



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 269 004**

⑫ Número de solicitud: 200601909

⑬ Int. Cl.:
C12N 1/20 (2006.01)
A01N 63/00 (2006.01)
C12R 1/06 (2006.01)

⑭

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN PREVIO

B2

⑮ Fecha de presentación: **18.07.2006**

⑯ Fecha de publicación de la solicitud: **16.03.2007**

Fecha de la concesión: **10.04.2008**

Fecha de modificación de las reivindicaciones:
12.03.2008

⑰ Fecha de anuncio de la concesión: **16.05.2008**

⑱ Fecha de publicación del folleto de la patente:
16.05.2008

⑲ Titular/es: **Fundación Universitaria San Pablo-CEU
Isaac Peral, 58
28040 Madrid, ES**

⑳ Inventor/es: **Gutiérrez Mañero, Francisco Javier;
Barriuso Maicas, Jorge y
Ramos Solano, Beatriz**

㉑ Agente: **Fuentes Palancar, José Julián**

㉒ Título: **Uso de *Arthrobacter oxidans* BB1 como protector frente a estrés salino.**

㉓ Resumen:

Uso de *Arthrobacter oxidans* BB1 como protector frente a estrés salino.

Uso de la cepa bacteriana *Arthrobacter oxidans* BB1 (CECT 7170), microorganismo del grupo de las bacterias Gram +, género *Arthrobacter*, como estimulante del crecimiento vegetal en ambientes de estrés salino. Esta cepa ha sido aislada a partir de la rizosfera de *Pinus pinaster* Aiton y *Pinus pinea* (L.), y de la micosfera del hongo micorrizógeno asociado a ambos *Lactarius deliciosus* (Fries) S.F. Gray, en agar nutritivo (PCA), y ha sido caracterizada desde el punto de vista morfológico, bioquímico y genético. Puede ser utilizada con objeto de incrementar el crecimiento y vigor de plantas cultivables, tanto herbáceas como hortícolas, frente a situaciones de estrés hídrico-salinas.

ES 2 269 004 B2

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Uso de *Arthrobacter oxidans* BB1 como protector frente a estrés salino.

5 La presente invención se refiere al uso de una cepa de *Arthrobacter oxidans* (BB1, código interno del laboratorio) en el tratamiento de plantas cultivables con el objeto de incrementar su crecimiento y vigor en ambientes de estrés salino.

10 Esta cepa ha sido depositada con fines de patente en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT; con fecha 18 de mayo de 2006, donde se le ha asignado el número 7170. La CECT tiene su sede en el edificio de investigación de la Universidad de Valencia, sito en el campus de Burjassot (DP 46100 - Valencia, España).

15 La invención se encuadra dentro de los campos de la biotecnología y la química fitosanitaria, al disponer de una cepa bacteriana que puede servir de base para la preparación de diferentes tipos de productos para el tratamiento de las plantas cultivables en medios con indeseable grado de salinidad, a fin de potenciar su crecimiento vegetal.

Estado de la técnica

20 Los mecanismos de acción de las bacterias promotoras del crecimiento vegetal, se pueden resumir en dos: directos, cuando los metabolitos producidos alteran el metabolismo de la planta (actividad hormonal, estimulación de los mecanismos defensivos...), e indirectos, cuando sintetizan compuestos que facilitan la captación o movilización de nutrientes o evitan el crecimiento de microorganismos patógenos sobre la planta, sin alterar el metabolismo de la planta.

25 *Arthrobacter oxidans* pertenece al grupo de las bacterias Gram +, no esporulados. El género *Arthrobacter* es común entre bacterias del suelo y son aerobios obligados (Conn and Dimmick 1947 (Approved Lists 1980) emend. Koch et al. 1995), quedando incluido en él la especie que se describe en esta memoria. Siguiendo la taxonomía del Manual Bergeys, edición marzo de 2001, esta bacteria se encuadra dentro del Dominio Bacteria, Phylum Actinobacteria phy. nov, Clase Actinobacteria, Subclase Actinobacteridae, Orden Actinomycetales, Suborden Micrococcineae, Familia Micrococcaceae. El género *Arthrobacter* es muy común en el sistema edáfico, y se ha descrito en repetidas ocasiones como rizobacteria promotora del crecimiento vegetal. Los efectos de esta cepa sobre la fisiología de la planta de la que se aisló y sobre otras plantas, indican que si bien no son mayoritarias en número, la planta las selecciona en su beneficio.

35 Realizando una búsqueda retrospectiva de patentes a nivel mundial en la base de datos Worlwide, a través del sistema Esp@cenet, no se ha encontrado ningún documento relativo a la especie bacteriana *Arthrobacter oxidans* como estimulante del crecimiento vegetal, como protectora frente a patógenos o estrés salino. Sólo se han encontrado una serie de documentos de patentes derivados de cuatro invenciones que hacen referencia a cepas de *Arthrobacter oxidans*, pero como fuente de obtención de diverso tipos de enzimas que son utilizados con diferentes fines.

40 Una de estas invenciones es la del profesor Pohlenz Hans-Dieter (patentes US5948670, US5846803 y US5543306) que tiene por objeto un proceso para el aislamiento y caracterización de un sistema enzimático genético para la inactivación del herbicida phenmedipham, en donde la enzima es una carbamata hidrolasa de una cepa de *Arthrobacter oxidans*, que es responsable de la ruptura del enlace de la carbamata entre los anillos de benceno del phenmedipham. Otra invención es la de Sakai Takeshi y Usui Kanako (patente japonesa JP4304883), cuyo objetivo es obtener un enzima útil para la determinación cuantitativa de L-fucosa en una escala industrial a bajo costo, a partir de un cultivo de una cepa microbiana del género *Arthrobacter*, como por ejemplo *Arthrobacter oxidans* F1 (FERM BP-3674). Las otras dos invenciones, protegidas por las patentes JP1108982 y JP1108980, están en la misma línea que las anteriores, es decir, si bien utilizan un cultivo de *Arthrobacter oxidans*, lo hacen con la finalidad de aislar y caracterizar a partir del mismo un enzima para ser utilizada con objetivo distinto al de potenciación del crecimiento vegetal.

55 En cuanto a la literatura no patente, se ha constatado que el único trabajo publicado relativo a la especie bacteriana *Arthrobacter oxidans* como estimulante del crecimiento vegetal es un artículo del propio equipo inventor: BARRIUSO, J. et al. Screening for putative PGR to improbely establishment of the symbiosis Lactarius deliciosus-Pinus sp. Microbial ecology, 2005, vol. 50, páginas 82-89, tabla 3.

60 Este artículo tiene por objeto el aislamiento y caracterización de bacterias (rizobacterias) precursoras del crecimiento vegetal a partir de la micorrizosfera y micosfera asociada de dos especies del género Pinus, siendo una de estas bacterias el *Arthrobacter oxidans*, caracterizado por su actividad productora de auxinas y sideróforos (véase la tabla 3, pag. 88), que es donde radica su capacidad de incrementar el vigor y crecimiento de plantas leñosas y herbáceas.

65 Sin embargo, con la presente invención se han descubierto y desarrollado un nuevo uso a la referida cepa bacteriana, previamente aislada y caracterizada por el inventor, que se pasa a exponer a continuación.

La invención

El objeto de la invención que aquí se describe y que, a la vista del estado de la técnica anterior, se entiende cumple con las condiciones de novedad y actividad inventiva necesarias para poder ser patentada, es el uso de la cepa bacteriana *Arthrobacter oxidans* BB1 (CECT 7170), que es un microorganismo del grupo de las bacterias Gram +, género *Arthrobacter*, a los efectos de promover el crecimiento vegetal en medios con un indeseado grado de salinidad, protegiendo a las plantas leñosas y herbáceas frente a situaciones de estrés hídrico-salino.

Las características fisiológicas y el análisis genético de esta cepa permite identificarla inequívocamente, no sólo de otras especies del genero *Arthrobacter*, sino también de otras cepas de la misma especie, como las utilizadas en las invenciones anteriores para otros fines.

Es sabido que, una vez aislada y caracterizada, *Arthrobacter oxidans* BB1 presenta una actividad bioquímica indicadora de su potencial capacidad de promoción del crecimiento vegetal, como la producción de auxinas (6.28 ppm, cuando crece en caldo nutritivo durante 24h a 28°C) y la producción de sideróforos, lo que hace que la cepa tenga la capacidad de estimular el crecimiento vegetal, incrementando el vigor y desarrollo de las plantas. Lo que se ha demostrado ahora es que *Arthrobacter oxidans* BB1 presenta también la capacidad de inducir una respuesta metabólica defensiva en las plantas inoculadas, que las protege frente a situaciones de estrés hídrico-salinos, además de frente al ataque de agentes biológicos patógenos.

Por tanto, la ventaja técnica aportada con esta invención es el disponer de la bacteria *Arthrobacter oxidans* BB1 en el tratamiento de diversas especies de plantas cultivables, leñosas y herbáceas, con el objeto de incrementar su resistencia al estrés salino, haciendo entrar en contacto por cualquier medio disponible a dicha bacteria con la planta.

En consecuencia, con la presente solicitud de patente se reivindica el uso de la cepa *Arthrobacter oxidans* BB1, o cualquier fracción de la misma, con el fin de ser aplicado a cualquier tipo de cultivo agrario o forestal, formando parte de cualquier preparado, ya sea individualmente o en combinación con otros organismos, para incrementar la producción vegetal, en ambientes de estrés hídrico-salino, mejorando la adaptación de las plantas a estos medios.

Forma de realización

Estudiando la rizosfera y micosfera asociada de dos especies del género *Pinus*, seleccionadas por su interés forestal, encontramos la cepa del género *Arthrobacter* que aquí se reseña.

La cepa fue aislada de la rizosfera de una población natural de *Pinus pinea* L. Durante el aislamiento de bacterias llevado a cabo en la rizosfera de dos especies de pino (*Pinus pinaster* Aiton y *Pinus pinea* L.) y en la micosfera del hongo micorrizógeno asociado a ambos, *Lactarius deliciosus* (Fries) S.F. Gray., en otoño de 2000, coincidiendo con el periodo de fructificación de *Lactarius deliciosus*, en la sierra de Aracena (Huelva). Como resultado de dicho muestreo se coleccionaron 720 cepas entre las que se encontró *Arthrobacter oxidans* (BB1, código interno del laboratorio). El aislamiento de dicha cepa se realizó en agar nutritivo (PCA).

En el laboratorio este microorganismo se mantiene con una elevada tasa de supervivencia en glicerol al 20% en caldo nutritivo (Pronadisa) a -80°C o en glicerol al 15% en agua a -20°C y se recuperan con facilidad en el medio de cultivo utilizado para el aislamiento tanto en fase sólida como en fase líquida a 28°C.

Para la caracterización de las cepas se consideraron diferentes caracteres fenotípicos que se pormenorizan en esta memoria: (i) morfología de las colonias (ii) morfología de las células, (iii) perfil de ácidos grasos de la membrana (FAMES) y (iv) secuenciación del gen completo del ADN ribosomal correspondiente a la subunidad 16S.

Características morfológicas, bioquímicas y genéticas de Arthrobacter oxidans

La caracterización taxonómica de *Arthrobacter oxidans* se realizó en base al perfil de ácidos grasos (FAMES) y comparación de este con la base de datos del sistema de identificación microbiana MIDI (Sherlock Microbial Identification System, Newark, Ltd, USA), de acuerdo con este test, BB1 es muy similar a *Arthrobacter oxidans* con un índice de 0.691. A continuación, se identificó la cepa mediante secuenciación del ADN ribosomal 16S, su comparación con las secuencias existentes en las bases de datos reveló una homología del 98% con una cepa de *Arthrobacter oxidans*.

A continuación se especifica la morfología de las colonias a las 24 h de incubación a 28° en agar para métodos estándar (PCA).

ES 2 269 004 B2

TABLA 1

		BB1
5	Tamaño de la colonia	< 1 mmØ
	Forma	circular
10	Borde	Liso
	Transparencia	No
	Consistencia	Creмоса
15	Color	Amarillo pálido

20 Creciendo en medio líquido (Caldo nutritivo Pronadisa) el color del medio cambia a amarillo desde la fase exponencial de crecimiento a la fase estacionaria de crecimiento.

Los caracteres morfológicos de *Arthrobacter oxidans* BB1 a las 24 h de incubación a 28° en agar para métodos estándar (PCA) corresponden a una corinabacteria, pleomórfica bacilo-coco y de Gram variable.

25 Se realizó un análisis de Ácidos grasos (Fatty Acid Methyl Esters, FAMES) a fin de establecer su perfil lipídico de membrana. Para ello se siguió el protocolo establecido por el sistema de identificación microbiana MIDI (Sherlock Microbial Identification System, Newark, Ltd, USA), con el objeto de poder comparar los resultados con la base de datos de dicha compañía.

TABLA 2

30	RT	FAME	%
	2.045	i14:0	3.24
35	2.125	14:w5c	0.32
	2.149	14:0	2.36
40	2.298	14:013:0 3OH / i15:1 H	0.65
	2.337	i15:0	12.09
	2.364	a15:0	47.13
45	2.409	15:1 w6c	1.17
	2.447	15:0	0.88
50	2.594	116:1 H	4.82
	2.641	i16:0	7.76
	2.703	16:1 w7c/16:1 w6c	6.83
55	2.754	16:0	2.59
	2.890	i17:1 w9c	0.74
	2.925	a17:1 w9c	3.48
60	2.951	i17:0	0.45
	2.981	a17:0	3.46
65	3.006	17:1 w8c	0.27
	3.325	18:1 w7c	1.74

Nomenclatura PLFAs: número total de átomos de carbono: número de dobles enlaces, seguido de la posición de doble enlace respecto al metilo terminal (w) de la molécula. Las configuraciones cis y trans se indican con las letras c y t respectivamente. Los prefijos a e i, indican ramificación en anteiso e iso respectivamente. El número delante del grupo OH indica la posición de éste con respecto al grupo carboxilo.

A continuación, se procedió al análisis genético de la cepa para su identificación, para ellos se siguieron los siguientes pasos:

Extracción del ADN

Para la extracción del ADN, las colonias crecieron durante 24 horas en caldo nutritivo (Pronadisa) a 28°C en agitación. Transcurrido este tiempo, Se extrajo el ADN genómico de cada bacteria con el kit Ultraclean™ Microbial DNA isolation (MoBio, CA, EE.UU.), según las indicaciones del fabricante.

Amplificación del ADNr 16S

Se amplificaron mediante PCR los 1500 pb correspondientes a esta región con los siguientes cebadores: directo 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3' y reverso 5'-AAG GAG GTG ATC CAG CCG CA-3' (Devereux y Willis, 1995), en una reacción de 50 mL con 10 mM TrisHCl pH 8,3, 4 mM MgCl₂, 50 mM ClK, 0,01% gelatina, 200 mM de cada DNTP, 1,875 unidades de ADN polimerasa (Roche Expand HighFidelity™ PCR system) y 100 ng de ADN bacteriano. La amplificación se realizó en un termociclador GeneAmp 2700 (Applied Biosystems) con las siguientes condiciones: 95°C 5 minutos, seguido de 25 ciclos de 94°C 30 segundos, 65,5°C 30 segundos y 72°C 30 segundos, finalizando con 7 minutos a 72°C.

Visualización de los geles

Los productos de PCR se resolvieron en gel de agarosa al 1% (p/v) en tampón Tris-Acetato-EDTA (TAE 1') con bromuro de etidio (0,5 mg/mL) y se visualizaron en un analizador de imagen GelDoc2000™ 170-8126 (Biorad, CA, EE.UU.).

Secuenciación de ADN

Una vez comprobada la amplificación, los productos de PCR, se purificaron con el kit UltraClean™ PCR Cleanup DNA purification (MoBio, CA, EE.UU.), y la secuenciación se realizó en el Servicio de Secuenciación de la Facultad de Farmacia (Universidad Complutense de Madrid) y en Sistemas Genómicos S.L. (Valencia, España). La secuenciación se llevó a cabo en los aparatos DNA Analyzer 3730 (Applied Biosystems) y ABI PRISM® 377 DNA Sequencer (Applied Biosystems), respectivamente. Se utilizaron los mismos cebadores empleados en la amplificación y un cebador intermedio directo (5'-CGG CTA ACT NCG TGC CAG CAG-3') diseñado específicamente por nosotros (Oligosã v.9.9.11.) para poder secuenciar la zona interna del ADNr 16S desde la base 500 hasta la 1000.

Análisis informático de las secuencias

El ensamblaje y alineamiento de las secuencias se realizó con el programa Bioedit Sequence Alignment editor 5.0.3. (Tom Hallã, 1997-2001) mediante Contig Assembly Program (Xiaoqui Huangã, 1991) y Clustalw 1.4 respectivamente. Posteriormente se compararon en el GeneBank por BLASTN 2.2.6 (Altschul *et al.*, 1997) en las bases de datos del GeneBank, el EMBL y el DDBJ (NCBI BLAST Home page. Basic Local Alignment Search Tool) estableciendo el grado de homología de la cepa con las presentes en las base de datos. Resultando la mayor homología: *Arthrobacter oxydans* (X83408) (Reclasificación de *Micrococcus agilis* al género *Arthrobacter*), y quedando depositada la secuencia en el GeneBank con el número de acceso AY307363.

Arthrobacter oxidans como promotora del crecimiento vegetal

Una vez aisladas y caracterizadas, a las cepas de *Arthrobacter oxidans* se le practicaron diversas pruebas para poner de manifiesto actividades bioquímicas indicadoras de su potencial capacidad de promoción del crecimiento vegetal. Estas fueron, producción de auxinas, degradación de 1-aminociclopropano-1-carboxilato, solubilización de fosfato y producción de sideróforos. Resultando positiva para la producción de auxinas (6.28 ppm) cuando crece en caldo nutritivo (Pronadisa) y la producción de sideróforos.

Hasta el momento se han realizado experiencias consistentes en la inoculación de suspensiones bacterianas de *Arthrobacter* en las raíces de la planta de la que se aisló (*Pinus pinea*). En estos experimentos se ha detectado un notable aumento de la biomasa, un mayor vigor en las plantas tratadas y una mayor micorrización. Así mismo se ha ensayado la inoculación directa de la cepa en planta modelo (*Arabidopsis thaliana*) donde ha inducido un efecto de resistencia sistémica frente a infecciones por bacterias y una protección en situaciones de estrés salino. También se ha inducido la síntesis de metabolitos secundarios en plantas de *Hypericum perforatum* aplicando lipopolisacáridos de esta bacteria.

Arthrobacter oxidans como activadora del crecimiento vegetala) Experimentos de promoción de crecimiento realizados con plantas de *Pinus pinea*

5 1º. En los primeros experimentos realizados, se inocularon plántulas de *Pinus pinea* L., crecidas en turba rubia (Kekkila S.L) sin esterilizar durante 4 meses, con la cepa de *Arthrobacter oxidans* BB1 a razón de 10^7 bacterias/ml de sustrato en el medio líquido de crecimiento. Las plántulas se mantuvieron en vivero durante todo el experimento con riego mediante microaspersión en pivotes. Tras 7 meses se recolectaron las plantas y una vez secas se midió altura de la parte aérea, diámetro del cuello, peso seco de la parte aérea y peso seco de la raíz. Los resultados indicaron una mejora en el crecimiento de la planta reflejados en un aumento del 19% de la altura de la parte aérea, un 7% en el diámetro del cuello, del 24% en el peso seco de la parte aérea y un 17% en el peso seco de la raíz, con respecto a las plantas control inoculadas con medio nutritivo. Así mismo se estudió la perturbación producida en las comunidades microbianas rizosféricas mediante análisis de PLFAs.

15 2º. Plantulas de *Pinus pinea* L. de dos semanas, pregerminadas en bandejas de vermiculita, se trasplantaron a macetas de 2 litros de volumen utilizando como sustrato tierra de pinar de la Urbanización Montepríncipe (Boadilla del Monte, Madrid). La inoculación se realizó previamente al trasplante, las raíces de los pinos pregerminados se sumergieron durante una hora en una solución bacteriana de 108 bacterias/ml,. Una vez trasplantados los pinos, se inocularon mediante pipeteo a razón de 107 bacterias/g de sustrato; a las plantas control se les aplicó el mismo volumen de tampón $\text{SO}_4 \text{Mg}$ 10 mM. Las plantas se mantuvieron en invernadero con condiciones de agua, luz, temperatura y humedad controladas durante 3 meses. Transcurrido este periodo se trasladaron a parcelas de experimentación con riego controlado y condiciones de luz, temperatura y humedad ambientales. La toma de muestras de estas plantas se realizó transcurridos 5 meses desde su germinación y se analizó el número de puntas radicales totales y el número de puntas radicales micorrizadas. Para determinar el grado de micorrización de las plantas. Los resultados obtenidos demostraron un claro efecto activador del crecimiento de la parte radical, contándose en las plantas tratadas hasta un 69,5% más de puntas radicales que en las plantas control, así como un 145% más de puntas radicales micorrizadas.

Arthrobacter oxidans como agente protector frente a patógenos y a estrés hídrico-salino

30 1º. Experimento de inducción de resistencia sistémica.- Para comprobar el efecto de protección de la cepa de *Arthrobacter oxidans* frente a patógenos y estrés salino, se inocularon plántulas de *Arabidopsis thaliana* con la cepa de *Arthrobacter oxidans* a razón de 108 bacterias/ml de sustrato, por 2 veces, una en el momento del trasplante y otra transcurridas 3 semanas. El sustrato empleado fue turba-arena (2:1). Transcurrida una semana desde la última inoculación, se sumergieron las hojas de cada planta en una solución de la bacteria patógena *Pseudomonas syringae* DC3000 a una concentración de 107 bacterias/ml y se mantuvieron las plántulas durante 24 horas con una humedad relativa de un 100%, para comprobar el efecto sobre la patogenicidad. Para comprobar el efecto frente al estrés salino se añadió cloruro sódico en el sustrato hasta una concentración equivalente a una solución salina 50 mM. Tras dos semanas se contabilizaron el número de lesiones producidas en las hojas por la bacteria o el número de hojas cloróticas provocadas por la sal. Las plantas inoculadas con *Arthrobacter oxidans* tenían un 52,3% menos lesiones producidas por el patógeno que las plantas control no inoculadas, así como las plantas inoculadas con *Arthrobacter oxidans* tenían un 57,8% menos de hojas cloróticas producidas por el efecto de la sal que las plantas control no inoculadas, lo que prueba la inducción de resistencia sistémica en la planta. En estos experimentos se demuestra la capacidad de esta cepa para inducir una respuesta metabólica defensiva, lo que permite desarrollar una estrategia para la defensa de la planta antes de que se produzca el ataque del patógeno y una mejor defensa frente al estrés hídrico-salino.

45 Aplicación industrial

50 Dadas las propiedades arriba apuntadas de *Arthrobacter oxidans* BB1 como promotor del crecimiento vegetal en medios salinos, las cepas de esta bacteria tienen una aplicación específica en la industria agropecuaria y farmacéutica, al poder ser utilizadas, formando parte de cualquier preparado (de forma individual o en combinación con otros microorganismos) y haciéndolas entrar en contacto con el sistema radical o aéreo de las plantas por cualquier medio disponible, en todo tipo de cultivo agrario o forestal o cultivo *in vitro*, para incrementar la producción vegetal frente al estrés hídrico-salino.

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Uso de *Arthrobacter oxidans* BB1 (CECT 7170), microorganismo del grupo de las bacterias Gram +, género *Arthrobacter*, para su aplicación en cualquier tipo de cultivo agrario o forestal, con el fin de protegerlo frente a situaciones de estrés hídrico-salino, al inducir una respuesta metabólica defensiva en las plantas inoculadas.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ ES 2 269 004

⑫ Nº de solicitud: 200601909

⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 18.07.2006

⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑮ Int. Cl.: Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	BARRIUSO, J. et al. Screening for putative PGRR to improve establishment of the symbiosis <i>Lactarius deliciosus</i> - <i>Pinus</i> sp. Microbial ecology, 2005, vol. 50, páginas 82-89, tabla 3.	1,2,6
Y		3,5
Y	MICHAUD, M. et al. Selection of antagonist microorganisms against <i>Helminthosporium solani</i> , causal agent of potato silver scurf. Plant Disease, 2002, vol. 86 (7) páginas 717-720.	3
Y	BURDMAN S. et al. Recent advances in the use of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in agriculture. In: Microbial interactions in agriculture and forestry, 2000. N.S. vol II. SUBBA RAO and Y.R. DOMMERGUES (ed) Sci. Publisher, Inc, USA, páginas 229-250.	5
A	MAYAC, S. et al. Plant growth-promoting bacteria confer resistance in tomato plants to salt stress. Plant Physiology and Biochemistry, 2004, vol. 42, páginas 565-572.	4
A	US 6228806 B1 (METHA) 08.06.2001, todo el documento.	

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

28.11.2006

Examinador

A. Polo Díez

Página

1/2

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C12N 1/20 (2006.01)

A01N 63/00 (2006.01)

C12R 1/06 (2006.01)