goma arábica
3. Agua + Gd ($2,5 \times 10^5$ ufc/ml)
- 5 4. Agua + 3% sacarosa + 0,1% Tween + 0,3% goma arábica + Gd ($2,5 \times 10^3$ ufc/ml)
5. Agua + 3% sacarosa + 0,1% Tween + 0,3% goma arábica + Gd ($2,5 \times 10^4$ ufc/ml)
6. Agua + 3% sacarosa + 0,1% Tween + 0,3% goma arábica + Gd ($2,5 \times 10^5$ ufc/ml)
7. Agua + 3% sacarosa + 0,1% Tween + 0,3% goma arábica + Gd ($2,5 \times 10^6$ ufc/ml)
8. Agua + 3% sacarosa + 0,1% Tween + 0,3% goma arábica + Gd ($2,5 \times 10^7$ ufc/ml)
- 10 La hierba se devolvió a la Fitotron durante 2 semanas más en condiciones de crecimiento similares. 5 plantas, escogidas al azar, se cortaron al nivel del suelo para formar una muestra, y se pesaron. Esto se repitió cinco veces más para dar seis muestras en total para cada tratamiento. Estas muestras se secaron en estufa durante 48 horas, y se pesaron.
- 15 Los resultados se muestran en la Figura 5. Estos resultados muestran que, siempre que esté presente algo de sacarosa para apoyar el crecimiento de Gd, la biomasa de la hierba aumentó con la adición de Gd, dependiendo de la formulación. Además, el incremento fue dependiente de la dosis, observándose un crecimiento óptimo a $2,5 \times 10^6$ ufc/ml. Por lo tanto, tal dosis puede ser beneficiosa si la hierba tratada es hierba de pasto, en la que es beneficioso maximizar la biomasa. Sin embargo, si la hierba tratada es hierba recreativa o césped, puede ser beneficiosa una menor biomasa con mayor verdor, ya que puede mejorar el aspecto sin aumentar la necesidad de cortar o segar más.
- 20 En este caso, puede usarse una dosis menor que o mayor que $2,5 \times 10^6$ ufc/ml.

Ejemplo 4: Prueba de campo

- Una formulación que comprende agua + 3% sacarosa + 0,1% Tween + 0,3% goma arábica + Gd ($2,5 \times 10^5$ ufc/ml) se aplicó a una única parcela de hierba cortada de 1 m² (césped *Lolium perenne* establecido) con respecto a una parcela de hierba cortada sin inocular de 1 m² tratada solo con agua (control).
- 25 La formulación y el agua se aplicaron, dentro de los 30 minutos posteriores a que la hierba se cortara recientemente, usando un pulverizador de niebla doméstico para escurrir. La parcela de control se protegió de la parcela de tratamiento mediante una pantalla de plástico. La aplicación se realizó al final de la tarde en aire quieto.
 - Las parcelas de 1 m² se submuestrearon usando un cuadrante de alambre cuadrado de 20 cm contando el número de inflorescencias completamente extendidas y completamente formadas.
 - 30 Los resultados de cada cuadrado de 20 cm dentro de cada parcela se promediaron, y los resultados se muestran en la Figura 6. Está claro que el tratamiento con Gd, aplicado de esta manera, tuvo un impacto sustancial en el crecimiento de las flores.

Ejemplo 5: Comparación de componentes de composición

- 35 El método del Ejemplo 3 se repitió usando diversas composiciones que incluían componentes individuales de la composición usada en ese experimento. Específicamente, las composiciones usadas en este experimento fueron las siguientes:

Tratamientos

1. Agua
2. Agua + Gd ($2,5 \times 10^5$ ufc/ml)
- 40 3. Agua + 3% sacarosa + 0,1% Tween + 0,3% goma arábica + Gd ($2,5 \times 10^5$ ufc/ml)
4. 0,3% goma arábica + Gd ($2,5 \times 10^5$ ufc/ml)
5. 3% Sacarosa + Gd ($2,5 \times 10^5$ ufc/ml)
6. 0,1% Tween + Gd ($2,5 \times 10^5$ ufc/ml)

- 45 Se cultivó hierba AberGlyn durante 2 semanas en suelo John Innes No. 1 en una cámara de crecimiento de plantas (Fitotron®) a 23/15°C, 80% de humedad. La hierba se cortó hasta una altura de 8 cm con tijeras, los recortes se

retiraron, y la hierba se pulverizó inmediatamente con el tratamiento de 10 ml usando un pulverizador doméstico. La hierba se devolvió a la cámara de crecimiento de plantas durante dos semanas más.

5 Se escogieron cinco plantas al azar de la bandeja y se juntaron para hacer una muestra, y se pesaron. Esto se repitió cinco veces más, por lo que se tomó un total de seis muestras por tratamiento. La hierba se secó durante 48 horas a 80°C, y entonces se pesó.

10 Los resultados se muestran en la Figura 7. Este experimento muestra que el componente usado sí tiene un efecto sobre el crecimiento de la hierba. En este ejemplo, el tensioactivo dio el mayor aumento de peso seco. La goma arábica mostró una mejora marginal solo sobre el control, posiblemente debido al hecho de que el tensioactivo puede ser necesario para ayudar en la propagación del Gd en la planta y ayuda al líquido a entrar en las heridas de la hierba (aunque en esta ocasión, la combinación no mostró la mejora esperada). Nuevamente, el tratamiento con agua + Gd fue similar al control, lo que indica que Gd necesita la adición de al menos algunos de estos componentes para colonizar las heridas.

REIVINDICACIONES

1. Un método para inocular una planta en crecimiento con *Gluconacetobacter diazotrophicus*, que comprende herir dicha planta por encima del nivel del suelo en una etapa preliminar, y, posteriormente a la etapa preliminar, administrar el *Gluconacetobacter diazotrophicus* a la herida de la planta producida por dicha herida.
- 5 2. Un método según la reivindicación 1; en el que *Gluconacetobacter diazotrophicus* se administra dentro de las 48 horas posteriores a la etapa de la herida.
3. Un método según la reivindicación 2; en el que *Gluconacetobacter diazotrophicus* se administra dentro de 1 a 48 horas de la etapa preliminar.
- 10 4. Un método según cualquier reivindicación anterior; en el que las heridas se producen mediante siega, corte, poda, o recolección.
5. Un método según cualquier reivindicación anterior; en el que la herida es una herida en un tallo o una hoja de la planta.
6. Un método según cualquier reivindicación anterior; en el que la planta es una planta herbácea.
7. Un método según la reivindicación 6; en el que la planta herbácea es una planta de césped o una planta de pasto.
- 15 8. Una composición o kit que comprende *Gluconacetobacter diazotrophicus*, un tensioactivo que es detergente no iónico, y goma arábiga.
9. Una cepa de *Gluconacetobacter diazotrophicus* como se depositó en CABI en el Reino Unido con el número de acceso IMI 504998.
- 20 10. Una cepa de *Gluconacetobacter diazotrophicus* como se depositó en CABI en el Reino Unido con el número de acceso IMI 504958.
11. Una composición o kit según la reivindicación 8, que comprende una cepa según la reivindicación 9 o 10.
12. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7; en el que *Gluconacetobacter diazotrophicus* se administra a la planta mediante una composición, kit o cepa según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11.
13. Una planta que comprende una composición o cepa según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11.

25

Figura 1

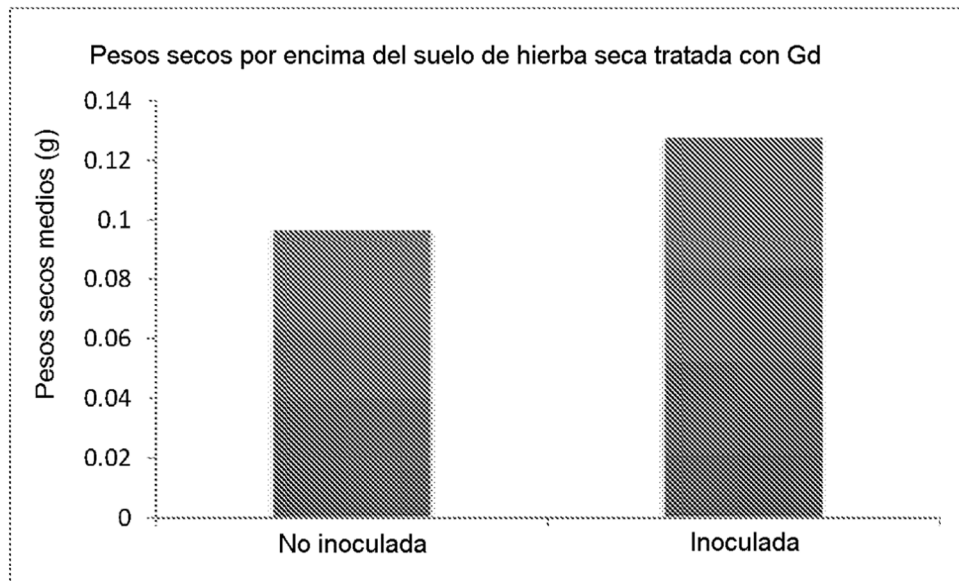


Figura 2

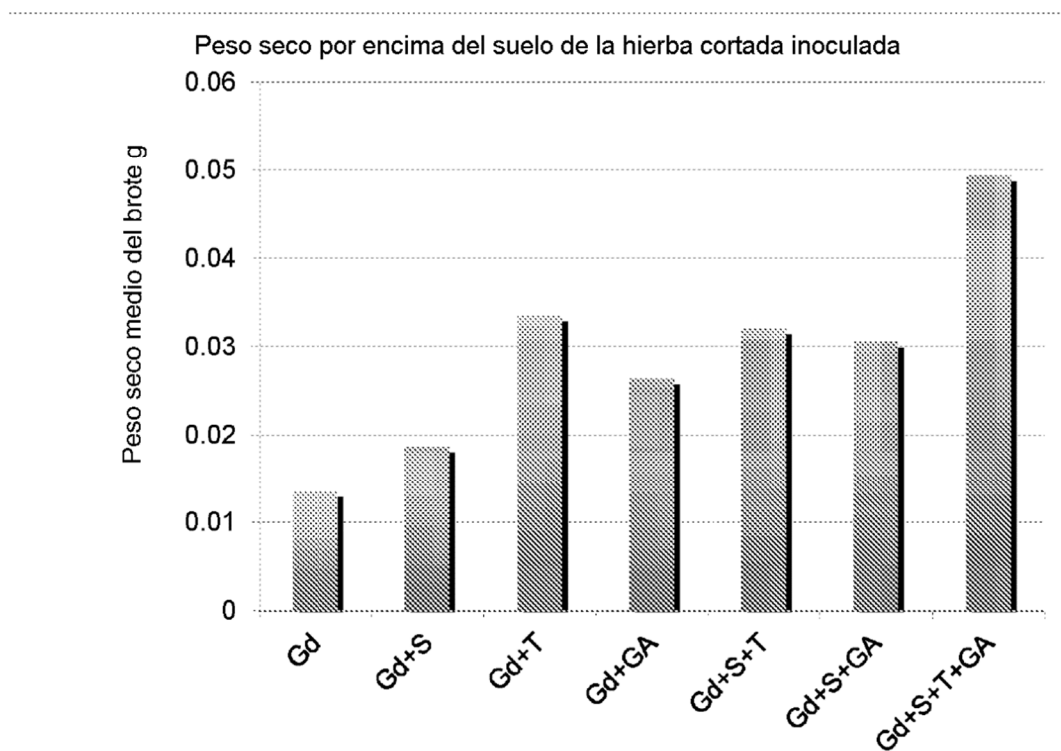


Figura 3

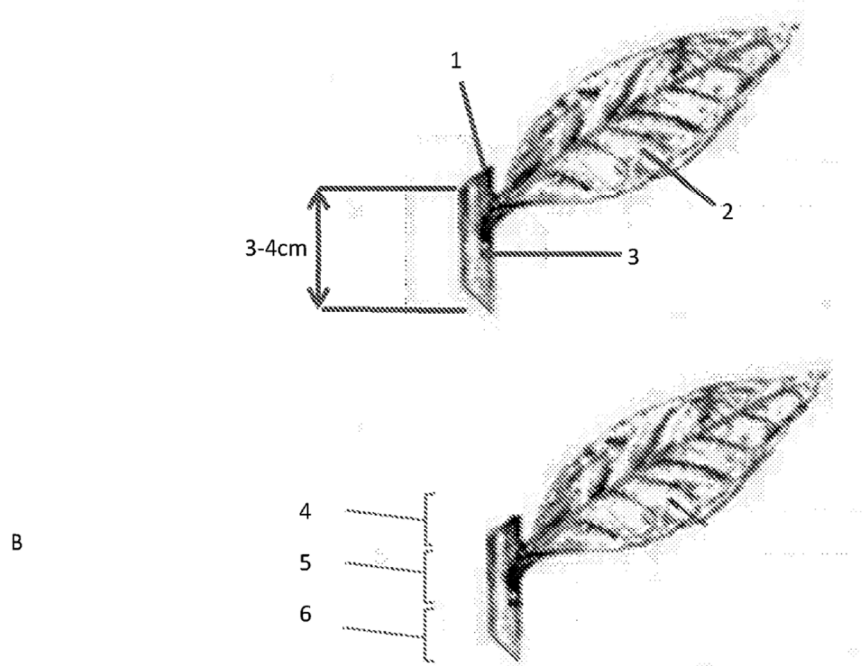


Figura 4

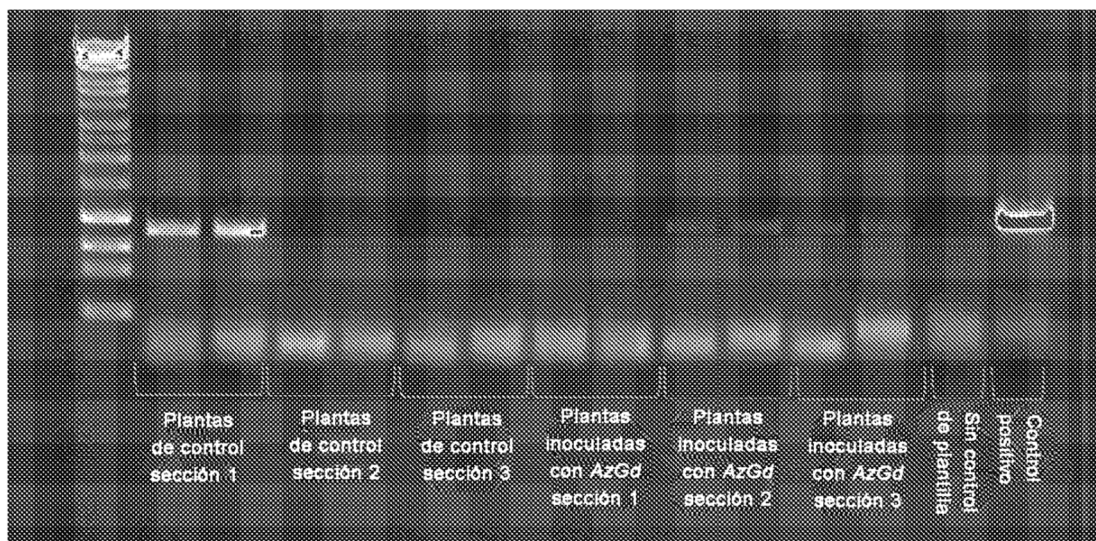


Figura 5

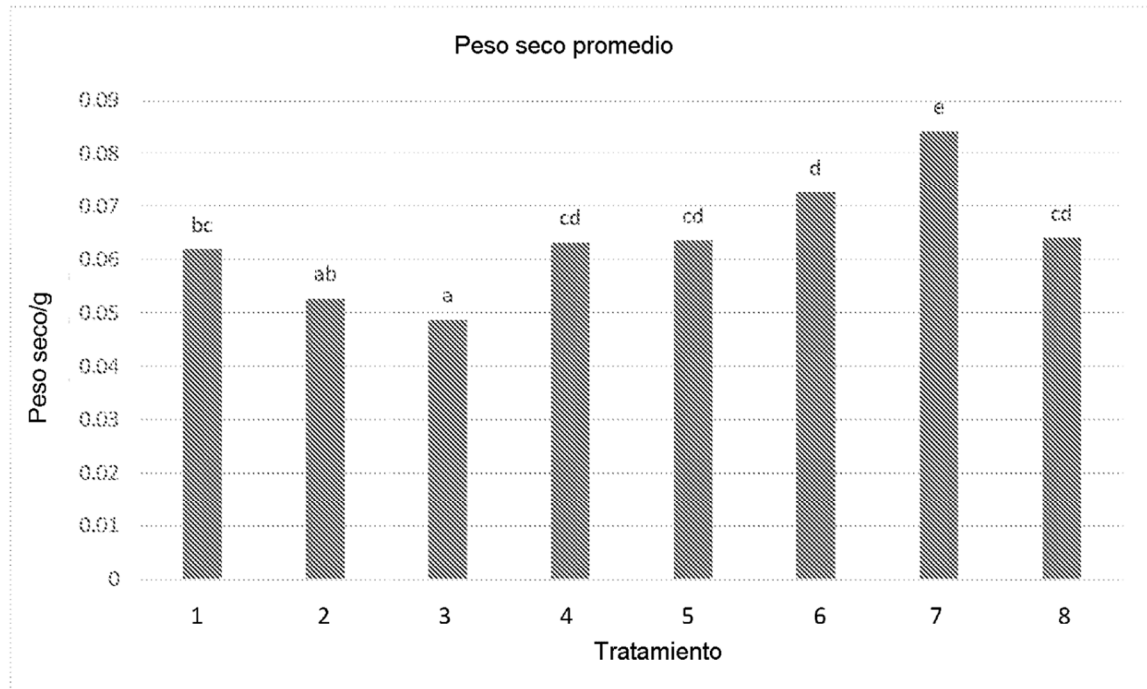


Figura 6

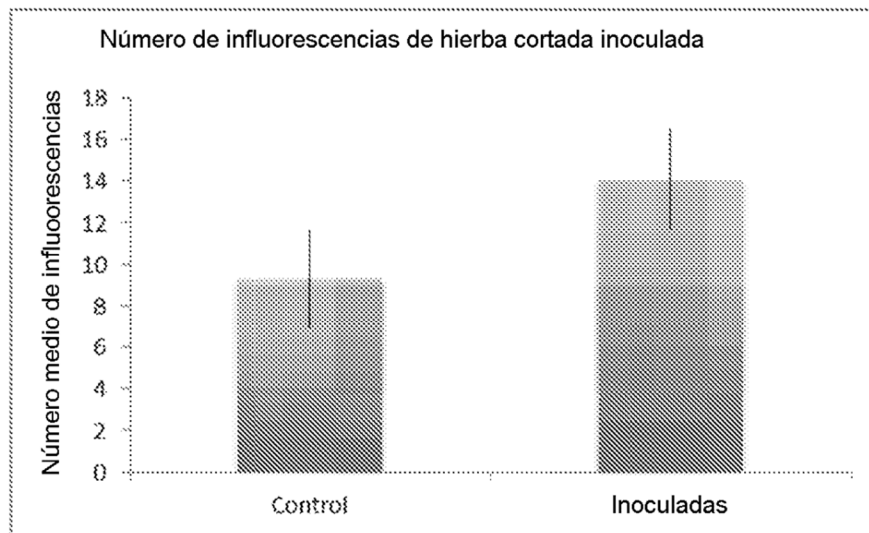


Figura 7

