(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 976 115**

(21) Número de solicitud: 202430247

(51) Int. Cl.:

C12N 1/14 (2006.01)
A01N 63/36 (2010.01)
C12R 1/80 (2006.01)

(12) SOLICITUD DE PATENTE A1

(22) Fecha de presentación:

03.04.2024

(43) Fecha de publicación de la solicitud:

23.07.2024

(71) Solicitantes:

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID (50.0%)
Avda. Ramiro de Maeztu 7
28040 Madrid (Madrid) ES y
AGENCIA ESTATAL CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS, M.P. (50.0%)

(72) Inventor/es:

DEL POZO BENITO, Juan Carlos;
CABRERA CHAVES, Javier;
SACRISTÁN BENAYAS, María y
CONESA QUINTANA, Carlos Manuel

(74) Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones:

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

(54) Título: **MÉTODO PARA PROTEGER FRENTE AL ESTRÉS E INCREMENTAR EL CRECIMIENTO DE LAS PLANTAS**

(57) Resumen:

Método para proteger a las plantas de distintos tipos de estrés y/o aumentar el número de raíces laterales en las plantas, basado en el uso de un microorganismo de la especie *Penicillium melinii*, y de cepas concretas de la misma. La promoción del crecimiento y desarrollo de plantas se materializa tanto en condiciones de crecimiento óptimas como en condiciones de distintos tipos de estrés.

ES 2 976 115 A1

DESCRIPCIÓN

MÉTODO PARA PROTEGER FRENTE AL ESTRÉS E INCREMENTAR EL CRECIMIENTO DE LAS PLANTAS

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención pertenece al campo del sector agronómico, en particular al campo de métodos de promoción del crecimiento y desarrollo de plantas con énfasis en el desarrollo radicular, tanto en condiciones de crecimiento óptimas como en condiciones de distintos tipos de estrés.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

En el sector agronómico existe enorme interés en conseguir incrementar el crecimiento de las plantas, minimizando el uso de fertilizantes químicos y con una mayor sostenibilidad. Este interés adquiere particular importancia a la hora de mejorar la tolerancia o aliviar el estrés producido en las plantas cuando éstas no crecen en condiciones óptimas. El estrés impide que las plantas de cultivo alcancen todo su potencial genético y causa importantes pérdidas de rendimiento en todo el mundo. Es bien sabido que un buen desarrollo radicular es crucial para la absorción eficiente de agua y nutrientes por la planta, sobre todo en los primeros estadios de desarrollo, especialmente bajo condiciones de estrés como sequía, salinidad y temperaturas extremas. Mejorar el desarrollo radicular de la planta puede, por tanto, ser un factor clave para mejorar la tolerancia de las plantas a estreses producidos por condiciones nutricionales y ambientales desfavorables (Koevoets, I. T. et al., 2016, Front. Plant Sci. 7, 1335. doi: 10.3389/fpls.2016.01335). Por ejemplo, el ángulo de desarrollo de las raíces de maíz modifica su capacidad de captación de nitrógeno (Dathe, A et al., 2016, Ann Bot. 2016 118(3), 401-14- doi: 10.1093/aob/mcw112). Por otro lado, la captación de fósforo está relacionada con una mayor densidad de raíces laterales en la raíz principal de maíz (Jia, X. et al., 2018, J Exp Bot. 69(20). 4961-4970. Doi: 10.1093/jxb/ery252).

Las plantas en la naturaleza establecen asociaciones simbióticas con microorganismos llamados mutualistas que les confieren beneficios en su crecimiento, supervivencia y multiplicación. Estos microorganismos se pueden aislar, y en ocasiones ser empleados para mejorar el rendimiento de cultivos. Por ejemplo, la colonización de raíces de colza por *Serendipita vermifera*, *Alternaria alternata* o *Leptosphaeria biglobosa*, aumenta

significativamente la biomasa de raíces y tallos (Dolatabadi, H. K. y Goltapeh, E. M., 2013, J. Hortic. Res. 21, 115–124. doi: 10.2478/johr-2013-0030; Zhang, Q. et al., 2014, Biol. Control 72, 98–108. doi: 10.1016/J.BIOCONTROL.2014.02.018). Esta mejora del crecimiento puede deberse a una mejora en la eficiencia de la planta para captar o asimilar nutrientes. Por ejemplo, *Aspergillus niger* y *Trichoderma harzianum* en las raíces de trigo producen amonio y lo transfieren a la planta, aumentando su crecimiento (Ripa *et al.*, 2019, Biomed Res Int 2019:6105865–6105812. doi.org/10.1155/2019/6105865). *Metarhizium brunneum* aumenta el desarrollo radicular y la biomasa de la parte aérea, así como el contenido en fósforo, de plantas de patata (Krell V *et al.*, 2018, Fungal Ecol 34:43–49. doi.org/10.1016/j.funeco.2018.04.002). Otra ventaja conferida por los microorganismos beneficiosos puede ser el aumento de la tolerancia de la planta a estreses como la salinidad o toxicidad del medio o la escasez extrema de nutrientes. Por ejemplo, *T. virens* aumenta el número de raíces laterales de *Arabidopsis*, haciendo la planta más tolerante a la salinidad (Contreras-Cornejo, H. A *et al.*, 2009, Plant Physiol. 149, 1579–1592. doi: 10.1104/PP.108.130369). Como ilustran estos ejemplos, diferentes microorganismos pueden tener mecanismos de acción distintos que sirven para mejorar de manera particular distintos aspectos del crecimiento de las plantas. Es necesario, por tanto, encontrar microorganismos que puedan mejorar el crecimiento de las plantas en distintas condiciones. Especialmente, si estas condiciones no son óptimas para el crecimiento de la planta, para aliviar el estrés producido en esas condiciones y restaurar su productividad. Entre los modos de acción del microrganismo para mejorar la tolerancia al estrés de las plantas se puede incluir el incremento del desarrollo del sistema radicular.

Mohamed Tarroum *et al.* (2021), Plants, 10, 784, https://doi.org/10.3390/plants10040784, muestra un conjunto de seis cepas de hongos de distintas especies aisladas de la rizosfera de una hierba halófita, *Aeluropus littoralis,* y analiza las actividades promotoras de las mismas sobre el crecimiento de plantas de tabaco. Las seis cepas mejoraron el crecimiento de plantas de tabaco cultivadas al ser añadidas al medio de cultivo hidropónico. Además, cuando los filtrados de cultivos libres de células (CFF) se agregaron a 0.5 NS (solución nutritiva) en un sistema hidropónico cerrado, los mayores efectos en las plántulas de tabaco (peso seco de parte aérea y raíz, número de hojas y longitud de la raíz) se observaron al añadir CFF de las cepas A5.1 y A8, que presumiblemente pertenecen a las especies *Byssochlamys spectabilis* y *Penicillium melinii,* en base a la similitud de un único marcador genético (ITS), que no es completamente determinante en la identificación taxonómica, con las secuencias de dichas especies obtenidas de la base de datos NCBI del Genebank. Se comprobó que los CFF de todas las cepas, cuando se agregan a 0.5 NS, pueden sustituir parte de los insumos químicos,

con una producción de biomasa igual o significativamente mejor que la producida en NS completa. Los autores atribuyen la capacidad de promover el crecimiento de las plantas a la producción de sustancias relacionadas con el ácido indolacético (auxinas), hormona relacionada con el crecimiento, por parte de los hongos. Además, los autores muestran que en las plantas de tabaco tratadas también se induce la expresión de los genes Tryp1 and YUCCA6-like, implicados en la biosíntesis de la fitohormona auxina. Con estos resultados, en este trabajo se propone el uso de la cepa A8 de *P. melinii* o sus filtrados para sustituir parte de la fertilización química necesaria para el crecimiento óptimo de una planta, pero no como aliviador de estrés. Los únicos parámetros de la raíz que se midieron fueron relativos al crecimiento (peso o longitud), pero no se analizaron otros parámetros del desarrollo relacionados con la formación de raíces laterales. Tampoco se midió este efecto en condiciones de estrés. A este respecto, la publicación muestra que la temperatura alta (40ºC) o las condiciones de alta salinidad (mayor o igual a 100 mM de NaCl en el medio de cultivo), inhiben el crecimiento de la cepa A8 de la especie *P. melinii*.

WO2014046553A1 (BIOCONSORTIA INC) divulga un método para seleccionar microorganismos capaces de impartir propiedades beneficiosas a las plantas. En el ejemplo 4, se describe el uso de este método para obtener microrganismos que mejoren el crecimiento de plantas de raigrás cultivadas en condiciones favorables para el crecimiento de la planta. Entre los microrganismos ensayados se cita *P. melinii*, (Tabla 2) aunque este microrganismo no es de los que presenta los mejores resultados, por lo que no se selecciona para la siguiente etapa. Además, las condiciones utilizadas para la selección de los microorganismos no incluían la aplicación de estrés a las plantas, ya que estas se cultivaron en condiciones favorables de crecimiento.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS.

Figura 1. Aumento del crecimiento radicular en plantas tratadas con CECT 21242 respecto a las plantas no tratadas (control), bajo estrés nutricional por carencia de fósforo inorgánico (Pi).

Figura 2. A. Árbol filogenético utilizando el método de máxima verosimilitud (Maximum likelihood) de las regiones concatenadas RPB2, CAM y BenA de 94 cepas del género *Penicillium* y otros géneros cercanos para determinar la posición taxonómica de la cepa CECT 21242, siguiendo la metodología descrita en Houbraken et al., 2020 (Studies in Mycology 95: 5–169). *Hamigera avellanea* fue seleccionada como outgroup. B. Detalle del cluster donde la cepa CECT 21242 agrupa con las secuencias de otras cepas de la especie *Penicillium melinii*

Figura 3. Aumento relativo de sitios de iniciación de ramificación (o su término en inglés "pre-branching sites", PBS) en raíces de plantas no tratadas (Blanco) y plantas tratadas con CECT 21242 cultivadas con distintas concentraciones de fósforo inorgánico en el medio (Pi) (A, B). Incremento de la señalización por auxinas en la raíz de plantas DR5::LUC inoculadas con diferentes hongos (C).

Figura 4. El tratamiento con CECT 21242 aumenta el crecimiento radicular en plantas sometidas a la combinación de estrés lumínico a la raíz y estrés por exceso (625µM) o defecto (20µM) de fósforo inorgánico en el medio de cultivo.

Figura 5. El extracto de CECT 21242 (micelio) o del filtrado del cultivo de CECT 21242 (filtrado) aumentan la longitud (Figura 5A) y número de raíces laterales (Figura 5B) de plantas de *Arabidopsis thaliana* cultivadas en carencia de fosfato y con estrés lumínico por iluminación en la raíz.

Figura 6. El tratamiento con CECT 21242 aumenta el desarrollo radicular en plantas cultivadas a 32 ºC (estrés por alta temperatura) y en condiciones de carencia de fosfato (Pi) en el medio de cultivo (20 µM).

Figura 7. Aumento del crecimiento radicular (Figura 7A y C) y la biomasa de la parte aérea (Figura B y D) en plantas de *Arabidopsis thaliana* tratadas con CECT 21242 y cultivadas a 22 ºC o 32 ºC.

Figura 8. El tratamiento con CECT 21242 aumenta el grosor y longitud de las raíces laterales (8A), el área ocupada por el sistema radicular (8B) y la biomasa de la parte aérea (8C) de plantas de cebada.

Figura 9. El tratamiento con CECT 21242 aumenta el desarrollo de la parte aérea en plantas de cebada (A y B) y maíz (C y D) cultivadas en maceta en invernadero durante tres semanas.

Figura 10. Curvas de crecimiento de plantas de maíz cultivadas en suelo agrícola tratadas con CECT 21242 o con agua (control) y mantenidas en invernadero durante 6 semanas.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

La presente invención ha identificado, mediante el cribado de 10 cepas de diferentes especies de hongos, la cepa CECT 21242 de la especie *Penicillum melinii* que, sorprendentemente, aumenta la capacidad de desarrollo de raíces laterales de la planta y sirve como aliviador de estrés de la planta. El aumento de desarrollo radicular se produce en condiciones de estrés por carencia o por exceso de fósforo, por estrés lumínico sobre la raíz, o por estrés térmico, o combinando varios de estos estreses. Además, la aplicación de extractos o de filtrados del hongo también aumentó la longitud y número de raíces laterales de la planta en condiciones de estrés. Por tanto, los datos indican que las plantas tratadas con *Penicillium melinii* o sus extractos o filtrados adquieren tolerancia a diferentes tipos de estrés. Además, las plantas tratadas con la cepa CECT 21242 de *Penicillium melinii* aumentan el desarrollo de la raíz y el crecimiento de la parte aérea tanto en condiciones de estrés como en condiciones óptimas en cultivo *in vitro* o cultivando las plantas en tierra agrícola

La identificación de la especie se ha realizado siguiendo la descripción publicada por Houbraken et al. 2020 Studies in Mycology 95: 5–169, utilizando secuencias parciales de los genes que codifican para las proteínas beta-tubulina (BenA Partial beta-tubulin), calmodulina (CaM) y RNA polimerasa II (RPB2). También se ha utilizado el método de similitud del marcador genético (ITS) con las secuencias de nucleótidos obtenidas de la base de datos NCBI del Genebank, obteniéndose la mayor similitud (100% de identidad nucleotídica) con la secuencia con número de accesión NR_077155.1, “Penicillium melinii FRR 2041 ITS region; from TYPE material” (a fecha 22/03/2024). Las secuencias empleadas para la identificación de la cepa de la presente invención son las de los tres marcadores utilizados para la filogenia (SEQ. ID. No 1 a 3) y la de la ITS (SEQ. ID No 4).

Nada en el estado de la técnica apuntaba a que un tratamiento basado en ese microorganismo podría desempeñar un papel preventivo o aliviador de estrés de las plantas. Sorprendentemente, el aumento de raíces laterales en la planta no está producido por un aumento de actividad de la auxina, al contrario de lo descrito por Mohamed Tarroum *et al.* (2021), que indican un aumento de la biosíntesis de esta hormona, tanto por el hongo como por la planta tratada.

Además, había evidencias que habrían disuadido de emplear ese tratamiento, ya sea por la ausencia de efectos especialmente destacables de *Penicillum melinii* en el crecimiento de plantas de raigrás (WO2014046553A1), así como por el papel negativo que juegan distintos

tipos de estrés sobre el crecimiento de dicho microorganismo (Mohamed Tarroum *et al.* (2021).

Un primer aspecto de la presente invención es un método proteger o aliviar a las plantas de distintos tipos de estrés y/ o aumentar el número de raíces laterales en las plantas, caracterizado por comprender una etapa de poner en contacto dichas plantas con una composición que comprende un microorganismo de la especie *Penicillium melinii*, y/o cepas de dicha especie, y/o extractos de dicha especie o cepa, y/o filtrados de dicha especie o cepa.

En adelante este es el método de la invención, y el término "microorganismo de la invención" hace referencia al microorganismo de la especie *Penicillium melinii* y/o la cepa CECT 21242 de dicha especie.

Como aumento de la formación de raíces laterales de la planta se entiende una mayor longitud del sistema radicular, que comprende raíz principal y raíces laterales, y/o un número mayor de zonas con capacidad de formar una raíz lateral (sitios de iniciación de ramificación o su término en inglés "pre-branching sites", PBS) a lo largo de la raíz principal.

Se entiende por estrés al conjunto de procesos que sufre la planta al crecer en condiciones ambientales que no son adecuadas y que se manifiesta en una reducción de crecimiento respecto al que hubiera alcanzado en condiciones óptimas. Un ejemplo de estrés es la carencia extrema de nutrientes, como por ejemplo el fósforo. Las condiciones óptimas son aquéllas que permiten un crecimiento adecuado de la planta, según puede apreciar cualquier experto en la materia.

Un segundo aspecto de la presente invención consiste en el uso de un microorganismo de la especie *Penicillium melinii*, y/o cepas de dicha especie, y/o extractos de dicha especie o cepa, y/o filtrados de dicha especie o cepa, para promoción del crecimiento de plantas, tanto en condiciones de crecimiento óptimas, como en condiciones de distintos tipos de estrés. El uso puede hacerse del microorganismo en sí, o bien de extractos de dicho microorganismo, y/ o de filtrados del mismo.

Como promoción de crecimiento de la planta se entiende un aumento en la tasa de crecimiento y el crecimiento absoluto de la parte aérea de la planta y/o del sistema radicular (biomasa o longitud).

Un tercer aspecto de la presente invención está constituido por la cepa CECT 21242 de la especie *Penicillium melinii*, depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo, CECT (Paterna, Valencia, España), siguiendo las normas del Tratado de Budapest, con el número de depósito CECT 21242).

Material	Fecha de depósito	Número de acceso
Penicillium melinii	19/09/2023	CECT 21242

Un cuarto aspecto de la presente invención es un sustrato para el cultivo de plantas que comprende un microorganismo de la especie *Penicillium melinii,* y/o cepas de dicha especie, en particular la cepa CECT 21242, y/o extractos de dicha especie o cepa, y/o filtrados de dicha especie o cepa.

Un quinto aspecto de la presente invención consiste en el uso del sustrato que comprende un microorganismo de la especie *Penicillium melinii*, y/o cepas de dicha especie, en particular la cepa CECT 21242, y/o extractos de dicha especie o cepa, y/o filtrados de dicha especie o cepa, para obtener plantas tolerantes a estrés y/ o aumentar el crecimiento de plantas sometidas a estrés.

En la presente memoria se entiende como “sustrato para el cultivo de plantas” como cualquier material sólido o líquido, natural o sintético, sobre el que puede crecer una planta. Ejemplos de sustratos incluyen, pero no están limitados a, suelo, tierra, arena, humus o turba o mezclas de éstos. Ejemplos de sustratos sintéticos incluyen, pero no están limitados a, los medios nutritivos Murashige y Skoog (MS), Hoagland o cualquier otro que comprenda nutrientes para la planta, en forma líquida para el uso en cultivo hidropónico o solidificado con sustancias gelificantes como por ejemplo el agar, para uso en cultivo in vitro. Otros ejemplos son los materiales para uso en cultivo hidropónico, como el papel de germinación, la lana de roca o la fibra de coco.

Un sexto aspecto de la presente invención es un material de propagación de una planta que comprende un microorganismo de la especie *Penicillium melinii,* y/o cepas de dicha especie, en particular la cepa CECT 21242, y/o extractos de dicha cepa, y/o filtrados de dicha cepa.

En la presente memoria se entiende por "material de propagación" a cualquier tipo de material celular del cual pueda germinar o desarrollarse una planta. Ejemplos de material de propagación incluyen, pero no están limitados a: semillas, plántulas, plantas jóvenes, esquejes, bulbos y tubérculos, suspensiones celulares, cultivo de callos, cultivo de tejidos, protocormos, explantes o germoplasma.

El material de propagación puede tener distinto origen. Por ejemplo, puede estar recién recolectado, o derivar de un stock, como una muestra de semillas o un stock de células congeladas. Preferiblemente, puede ser seleccionado del grupo que comprende semillas, plántulas, plantas jóvenes, esquejes, bulbos y tubérculos.

La presente invención se puede aplicar a cualquier tipo de planta, preferiblemente gimnospermas, angiospermas, monocotiledóneas y dicotiledóneas. Algunos ejemplos preferidos, aunque no limitantes, de plantas son *Arabidopsis*, y en concreto *Arabidopsis thaliana,* cebada y maíz.
La promoción del crecimiento de plantas puede producirse tanto en el marco de condiciones de distintos tipos de estrés como en condiciones de crecimiento óptimas, así como en distintos sustratos artificiales o naturales, incluyendo, pero no limitado a cultivo hidropónico e *in vitro.*
En la presente invención, la planta puede ser una planta natural o transgénica o editada genéticamente.

Aspectos preferidos de la presente invención están constituidos por un sustrato para el cultivo de plantas, y un material de propagación de una planta, que comprenden la cepa CECT 21242 del microorganismo *Penicillium melinii* y/o extractos de dicho microorganismo y/o filtrados de dicho microorganismo.

En la presente invención se muestra cómo la cepa CECT 21242 del hongo *Penicillium melinii* aumenta la longitud de la raíz y la capacidad de desarrollo de raíces laterales en las plantas tratadas con ella. Este aumento de desarrollo radicular se produce tanto en condiciones de estrés, ya sea por carencia o por exceso de fósforo, por estrés lumínico, por estrés térmico o combinando varios de estos estreses, así como en condiciones óptimas de crecimiento. Los datos indican que las plantas tratadas con la cepa CECT 21242 de *Penicillium melinii* adquieren tolerancia a estreses. Además, las plantas tratadas con la cepa CECT 21242 de *Penicillium melinii* aumentan la tasa de crecimiento y el crecimiento absoluto de la parte aérea (biomasa o longitud) bajo todas estas condiciones en cultivo *in vitro,* en papel de germinación, o cultivando las plantas en tierra agrícola.

Si bien los ejemplos de la presente invención se han efectuado con la cepa CECT 21242 de *Penicillium melinii*, el presente sistema es universal y es extensible a cualquier otro tipo de cepa de *Penicillium melinii*.

Las condiciones de estrés pueden ser de cualquier tipo. Por ejemplo, pero sin estar limitadas a, las condiciones de estrés pueden ser carencia o exceso de fósforo u otros nutrientes, estrés hídrico, estrés por toxicidad, estrés lumínico, estrés térmico, estrés biótico o combinando varios de estos estreses. Entre las condiciones donde el tratamiento ha demostrado una especial eficacia son: carencia o exceso de fósforo, estrés lumínico en la raíz, , altas temperaturas, o mezcla de una o más de estas condiciones de estrés.

Por carencia de fósforo se entiende a aquellas concentraciones de fosfato menores de 25 µM en cultivo in vitro, que provocan un crecimiento significativamente menor de la planta que en condiciones óptimas. Las condiciones óptimas son aquéllas que permiten un crecimiento adecuado de la planta, según puede apreciar cualquier experto en la materia. En concreto, para *A. thaliana* cultivada in vitro, las condiciones óptimas de fosfato son de 300 µM.

Por exceso de fósforo se entienden aquellas concentraciones de fosfato mayores del óptimo, que producen un menor crecimiento de la planta que en condiciones óptimas.

Por estrés lumínico en la raíz se entiende aquellas raíces que están expuestas a condiciones de radiación lumínica que, debido a la naturaleza subterránea de la raíz, no son percibidas como óptimas por esta, y producen un menor crecimiento de la planta.

Por estrés hídrico se entiende la carencia o el exceso de agua durante el ciclo vegetativo de la planta, que producen diferentes tipos de disrupción osmótica, fisiológica o metabólica, produciendo un crecimiento reducido de la planta respecto a las condiciones óptimas y que incluso pueden llevar a células, tejidos o la planta sufrir daños graves o a la muerte.

Por estrés por toxicidad se entiende la presencia de sustancias que resulten perjudiciales para la planta, produciendo diferentes tipos de disrupción osmótica, fisiológica o metabólica, que dan lugar a un crecimiento reducido de la planta respecto a las condiciones óptimas y que incluso pueden llevar a células, tejidos o a la planta a sufrir daños graves o a la muerte. Las sustancias tóxicas pueden ser elementos o moléculas inorgánicas u orgánicas y estar en el

medio donde crece la planta o ser producidas por otros organismos (como por ejemplo otras plantas, plagas o patógenos) en contacto con la planta o en la proximidad de la misma.

Por estrés térmico se entiende a una temperatura inferior o superior a la óptima de crecimiento de la planta y que producen una inhibición de su desarrollo o menor crecimiento en la parte aérea y/o en el sistema radicular. Las condiciones óptimas son aquéllas que permiten un crecimiento adecuado de la planta, según puede apreciar cualquier experto en la materia. En concreto, para *A. thaliana* cultivada *in vitro*, las condiciones óptimas de temperatura son de 22ºC.

Por estrés biótico se entiende a la consecuencia para la planta de sufrir daños producidos por otros organismos, como plagas fitófagas y patógenos (como hongos, bacterias y otros microorganismos, virus o nematodos) o la interferencia o alelopatía producida por otras plantas, que dificulta el crecimiento y desarrollo óptimos de la planta y su capacidad para aprovechar el agua y los nutrientes, dando lugar a un crecimiento reducido de la planta respecto a las condiciones óptimas y produciéndose en muchos casos diferentes tipos de disrupción fisiológica o metabólica que incluso pueden llevar a la muerte a células y tejidos de la planta, o a la planta entera.

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

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

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

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

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

Otra realización es el método de la invención, donde dicha composición comprende sales de fertirrigación, fertilizantes, insecticidas, nematocidas, fungicidas, bactericidas y herbicidas, minerales, materiales orgánicos, compuestos orgánicos, compuestos inorgánicos, metabolitos, subproductos de fermentación o reacción, diluyentes líquidos, alcoholes, cetonas, aceites o ésteres vegetales, hidrocarburos alifáticos, ésteres y otros solventes minerales, agua, surfactantes aniónicos, surfactantes no iónicos, surfactantes catiónicos, surfactantes anfóteros, polímeros hidrosolubles, polisacáridos, preservantes, agentes colorantes, agentes espesantes, y/o agentes estabilizadores.

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

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

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

La presente invención también se refiere a las plantas que, según el método de la invención, se han puesto en contacto con una composición que comprende el microorganismo

Penicillium melinii y cepa de la invención, 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.

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

El medio de cultivo puede estar en reposo o ser constantemente agitado durante el cultivo, por ejemplo con aproximadamente 1 rps. Además, la temperatura de cultivo se puede situar en el rango entre 15 y 35 °C.

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

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

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

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

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

Otra realización es el método de la invención, donde dicho microorganismo se aplica en forma de extracto.

El extracto se puede obtener a partir del microorganismo sólo o junto con el medio de cultivo. Existen diversas maneras de obtener extractos conocidas por los expertos en la materia, como pueden ser, entre otras: moler el microorganismo con o sin medio de cultivo, liofilizar al microorganismo con o sin medio de cultivo, someter al microorganismo con o sin medio de cultivo a bajas o altas temperaturas, o mezclar el microorganismo con o sin el medio de cultivo con distintos solventes de naturaleza acuosa u orgánica y separar las distintas fracciones producidas mediante distintos métodos, como puede ser por el tamaño de las partículas o las moléculas (filtración, centrifugación), o por afinidad química o bioquímica.

Otra realización es el método de la invención, donde se aplican filtrados del microorganismo. En la presente memoria, se entiende por “filtrado” a un medio de cultivo líquido obtenido del cultivo del microorganismo de la invención. Es posible obtener un medio de cultivo líquido, libre o esencialmente libre del material sólido del microorganismo de la invención. Este medio de cultivo puede ser preparado primero cultivando el microorganismo de la invención en un medio de cultivo sólido (mezclado después en un solvente) o líquido y después separando el medio de cultivo del microorganismo de la invención. La separación puede ser llevada a cabo por diferentes métodos conocidos por la persona experta en la materia, por ejemplo, por centrifugación o filtración. Es posible, por ejemplo, calentar el medio con el microorganismo de la invención dos veces hasta alrededor de 80 °C durante 30 min y después eliminar el material fúngico sólido 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 con un tamaño de poro de no más de 0,2 µm. El paso de filtración permite la extracción de esencialmente todas las hifas del microorganismo de la invención, más preferiblemente la filtración también eliminaría las esporas e incluso más preferiblemente esto debería eliminar todo tipo de material fúngico sólido.

A continuación, se muestran una serie de ejemplos que sirven para ilustrar la naturaleza de la presente invención. Estos ejemplos se incluyen únicamente con fines ilustrativos y no deben interpretarse como limitaciones a la invención aquí reivindicada.

MODOS DE REALIZACIÓN PREFERENTE.

Ejemplo 1. Cribado de hongos que aumentan el desarrollo radicular de las plantas.

Durante los años 2008 a 2011, se recolectaron plantas de *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*) creciendo en condiciones naturales en distintas zonas del centro de España (García *et al.* 2013. Fungal Diversity 60, 71-89). Estas plantas carecían de síntomas de enfermedad tales como clorosis, manchas foliares y otros tipos de lesiones inducidas por patógenos. Fragmentos de las plantas recolectadas se desinfectaron sumergiéndolas en 20% de lejía comercial (1% cloro activo) y agitando suavemente durante 5 minutos. Después, los fragmentos se aclararon dos veces en agua estéril y se pusieron en cámara húmeda a temperatura ambiente (20-24ºC). Los fragmentos se inspeccionaron periódicamente, aislando el micelio emergente en placas petri con medio patata dextrosa agar (PDA) con 200 mg/L de cloranfenicol. De entre los aislados obtenidos, se realizó un cribado para encontrar hongos que fueran beneficiosos al producir un aumento de la longitud del sistema radicular en plantas sometidas a estrés por carencia de fósforo.

Semillas de *A. thaliana* accesión Col-0 esterilizadas superficialmente, se sembraron en medio Murashige y Skoog (MS) ½ modificado (sin sacarosa ni vitaminas y con una concentración de fosfato óptima de 300µM o de carencia de 5µM), se estratificaron a 4 ºC durante 2 días y después se mantuvieron en cámara de crecimiento controlado a 23 ºC, en ciclo largo (16 horas diarias de luz) dentro del sistema D-Root que impide que llegue luz al sistema radicular de la planta. A los 7 días las plantas se trasplantaron a otra placa con el mismo medio MS ½ modificado donde se había cultivado cada uno de los hongos ensayados durante 4 días en las mismas condiciones que las plantas. En el tratamiento control, las plantas se trasplantaron a otra placa donde no estaba creciendo ningún hongo.

Las plantas cultivadas en presencia de la cepa CECT 21242 mostraron un aumento significativo ($P<0.05$) del crecimiento de la raíz en plantas cultivadas en medio MS con 5µM, tanto en longitud de la raíz principal y de las laterales como en longitud total respecto a las plantas control no tratadas (Tabla 1, Figura 1), lo que muestra que las plantas tratadas con CECT 21242 se vuelven tolerantes al estrés producido por la carencia de fósforo inorgánico. Otros hongos produjeron reducciones significativas de la longitud de la raíz principal o sistema radicular o no produjeron cambios significativos.

Tabla 1.

Longitud (media ± error estándar) de la raíz principal y sistema radicular de las plantas tratadas con distintos hongos según se describe en el Ejemplo 1. Los datos en negrita indican diferencias significativas entre las plantas tratadas y las plantas control (P<0.05, t de Student).

	Longitud (cm)			
	Raíz principal		Sistema radicular (1)	
Tratamiento	300µM Pi (2)	5µM Pi (3)	300µM Pi	5µM Pi
Control	5.7±1.7	5.7±1.3	7.6±3.5	7.5±3.1
CECT 21242	5.9±1.5	**7.1±1.9**	7.6±2.9	**10.0±3.0**
Hongo 1	**4.1±1.4**	**5.0±1.4**	6.7±3.6	7.2±3.0
Hongo 2	5.4±1.8	5.7±2.3	7.2±2.7	7.7±3.5
Hongo 3	**4.1±1.2**	5.5±1.2	6.6±3.2	8.3±2.2
Hongo 4	**4.8±1.5**	6.3±1.8	7.2±2.8	9.3±3.9
Hongo 5	**4.7±1.9**	5.3±1.8	7.7±3.9	**8.2±3.5**
Hongo 6	5.0±2.2	6.4±2.1	7.6±4.3	9.8±4.6
Hongo 7	5.2±1.9	5.2±2.5	7.8±4.3	7.5±3.67
Hongo 8	**4.3±0.9**	5.3±1.7	6.6±3.1	**7.3±2.4**
Hongo 9	**3.8±0.7**	**4.3±0.9**	**4.8±1.4**	**5.6±1.8**

(1) La longitud del sistema radicular se calcula como la suma de la longitud de la raíz principal y todas las raíces laterales. Las plantas se cultivaron con una concentración de fosfato óptima de 300µM (2) o de carencia de 5µM (3).

Ejemplo 2. Identificación taxonómica de la cepa CECT 21242.

La morfología de la cepa CECT 21242 indicaba que la cepa pertenece al género *Penicillium*. Para averiguar la especie se siguió la metodología de Houbraken *et al.*, 2020 (Studies in Mycology 95: 5–169), obteniendo las secuencias parciales de genes que codifican para las proteínas beta-tubulina (BenA Partial beta-tubulin), calmodulina (CaM) y RNA polimerasa II (RPB2). Estas secuencias se concatenaron, se alinearon y se compararon filogenéticamente con las de otras 94 cepas de referencia de distintas especies del género *Penicillium* y otros géneros cercanos obtenidas de la base de datos NCBI. El alineamiento se realizó utilizando en programa MAFFT y la comparación filogenética se realizó utilizando el método de máxima similitud (Maximum Likelihood) utilizando IQtree (Figura 2A). La cepa CECT21242 agrupa significativamente en un cluster con todas las cepas de la especie *P. melinii*, indicando que la cepa CECT21242 pertenece a esta especie (Figura 2B). Los autores de la metodología descrita en Houbraken et al. (2020) pertenecen al Westerdijk Fungal Biodiversity Institute (Utrecht, Países Bajos) y son expertos de referencia en la taxonomía de hongos. Para la identificación de la cepa CECT21242 también se ha utilizado el método de similitud del

marcador genético (ITS) con las secuencias de nucleótidos obtenidas de la base de datos NCBI del Genebank, obteniéndose la mayor similitud (100% de identidad nucleotídica) con la secuencia con número de accesión NR_077155.1, "Penicillium melinii FRR 2041 ITS region; from TYPE material" (a fecha 22/03/2024). Las secuencias empleadas fueron las de los tres marcadores utilizados para la filogenia (SEQ. ID. No 1 a 3) y la de la ITS (SEQ. ID No 4).

Ejemplo 3. La cepa CECT 21242 de *P. melinii* aumenta la capacidad de formar raíces laterales, medida como cantidad de zonas a lo largo de la raíz principal con capacidad de formar una raíz lateral (pre-branching sites, PBS) en plantas de *A. thaliana* transformadas con el promotor sintético DR5 fusionado a luciferasa (DR5:LUC), un marcador de formación de raíces laterales y de señalización de auxinas. Este incremento de raíces laterales se obtiene tanto en condiciones de crecimiento óptimas (raíces en oscuridad y 300µM de fosfato inorgánico) como en condiciones de estrés por alta (625 µM) o baja disponibilidad de fósforo inorgánico (5µM) (Figura 3A y B). Al contrario de lo observado con otros hongos que incrementan los niveles de señalización de auxinas a lo largo de la raíz (Figura 3C), CECT 21242 sólo incrementa el número de PBS, favoreciendo el desarrollo radicular.

Semillas de *A. thaliana* accesión Col-0 DR5:LUC esterilizadas superficialmente se sembraron en medio Murashige y Skoog (MS) ½ modificado (sin sacarosa ni vitaminas y con una concentración de fósforo de 625 µM, 300 µM o 5 µM), se estratificaron a 4 ºC durante 2 días y después se mantuvieron en cámara de crecimiento controlado a 23 ºC, en ciclo largo (16 horas diarias de luz) dentro del sistema D-Root que impide que llegue luz al sistema radicular de la planta. A los 7 días las plantas se trasplantaron a otra placa con el mismo medio MS ½ modificado donde se había cultivado la cepa CECT 21242 de *P. melinii* durante 4 días en las mismas condiciones que las plantas. A los 4 días tras el trasplante, las plantas se rociaron con el sustrato de la luciferasa (luciferina) y se contaron las zonas a lo largo de la raíz que emitían luminiscencia (contando desde el punto en el que se había puesto en contacto con el CECT 21242). Estos puntos luminiscentes corresponden a los PBS (Figura 3A). Se utilizó una cámara CCD de alta sensibilidad y el software Indigo para realizar las fotos de luminiscencia. Las plantas tratadas con *P. melinii* CECT 21242 mostraron un aumento significativo de PBS respecto a las plantas control no tratadas con CECT 21242. En concreto, 1.5 veces más PBS aproximadamente (t de Student, $P<0.001$) en plantas tratadas con *P. melinii* CECT 21242 (Figura 3B). Este incremento se produce tanto en condiciones óptimas de fósforo inorgánico (300 µM) como de exceso (625 µM) o deficiencia nutricional de fósforo (5 µM), lo que implica que estas plantas tienen una mayor capacidad de desarrollar raíces laterales en ambas condiciones. Además, el aumento de PBS en las plantas tratadas con *P. melinii* CECT 21242

muestra que dichas plantas se vuelven tolerantes al estrés producido por el exceso o la baja disponibilidad de fósforo inorgánico, precisamente en base a esa mayor capacidad de producir mayor número de PBS.

Ejemplo 4.

La cepa CECT 21242 de *P. melinii* aumenta el crecimiento de la raíz principal y raíces secundarias de plantas de *A. thaliana* cultivadas *in vitro* en condiciones de estrés lumínico en la raíz y carencia o exceso de fósforo inorgánico en el medio de cultivo (Figura 4).

Semillas de *A. thaliana* accesión Col-0 esterilizadas superficialmente se sembraron en medio Murashige y Skoog (MS) ½ modificado (sin sacarosa ni vitaminas y con una concentración de fósforo de 625µM y 20µM), se estratificaron a 4 ºC durante 2 días y después se mantuvieron en cámara de crecimiento controlado a 23 ºC, en ciclo largo (16 horas diarias de luz) con aporte de luz al sistema radicular de la planta. A los 7 días las plantas se trasplantaron a otra placa con el mismo medio MS ½ modificado donde se había cultivado la cepa CECT 21242 de *P. melinii* durante 4 días en las mismas condiciones que las plantas. El aporte lumínico a la raíz produce un estrés debido a que este órgano está adaptado al crecimiento subterráneo en oscuridad, y se manifiesta por un menor crecimiento de las plantas.

Las plantas cultivadas bajo este estrés son más sensibles al exceso (625µM) o defecto (21µM) de contenido de fósforo inorgánico (Pi) en el medio por la adición de estreses. En estas condiciones, las plantas cultivadas en presencia de *P. melinii* CECT 21242 mostraron un mayor crecimiento de la raíz tanto en longitud de la raíz principal, como en longitud total respecto a las no tratadas, lo que muestra que las plantas tratadas con *P. melinii* CECT 21242 se vuelven tolerantes al estrés combinado debido al aporte lumínico a la raíz y la baja disponibilidad de fósforo inorgánico.

Ejemplo 5.

El extracto de la cepa CECT 21242 de *P. melinii* (micelio) o del filtrado del cultivo de la cepa CECT 21242 de *P. melinii* (filtrado) aumenta la longitud (Figura 5A) y número (Figura 5B) de raíces laterales de plantas de *A. thaliana* cultivadas en carencia de fosfato y con iluminación a la raíz.

Los extractos de CECT 21242 fueron obtenidos tras haber sido cultivado durante dos semanas en medio de crecimiento caldo dextrosa patata (potato dextrose broth, PDB). El tejido fúngico (micelio y esporas) se separó del medio de cultivo por filtración. Posteriormente, el micelio se congeló en nitrógeno líquido y se molió hasta formar un fino polvo que se suspendió en agua destilada estéril. El medio filtrado libre de tejido fúngico se liofilizó y se suspendió en agua destilada estéril. Esta mezcla se liofilizó, se suspendió en agua estéril y se filtró a través de 0.22 µm. Para el control de extracto del medio de cultivo (control PDB), se realizó el mismo procedimiento, pero con medio PDB donde no se había incubado el hongo. Cada extracto se aplicó sobre una placa con medio Murashige y Skoog (MS) ½ con deficiencia de fosfato (sin sacarosa ni vitaminas y con una baja concentración de fósforo de 20µM). Semillas de *A. thaliana* accesión Col-0 esterilizadas superficialmente y estratificadas previamente a 4 ºC durante 2 días se sembraron sobre las placas de cultivo donde previamente se había aplicado cada extracto (micelio, filtrado, control PDB y agua destilada estéril para el control) y después se mantuvieron en cámara de crecimiento controlado en ciclo largo (16 horas diarias de luz) a 23 ºC durante 14 días, tras los cuales se midieron las raíces.

Ejemplo 6.

La cepa CECT 21242 de *P. melinii* aumenta el crecimiento de la raíz principal y raíces secundarias de plantas de *A. thaliana* cultivadas *in vitro* en condiciones de alta temperatura y carencia de fosforo inorgánico (20µM) en el medio de cultivo (Figura 6).

Semillas de *A. thaliana* accesión Col-0 esterilizadas superficialmente se sembraron en medio Murashige y Skoog (MS) ½ con deficiencia de fosfato (sin sacarosa ni vitaminas y con una baja concentración de fósforo de 20µM), se estratificaron a 4 ºC durante 2 días y después se mantuvieron en cámara de crecimiento controlado en ciclo largo (16 horas diarias de luz) a 23 ºC. A los 7 días las plantas se trasplantaron a otra placa con el mismo medio MS ½ modificado donde se había cultivado la cepa CECT 21242 de *P. melinii* durante 4 días en las mismas condiciones que las plantas. A partir de ese momento, las plantas se mantuvieron a 32 ºC (parte aérea), pero las raíces se mantuvieron a un gradiente de temperatura entre 24 y 32 ºC que simula las condiciones del suelo, utilizando el sistema TGRooZ (González-García *et al.* 2023. Plant Comm. 4, 100514, https://doi.org/10.1016/j.xplc.2022.100514). Las plantas cultivadas a 32 ºC están sometidas a un estrés térmico que se manifiesta por un menor crecimiento del sistema radicular y menor biomasa de la parte aérea.
Las plantas cultivadas en presencia de *P. melinii* CECT 21242 mostraron un mayor crecimiento de la raíz que las plantas no tratadas, lo que muestra que las plantas tratadas se

vuelven tolerantes a la combinación de ambos estreses (carencia de fósforo inorgánico y alta temperatura).

Ejemplo 7.

La cepa CECT 21242 de *P. melinii* aumenta el crecimiento del sistema radicular y la biomasa de la parte aérea de plantas de *A. thaliana* cultivadas *in vitro* en condiciones de temperatura óptima (22ºC) o alta temperatura (32ºC) (Figura 7).

Semillas de *A. thaliana* accesión Col-0 esterilizadas superficialmente se sembraron en medio Murashige y Skoog (MS) ½ modificado (sin sacarosa ni vitaminas y con una concentración de fósforo de 625µM), se estratificaron a 4 ºC durante 2 días y después se mantuvieron en cámara de crecimiento controlado en ciclo largo (16 horas diarias de luz) a 23 ºC. A los 7 días las plantas se trasplantaron a otra placa con el mismo medio MS ½ modificado donde se había cultivado la cepa CECT 21242 de *P. melinii* durante 4 días en las mismas condiciones que las plantas. A partir de ese momento, las plantas se mantuvieron a 22 ºC o 32 ºC. En este último caso, la parte aérea estaba a 32 ºC, pero las raíces se mantuvieron a un gradiente de temperatura entre 24 y 32 ºC que simula las condiciones del suelo, utilizando el sistema TGRooZ (González-García et al. 2023. Plant Comm. 4, 100514, https://doi.org/10.1016/j.xplc.2022.100514). Las plantas cultivadas a 32 ºC están sometidas a un estrés térmico que se manifiesta por un menor crecimiento del sistema radicular y menor biomasa de la parte aérea.

En ambas condiciones, las plantas cultivadas en presencia de CECT 21242 mostraron un mayor crecimiento radicular (Figura 7A, C) y un aumento significativo en la biomasa de la parte aérea en comparación con las plantas no tratadas (aumento del 75% para 22ºC y del 45% para 32ºC t de Student $P<0.05$) (Figura 7B, D), lo que muestra que CECT 21242 promueve el crecimiento de las plantas cultivadas en condiciones óptimas o bajo estrés térmico.

Ejemplo 8

La cepa CECT 21242 de *P. melinii* aumenta el grosor de las raíces, el crecimiento de las raíces laterales y la superficie total ocupada por el sistema radicular, y promueve el crecimiento de plantas de cebada cultivadas utilizando papel de germinación como soporte (Figura 8).

Semillas de cebada se pusieron a germinar en papel de filtro humedecido durante 5 días y las plántulas resultantes se sumergieron en una suspensión de 10^5 esporas/ml (o agua para el control) durante 30 segundos. Las plántulas tratadas se situaron en papel de germinación dentro del sistema D-Root adaptado y se regaron con una solución nutritiva compuesta por 1/8 MS durante 7 días.

Las plantas tratadas con *P. melinii* CECT 21242 mostraron un mayor desarrollo radicular, con raíces más gruesas (Figura 8A), raíces laterales más largas (Figura 8A) y una mayor superficie total ocupada el sistema radicular (aumento del 32%; Figura 8B). Este mayor desarrollo radicular produjo un aumento significativo del crecimiento de la planta, medido como el peso de la parte aérea de la planta (aumento del 11%, t de student $P<0.05$; Figura 8C).

Ejemplo 9.

La cepa CECT 21242 de *P. melinii* aumenta el crecimiento de plantas de cebada (Figura 9A y B) y de maíz cultivadas en suelo agrícola en invernadero (Figura 9C y D).
Semillas de cebada y de maíz se pusieron a germinar en papel de filtro humedecido durante 5 días y las plántulas resultantes se trasplantaron a macetas de 15 cm de diámetro con 1 kg de suelo agrícola. A los 2 días, se inoculó el suelo con 2 mL de una solución con 10^5 esporas/ml (o agua para el control) y las macetas se mantuvieron en el invernadero durante 6 semanas.

Las plantas tratadas con *P. melinii* CECT 21242 mostraron una mayor altura que las no tratadas en mediciones hechas a las 3 semanas (incrementos del 15 y 16% para cebada y maíz respectivamente, y estadísticamente significativos, $P<0.05$, para maíz). Las plantas tratadas de cebada mostraron, además, mayor área foliar que las no tratadas, medida a las 5 semanas (19%).

Ejemplo 10.

La cepa CECT 21242 de *P. melinii* aumenta la tasa de crecimiento de plantas de cebada y de maíz cultivadas en suelo agrícola en invernadero (Figura 10).

Semillas de cebada y de maíz se pusieron a germinar en papel de filtro humedecido durante 5 días y las plántulas resultantes se trasplantaron a macetas de 15 cm de diámetro con 1 kg

de suelo agrícola. A los 2 días, se inoculó el suelo con 2 mL de una solución con 10^5 esporas/ml (o agua para el control) y las macetas se mantuvieron en el invernadero durante 6 semanas. Las plantas tratadas con *P. melinii* CECT 21242 mostraron una mayor tasa de crecimiento en altura que las plantas control, medida como la pendiente de la curva de crecimiento (Figura 10).

REIVINDICACIONES

1. Método para proteger a las plantas de distintos tipos de estrés y/ o aumentar el número de raíces laterales en las plantas, caracterizado por comprender una etapa de poner en contacto dichas plantas con una composición que comprende un microorganismo de la especie *Penicillium melinii*, y/o cepas de dicha especie, y/o extractos de dicha especie o cepa, y/o filtrados de dicha especie o cepa.

2. Método según la reivindicación 1, donde el microorganismo es la cepa de *Penicillium melinii* depositada con el número de depósito CECT 21242.

3. El método conforme a las reivindicaciones 1 y 2 donde las plantas son Angiospermas.

4. El método de la reivindicación 3 donde las plantas son *Arabidopsis thaliana*, maíz o cebada.

5. El método conforme a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 donde las plantas se cultivan *in vitro*, en papel de germinación o en suelo agrícola.

6. El método conforme a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde el microorganismo está en forma de esporas, hifas, micelio o esclerocios.

7. El método conforme a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 donde la composición se aplica a las semillas de la planta.

8. El método conforme a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 donde la composición se aplica a las partes aéreas de la planta.

9. El método conforme a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 donde la composición se aplica a las raíces de la planta o a otras partes subterráneas de la planta.

10. El método conforme a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 donde la composición se aplica al sustrato para el cultivo de la planta.

11. El método conforme a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 donde la composición comprende minerales, materiales orgánicos, compuestos orgánicos, compuestos inorgánicos, metabolitos, subproductos de fermentación o reacción, diluyentes líquidos, alcoholes, cetonas, aceites o ésteres vegetales, hidrocarburos alifáticos, ésteres y otros solventes minerales, agua, surfactantes aniónicos, surfactantes no iónicos, surfactantes catiónicos, surfactantes anfóteros, polímeros hidrosolubles, polisacáridos, preservantes, agentes colorantes, agentes espesantes, y/o agentes estabilizadores.

12. El método conforme a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 donde la composición es un líquido, un sólido, una pasta o un gel.

13. El método conforme a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 donde la composición es un polvo, pastilla, comprimido, granulado o concentrado emulsionable.

14. El método conforme a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 donde la composición se aplica por spray, pulverización, inmersión, irrigación o espolvoreado.

15. Uso de un microorganismo de la especie *Penicillium melinii*, y/o cepas de dicha especie, y/o extractos de dicha especie o cepa, y/o filtrados de dicha especie o cepa, para promoción del crecimiento de plantas, tanto en condiciones de crecimiento óptimas, como en condiciones de distintos tipos de estrés.

16. El uso de la reivindicación 15 donde el microorganismo es la cepa de *Penicillium melinii*, depositada con el número de depósito CECT 21242.

17. El uso de las reivindicaciones 15 y 16 donde las condiciones de estrés son una o más condiciones seleccionadas del grupo: ausencia de fósforo, baja disponibilidad o exceso de fósforo, estrés lumínico, estrés térmico, estrés hídrico, estrés por toxicidad, deficiencia nutricional y estrés biótico.

18. Cepa del microorganismo *Penicillium melinii*, depositada con el número de depósito CECT 21242.

19. Sustrato para el cultivo de plantas que comprende un microorganismo de la especie *Penicillium melinii*, y/o cepas de dicha especie, y/o extractos de dicha especie o cepa, y/o filtrados de dicha especie o cepa.

20. Sustrato conforme a la reivindicación 19 donde el microorganismo es la cepa CECT 21242 de la especie *Penicillium melinii* y/o extractos de dicho microorganismo y/o filtrados de dicho microorganismo.

21. Uso del sustrato de las reivindicaciones 19 y 20 para obtener plantas tolerantes a estrés y/ o aumentar el crecimiento de plantas sometidas a estrés.

22. Material de propagación de una planta que comprende un microorganismo de la especie *Penicillium melinii*, y/o cepas de dicha especie, y/o extractos de dicha cepa, y/o filtrados de dicha cepa.

23. Material de propagación conforme a la reivindicación 22, donde el microorganismo es la cepa CECT 21242 de la especie *Penicillium melinii.*

24. Material de propagación conforme a la reivindicación 23, seleccionado del grupo que comprende semillas, plántulas, plantas jóvenes, esquejes, bulbos y tubérculos.

Figura 1.

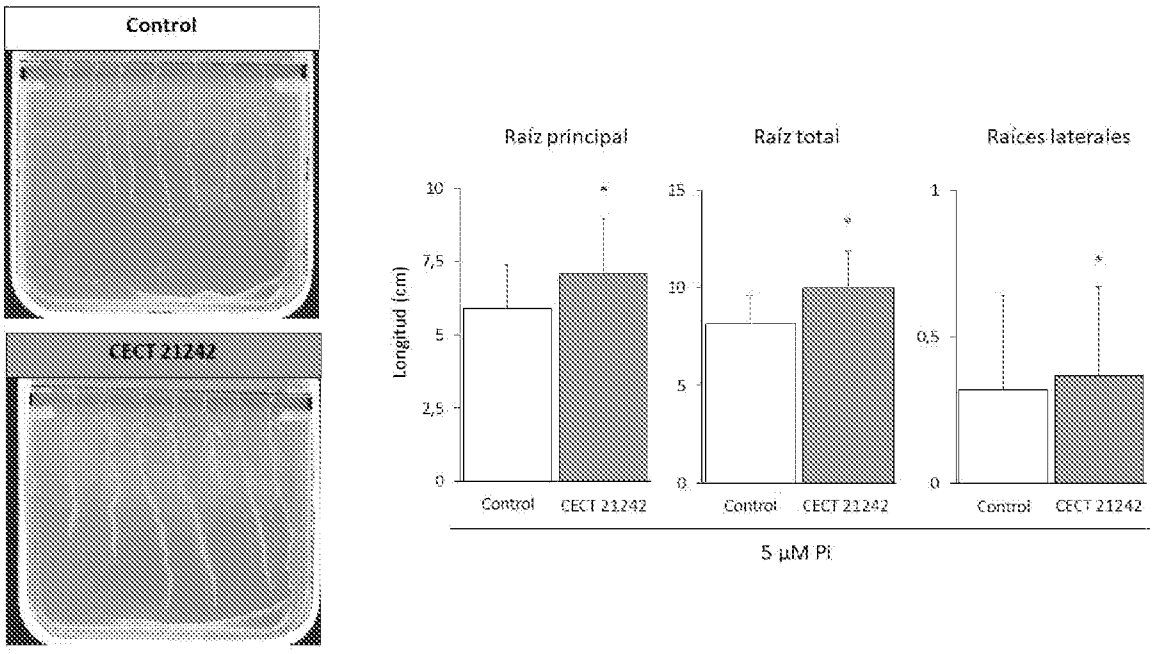

Control
CECT 21242
Raíz principal
Raíz total
Raíces laterales
Longitud (cm)
10
7,5
5
2,5
0
15
10
5
0
1
0,5
0
*
Control
CECT 21242
5 µM Pi

Figura 2.

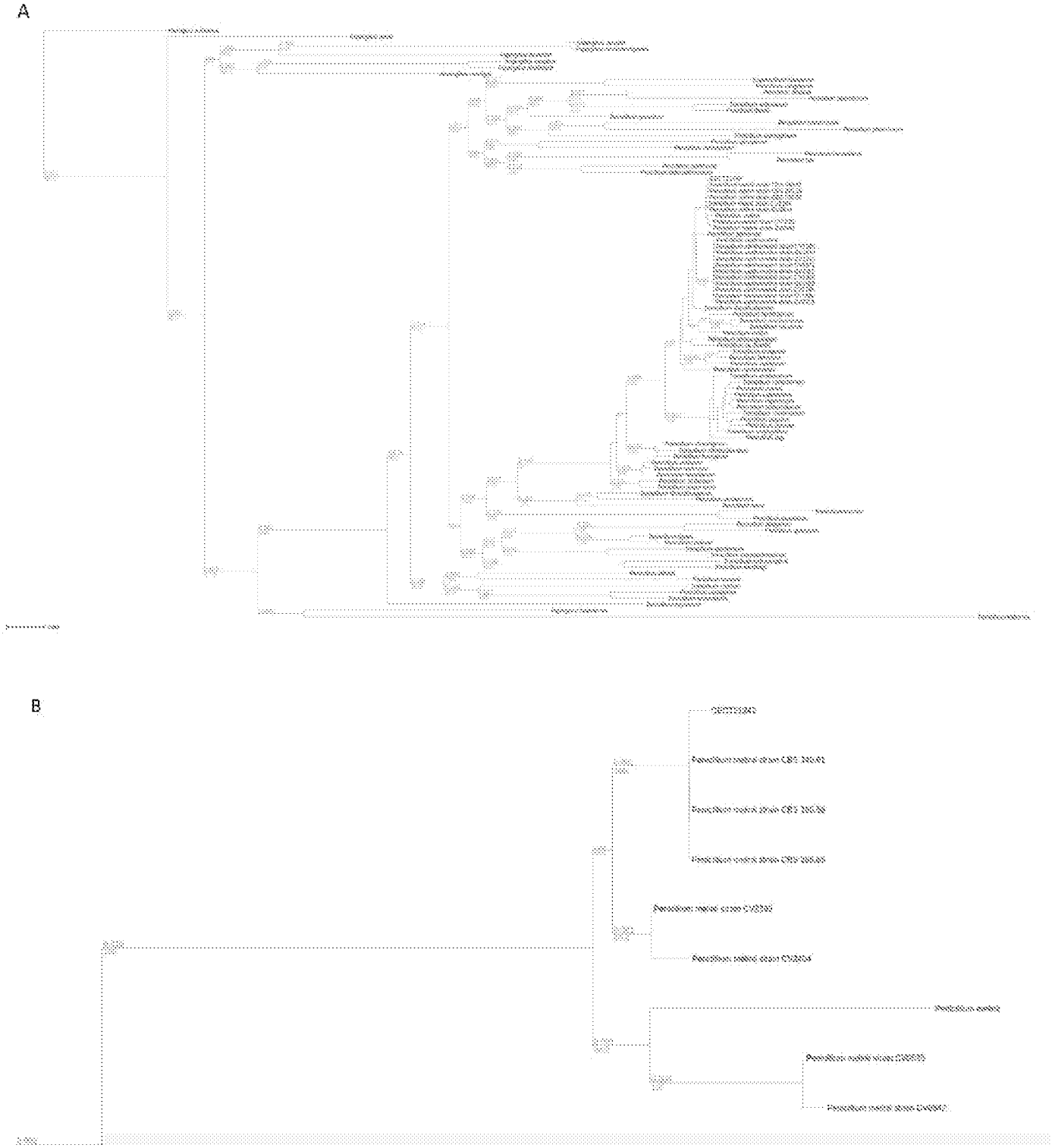


Figura 3.

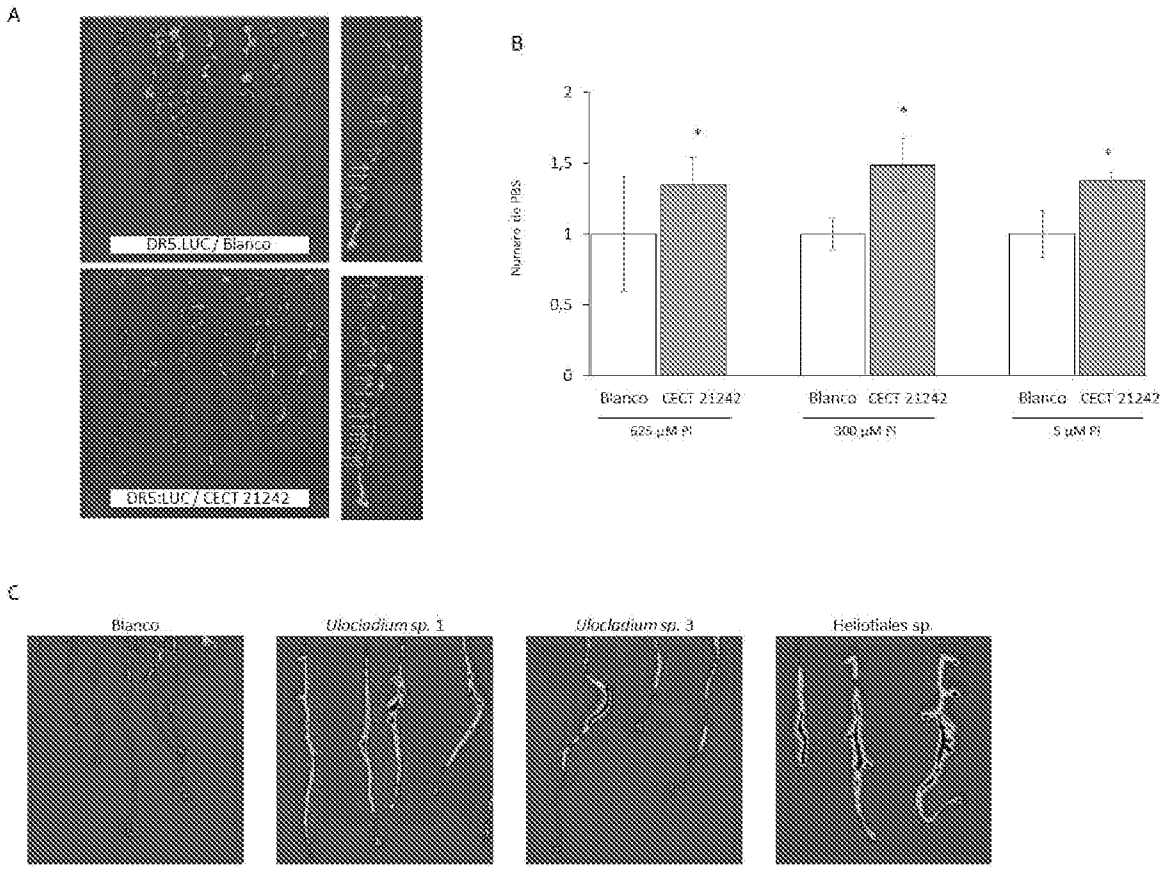

A
DR5:LUC / Blanco
DR5:LUC / CECT 21242
B
Número de PBS
2
1,5
1
0,5
0
Blanco
CECT 21242
625 µM Pi
300 µM Pi
5 µM Pi
C
Blanco
Ulocladium sp. 1
Ulocladium sp. 3
Heliotiales sp.

Figura 4.

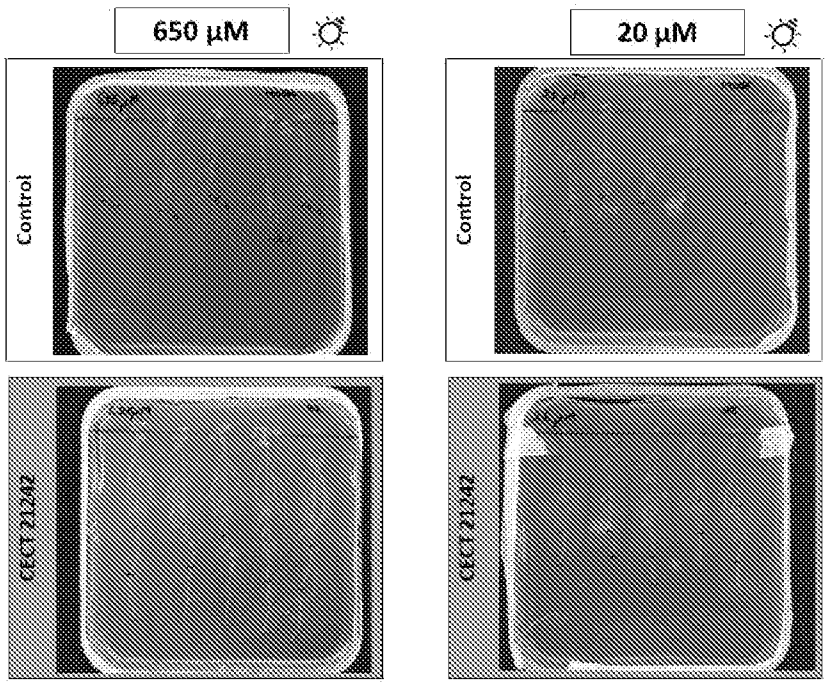


Figura 5.

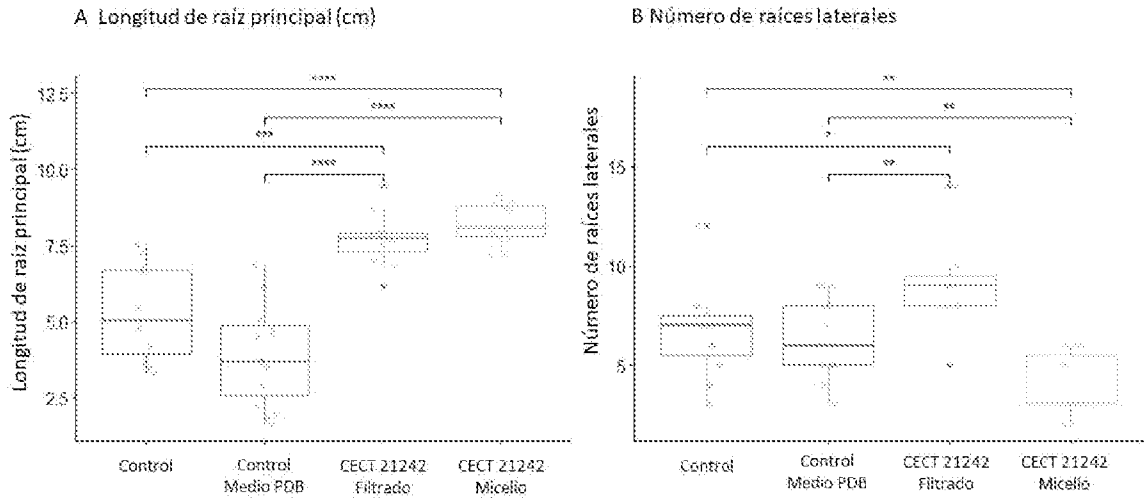

A Longitud de raíz principal (cm)
Longitud de raíz principal (cm)
12.5
10.0
7.5
5.0
2.5
Control
Control Medio PDB
CECT 21242 Filtrado
CECT 21242 Micelio
B Número de raíces laterales
Número de raíces laterales
15
10
5
Control
Control Medio PDB
CECT 21242 Filtrado
CECT 21242 Micelio

Figura 6.

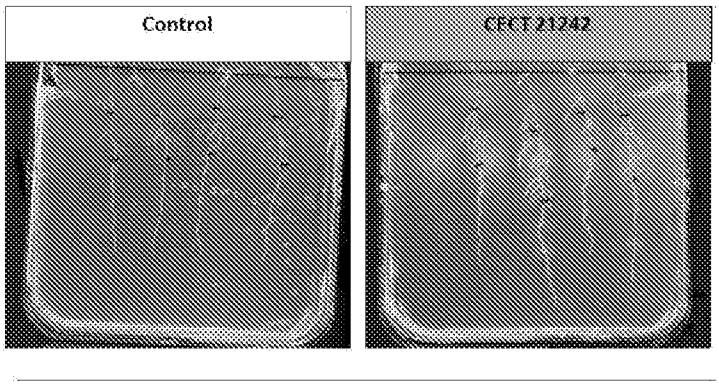


Figura 7.

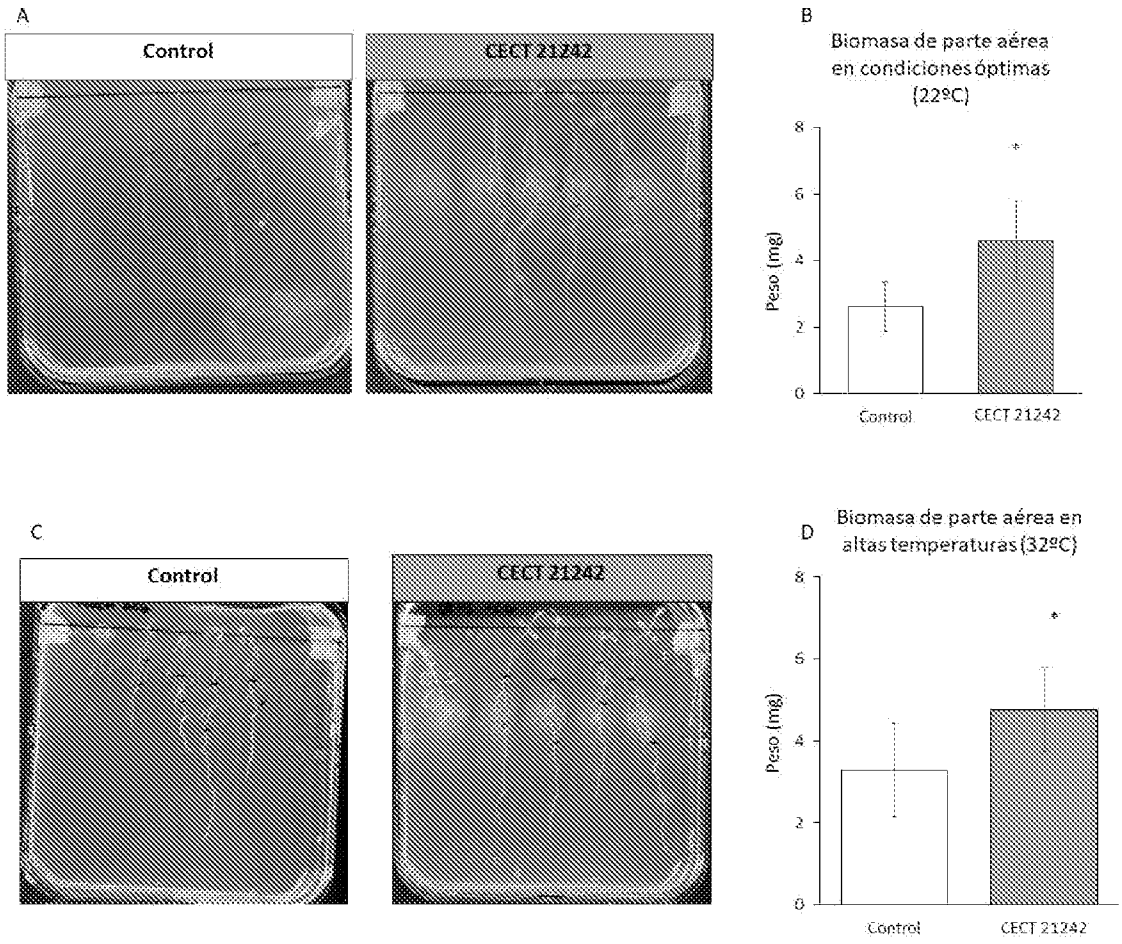

A
Control
CECT 21242
B
Biomasa de parte aérea en condiciones óptimas (22ºC)
Peso (mg)
0
2
4
6
8
Control
CECT 21242
C
Control
CECT 21242
D
Biomasa de parte aérea en altas temperaturas (32ºC)
Peso (mg)
0
2
4
6
8
Control
CECT 21242

Figura 8.

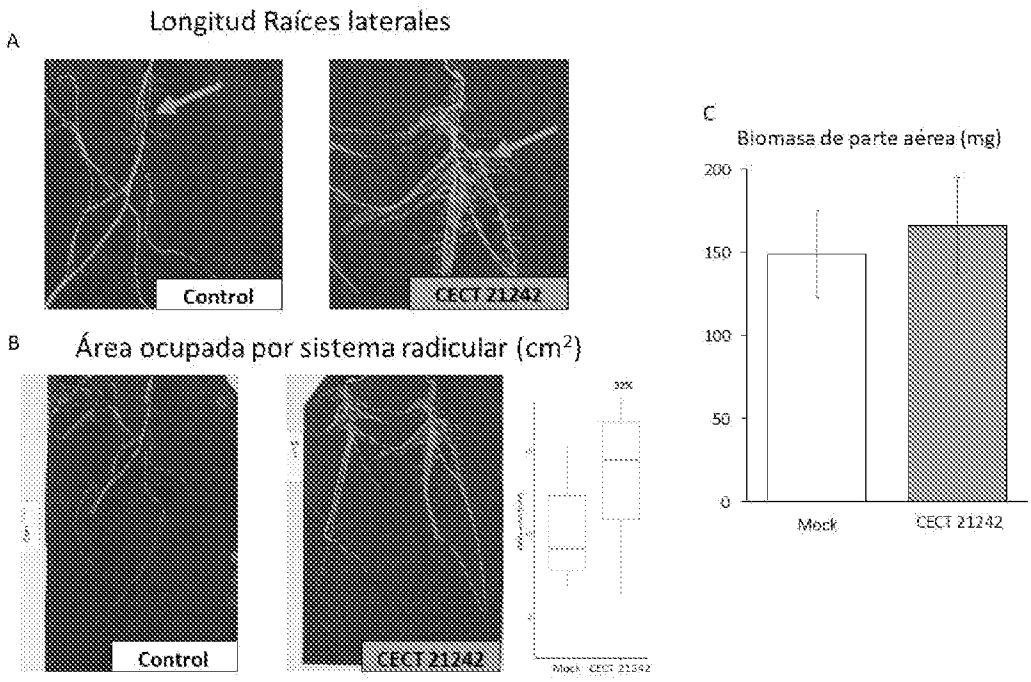

A
Longitud Raíces laterales
Control
CECT 21242
B
Área ocupada por sistema radicular (cm2)
Control
CECT 21242
C
Biomasa de parte aérea (mg)
200
150
100
50
0
Mock
CECT 21242

Figura 9.

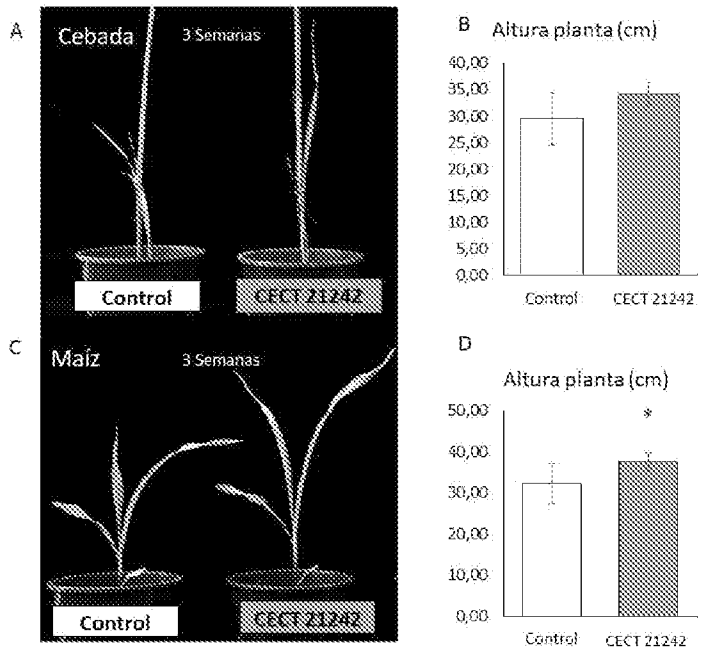
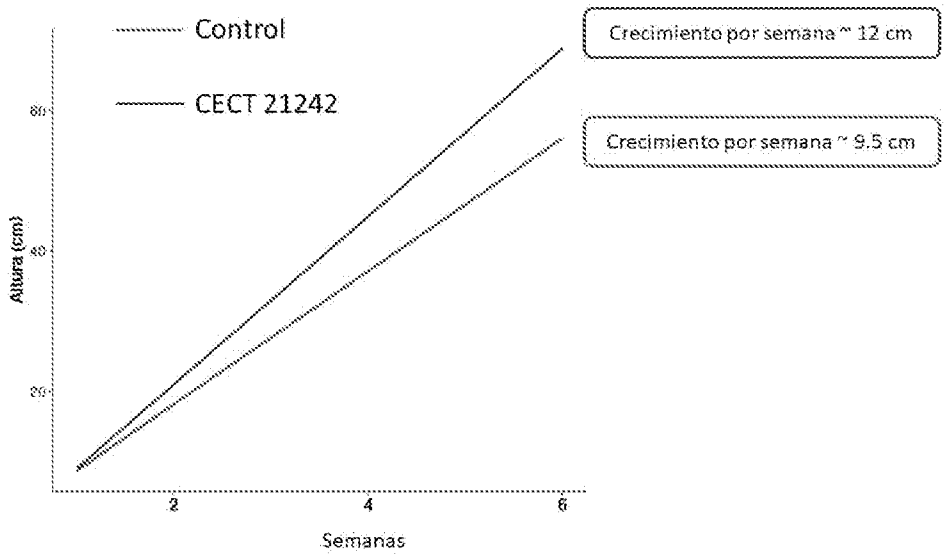

A
Cebada
3 Semanas
Control
CECT 21242
B
Altura planta (cm)
40,00
35,00
30,00
25,00
20,00
15,00
10,00
5,00
0,00
Control
CECT 21242
C
Maíz
3 Semanas
Control
CECT 21242
D
Altura planta (cm)
50,00
40,00
30,00
20,00
10,00
0,00
*
Control
CECT 21242

Figura 10.


Control
CECT 21242
Crecimiento por semana ~ 12 cm
Crecimiento por semana ~ 9.5 cm
Altura (cm)
80
40
20
2
4
6
Semanas

OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(21) N.º solicitud: 202430247

(22) Fecha de presentación de la solicitud: 03.04.2024

(32) Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

(51) **Int. Cl. :** Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	(56) Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	TARROUM, M. et al. Harnessing the rhizosphere of the halophyte grass *Aeluropus littoralis* for halophilic plant-growth-promoting fungi and evaluation of their biostimulant activities. Plants-Basel, 2021, vol. 10 (4), artículo nº: 784, ISSN 2223-7747 (print) ISSN 2223-7747 (electronic) DOI:10.3390/plants10040784 apartados 2.2, 2.3 y 4	15, 19, 21, 22
A	US 2015250116 A1 (WIGLEY PETER JOHN et al.) 10/09/2015 tabla 2, párrafo 325.	15, 19, 21, 22
X	BORREGO LÓPEZ, R. et al. Potential fungicide activity of endophytic fungi isolated from ginger against *Botrytis cinerea*. Botrysclero 2020. 8-12 de Junio. Avignon, Francia. 06/2022. Recuperado de Internet [en línea] [recuperado el 11/07/2024]. URL: https://elaborate.uca.es/wp-content/uploads/2022/06/BotrySclero2022.pdf	1, 3-15, 17, 19, 21, 22
A	ADEDAYO, A. A. et al. Fungi That promote plant growth in the rhizosphere boost crop growth. Journal of Fungi, 2023, vol. 9 (2) artículo nº: 239, ISSN 2309-608X (electronic), DOI:10.3390/jof9020239	1-24

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia
Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría
A: refleja el estado de la técnica
O: referido a divulgación no escrita
P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud
E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones ☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe	Examinador	Página
11.07.2024	A. I. Polo Diez	1/2

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C12N1/14 (2006.01)
A01N63/36 (2020.01)
C12R1/80 (2006.01)

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

C12N, A01N, C12R

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

INVENES, EPODOC, WPI, CAPLUS, BIOSIS, MEDLINE, COMPENDEX, EMBASE, BD-TXTE, INTERNET