



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 099 679**

② Número de solicitud: 9502149

⑤ Int. Cl.⁶: C05F 11/08

C12N 1/20

//(C12N 1/20

C12R 1:41)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **03.11.95**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **16.05.97**

Fecha de concesión: **12.12.97**

⑮ Fecha de anuncio de la concesión: **16.01.98**

⑯ Fecha de publicación del folleto de patente:
16.01.98

⑰ Titular/es: **Universidad de Granada
y en su representación Jesús González López
Santa Lucía, 2, 2ª Planta
18071 Granada, ES**

⑱ Inventor/es: **Rodelas González, Belén y
González López, Jesús**

⑳ Agente: **No consta**

㉑ Título: **Utilización de *Rhizobium leguminosarum* bv. *Viciae* cepa Z25 como inoculante para el cultivo de plantas leguminosas.**

㉒ Resumen:

La utilización de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* cepa Z25 como inoculante para el cultivo de plantas leguminosas representa un nuevo microorganismo simbiótico de las plantas leguminosas, caracterizado por su infectividad, efectividad y capacidad bacteriocinogénica.

La expresión constitutiva de la actividad bacteriocinogénica de la cepa Z25, bajo condiciones ambientales muy diversas en cuanto a disponibilidad de nutrientes (triptona-extracto de levadura, D-manitol, D-fructosa, D-glucosa, sacarosa, L-arabinosa, L-ramnosa, D-sorbitol, D-trehalosa) y dentro de un rango muy amplio de temperaturas de incubación (4-37°C), así como la eficiencia de la simbiosis que establece con *Vicia faba*, son características favorables para la utilización de la cepa Z25 como inoculante eficaz y competitivo aplicable a los cultivos de *Vicia faba* y otras plantas leguminosas pertenecientes al mismo grupo de inoculación cruzada.

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

DESCRIPCION

Utilización de *Rhizobium leguminosarum* bv. *Viceae* cepa Z25 como inoculante para el cultivo de plantas leguminosas.

5 El objeto de la presente invención es la utilización de la cepa bacteriana *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae* Z25 como inoculante para el cultivo de plantas leguminosas. La cepa Z25, seleccionada en nuestro laboratorio por su alta infectividad y efectividad, se caracteriza además por la expresión constitutiva de actividad bacteriocinogénica, un factor determinante de la capacidad competitiva de las cepas rizobianas para la persistencia en el suelo y la nodulación de la leguminosa huésped. Estas características suponen
10 una indudable ventaja de este microorganismo para la aplicación agronómica.

Antecedentes

15 Las leguminosas forrajeras y de grano son cultivadas en una gran variedad de sistemas agrícolas en regiones de los cinco continentes. Su interés en la nutrición humana y animal ha conducido a innumerables estudios de la simbiosis *Rhizobium-leguminosa*, muchos de ellos orientados específicamente hacia la optimización de las prácticas de inoculación en sistemas sostenibles de producción agrícola. El diseño y aplicación de programas destinados al incremento de la fijación de N₂, basados en el cruzamiento y selección genética de plantas, desarrollo de cepas bacterianas superiores, selección de las combinaciones
20 cepa-huésped o mejora de las técnicas de inoculación y prácticas agrícolas, conduce a resultados muy favorables en la mayoría de los casos (Buttery, B.R., Parj, S.J. and Hume, D.J. 1992. Can. J. Plant Sci. 72:323-349; Arshad, M., Hussain, A., Javed, M. and William, T. 1993. Plant Soil 148:129-135).

25 Las leguminosas son cultivos con excelente adaptación al clima mediterráneo, muy extendidos en la zona sur de España. Entre las semillas verdes para consumo humano, el haba (*Vicia faba* L.) es fundamentalmente cultivada en la región oriental de Andalucía (Granada, Almería y Jaén). *V. faba* es una leguminosa capaz de nodular profusamente, demostrando una elevada productividad con escasa o nula respuesta a la adición de N al suelo (Buttery, B.R., Parj, S.J. and Hume, D.J. 1992. Can. J. Plant Sci. 72:323-349; Sprent, J.I., Minchin, F.R. and Parsons, R. 1993. En *New Horizons in Nitrogen Fixation* ed. Palacios, R., Mora, J. and Newton W.E., pp. 65-76. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers).
30 Los cultivos de haba responden muy favorablemente a la inoculación con cepas efectivas apropiadas, incluso en zonas en las que existe una población nativa de *Rhizobium* bien establecida (Buttery, B.R., Parj, S.J. and Hume, D.J. 1992. Can. J. Plant Sci. 72:323-349). Junto al guisante, el haba ha sido seleccionada por la Unión Europea como cultivo de alto valor proteico, y recomienda su introducción en
35 suelos con escasa fertilidad (Carrouee, B. 1993. Rev. Grain Legumes 1:18-19). Sin embargo, a pesar de ser un cultivo de reconocido interés agronómico, el estudio y la aplicación de programas específicos para su mejora han sido escasos (Caba, J.M. 1991. Variabilidad Genotípica del Metabolismo Simbiótico en *Vicia faba*: Efecto del Nitrato. Tesis Doctoral, Departamento de Biología Vegetal de la Universidad de Granada).
40

La biotecnología ha abierto nuevas posibilidades en lo referente a la aplicación agrícola de bacterias beneficiosas para la promoción del crecimiento vegetal y el control biológico de patógenos. Dado que la liberación a gran escala al medio ambiente de bacterias modificadas mediante ingeniería genética se
45 enfrenta aún con un gran número de problemas, la necesidad de aislar y seleccionar cepas rizosféricas silvestres con alto potencial agronómico continúa siendo de gran interés (Bashan Y., Holguin, G. and Lifshitz, R. 1993. En *Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology* ed. B.R. Glick and J.E. Thompson, pp.331-345. London, U.K.: CRC Press). No obstante, el uso extendido de los inoculantes en agricultura está condicionado por la adaptación de las cepas empleadas a las condiciones del hábitat de aplicación y su capacidad de competir con la microbiota saprofítica autóctona. Con cierta frecuencia, la
50 inoculación de leguminosas con cepas altamente eficaces de *Rhizobium* no origina resultados satisfactorios. Este fracaso es, en muchas ocasiones, consecuencia de la competencia con cepas autóctonas de *Rhizobium*, que impiden la nodulación de las plantas por las cepas inoculantes (Dowling, D.N. and Broughton, W.J. 1986. Ann. Rev. Microbiol. 40:131-157). En algunas zonas en las que el uso de inoculantes comerciales para leguminosas se ve restringido por estas causas, se han desarrollado con éxito programas exclusivos
55 de inoculación, basados en el uso de cepas nativas previamente aisladas y seleccionadas por su efectividad simbiótica y capacidad competitiva (Paau, A.S. 1989. Appl. Environ. Microbiol. 55:862-865).

Desde la primera descripción de producción de bacteriocinas (rizobiocinas) por cepas de *Rhizobium* (Roslycky, E. B. 1967. Can. J. Microbiol. 13:431-432), el papel de estos antimicrobianos como factor
60 determinante de la capacidad de competición por la nodulación de las leguminosas ha recibido constante atención. Diferentes estudios sugieren que las rizobiocinas juegan un papel importante en la competición entre cepas, probablemente alterando la población de rizobios sensibles en la rizosfera (Triplett, E.W. and

Sadowsky, M.J. 1992. Ann. Rev. Microbiol. 46:399-428). De esta forma, la producción de bacteriocinas supone una ventaja selectiva en la aplicación de un programa de inoculación. Se han sugerido varias aproximaciones al empleo de cepas bacteriocinogénicas para maximizar la fijación de N₂ mediante la competición eficaz por la nodulación (Schiwingamer, E.A. and Belkengren, R.P. 1968. Arch. Mikrobiol. 64:130-145):

1. Inoculación mixta de cepas bacteriocinogénicas con cepas resistentes y altamente eficaces
2. Inoculación con cepas bacteriocinogénicas altamente eficaces
3. Transferencia de los caracteres genéticos determinantes de la producción de bacteriocinas a cepas altamente eficaces.

Nuestra aportación a la tecnología de los inoculantes para leguminosas es la introducción de la cepa bacteriocinogénica *R. leguminosarum* bv. *viceae* Z25, aislamiento que por sus características posee interés agronómico para la elaboración de inoculantes destinados al cultivo de leguminosas (Jordan, D.C. 1984. En *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* Vol. 1 ed. Krieg, N.R. y Holt, J.G., pp.235-242. Baltimore, USA: Williams and Wilkins).

Explicación de la invención

La invención consiste en el empleo de la cepa *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae* Z25 para la inoculación de cultivos de plantas leguminosas. La cepa Z25 es un aislamiento obtenido a partir de nódulos de *Vicia faba*, infectivo y con una elevada efectividad simbiótica (nodulación y actividad nitrogenasa), que además expresa actividad bacteriocinogénica de manera constitutiva bajo condiciones ambientales muy diversas en cuanto a disponibilidad de nutrientes (medio completo, medio mínimo, utilización de diversas fuentes de carbono y nitrógeno como sustratos) y dentro de un rango de temperaturas de incubación muy amplio, que se extiende más allá de los márgenes considerados normalmente óptimos para el crecimiento de *Rhizobium*.

En un *screening* efectuado sobre un total de 62 cepas microbianas diferentes, la cepa Z25 afectó negativamente al crecimiento del 100 % de las cepas de *R. leguminosarum* bv. *viceae* a las que se enfrentó como indicadores y al 40 % de las cepas pertenecientes a otras especies y biovariedades de *Rhizobium*, no observándose efectos inhibitorios sobre cepas indicadoras pertenecientes a otros grupos microbianos. Este factor supone una ventaja selectiva para la aplicación de esta cepa como inoculante para leguminosas (Triplett, E.W. and Sadowsky, M.J. 1992. Ann. Rev. Microbiol. 46:399-428).

Descripción de la invención

Descripción de la cepa

El microorganismo origen de esta invención es *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae* cepa Z25, una cepa aislada de nódulos de *Vicia faba* cv. Alborea. Esta bacteria ha sido depositada el 3 de Julio de 1995 en la Colección Española de cultivos Tipo, siéndole atribuido por la Autoridad Internacional de Depósitos el número de orden CECT 4585. Se adjunta fotocopia del Certificado de Depósito.

La cepa Z25 es un bacilo recto Gram-negativo, móvil, capaz de inducir la formación de nódulos fijadores de N₂ en las raíces de *V. faba*. Cultivado en medio YMA (Agar de extracto de levadura-manitol (Jordan, D.C. 1984. En *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* Vol. 1 ed. Krieg, N.R. y Holt, J.G., pp.235-242. Baltimore, USA: Williams and Wilkins.), durante 72 h a 28°C, este microorganismo forma colonias de 2-4 mm de diámetro, circulares, convexas, de color blanco brillante y muy mucilaginosas, debido a la abundante producción de exopolisacáridos. En función de las citadas características morfológicas, fisiológicas y culturales, la cepa Z25 ha sido clasificada como *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae*, según los criterios del *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (1994) (*Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 1994. 9th ed. Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T. and Williams, S.T. USA: Williams & Wilkins).

Para la expresión *in vitro* de la actividad bacteriocinogénica de la cepa *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae* CECT 4585, es necesario el crecimiento del microorganismo en medios de cultivo sólidos. Este cultivo puede efectuarse en medio completo (agar de tripton-extracto de levadura, TY); o en medio mínimo (agar Y) adicionado de distintas fuentes de carbono. Ambos medios de cultivo se ajustan a pH 6,8 y se preparan en placas Petri de vidrio. La composición de los medios de cultivo mencionados (por litro de agua destilada) se describe a continuación:

ES 2 099 679 B1

	Agar TY:		Agar Y:	
5	Tryptona	5,00 g	Fuente de carbono	25 mmol
	Extracto de levadura	3,00 g	KNO ₃	0,6 g
	CaCl ₂ .6 H ₂ O	1,30 g	K ₂ HPO ₄	0,22 g
	Agar	1,9 %	MgSO ₄ .7 H ₂ O	0,10 g
10			FeCl ₃	0,02 g
			CaCl ₂	0,04 g
			Na ₂ MoO ₄	0,001 g
			Biotina	1 mg
			Tiamina	
15			clorhidrato	1 mg
			Pantotenato	
			cálcico	1 mg
			Agar	1,9 %

Las placas de agar TY o agar Y se inoculan en picadura a partir de cultivos en fase exponencial de la cepa Z25, obtenidos por subcultivo en medios líquidos incubados con agitación moderada (110 rpm). La actividad bacteriocinogénica se pone de manifiesto mediante el revelado con una o varias cepas indicadoras, empleando una técnica de antagonismo diferido (Gross, D.C. and Vidaver, A.K. 1978. Appl. Environ. Microbiol. 36:936-943).

Los siguientes ejemplos muestran que la cepa Z25 expresa la actividad bacteriocinogénica bajo un amplio rango de temperaturas de incubación y utilizando gran variedad de fuentes de C, así como la mayor eficiencia simbiótica de la cepa Z25 en comparación con otras cepas silvestres de *R. leguminosarum* bv. *viceae*, cuando se utiliza como inoculante para el cultivo de las plantas leguminosas.

Ejemplo 1

Las condiciones de cultivo seleccionadas para la cepa Z25 fueron las siguientes: Medio de cultivo: agar TY; Períodos de incubación: 3, 5 y 7 días; Temperaturas (T^a) de incubación: 20, 25, 28, 32 y 37°C; Cepa indicadora: *R. leguminosarum* bv. *viceae* M17.

Las placas de agar TY se inocularon en picadura a partir de un cultivo en fase exponencial de la cepa Z25, obtenido en medio TY líquido incubado a 28°C con agitación (110 rpm) durante 24 h. Tras el revelado, los valores de las zonas de inhibición del crecimiento de la cepa M17, expresados en mm, son los indicados en la Tabla 1.

TABLA 1

Efecto de la temperatura y tiempo de incubación sobre la actividad bacteriocinogénica de R. leguminosarum bv. *viceae* Z25.

T ^a incubación (°C)	Tiempo de incubación (días)		
	3	5	7
20	5	6	7
24	5	6	8
28	5-6	7	9-10
32	4	6	6
37	4	5	5

Como se indica en la Tabla 1, la cepa Z25 expresa la actividad bacteriocinogénica cuando crece a cualquiera de las temperaturas probadas, si bien la temperatura más favorable en las condiciones del ensayo es 28°C, en especial para tiempos de incubación de 5 y 7 días. En otro experimento conducido

en el mismo medio de cultivo incubado a 4°C, la actividad bacteriocinogénica de la cepa Z25 también es detectada, aunque en este caso es necesario que los períodos de incubación sean superiores a 3 semanas.

Ejemplo 2

5

Las condiciones de cultivo seleccionadas para la cepa Z25 fueron las siguientes: Medio de cultivo: agar Y; Período de incubación: 3 días; Temperatura de incubación: 28°C; Cepa indicadora: *R. leguminosarum* bv. *viciae* M17.

10

Bajo estas condiciones de cultivo, se realizaron 8 grupos de experiencias, en cada una de ellas utilizando como fuente de carbono un compuesto orgánico diferente. Los medios se inocularon en picadura con suspensiones celulares de la cepa Z25, preparadas mediante centrifugación y doble lavado con solución salina estéril de un cultivo en fase exponencial de crecimiento obtenido en medio líquido TY incubado a 28°C con agitación (110 rpm). En cada experiencia se determinó el tamaño de la colonia formada por el cultivo productor, y el tamaño de la zona de inhibición del crecimiento de la cepa indicadora una vez efectuado el revelado. Los resultados de estas experiencias son los indicados en la Tabla 2.

15

20

Los resultados de la Tabla 2 muestran que la cepa Z25 crece adecuadamente en medios de cultivo mínimos, adicionados de polialcoholes, monosacáridos (hexosas y pentosas), disacáridos o trisacáridos, expresando la actividad bacteriocinogénica de manera similar en todos los casos con independencia del sustrato carbonado disponible como fuente de carbono y energía, y a pesar de las pequeñas diferencias apreciadas en el crecimiento (tamaño colonial).

TABLA 2

25

Efecto de la fuente de carbono sobre el crecimiento y actividad bacteriocinogénica de R. leguminosarum bv. *viciae* cepa Z25.

30

Fuente de C (25 mM)	Tamaño colonial (mm)	Zona de inhibición (mm)
D-Manitol	2,5	5
D-Fructosa	1	4
D-Glucosa	2	5
Sacarosa	2	5
L-Arabinosa	1	5
L-Ramnosa	1,5	4-5
D-Sorbitol	2	5-6
D-Trehalosa	1	5

35

40

Ejemplo 3

45

Las condiciones de este experimento fueron las siguientes: Material vegetal: plántulas de *V. faba* cv. Alborea, obtenidas a partir de semillas desinfectadas y germinadas durante 72 h a 25°C en condiciones asépticas; Cultivo de las plantas: en sistemas hidropónicos del tipo Jarra Leonard, alimentados con solución nutritiva libre en N y manteniendo las condiciones monoxénicas; Inoculantes: 17 cultivos puros de *R. leguminosarum* bv. *viciae*.

50

Los inoculantes consistieron en suspensiones bacterianas de cada uno de los cultivos puros, obtenidas a partir de cultivos líquidos en medio YMB (Jordan, D.C. 1984. En *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* Vol. 1 ed. Krieg, N.R. y Holt, J.G., pp.235-242. Baltimore, USA: Williams and Wilkins) a los que se les ajustó la densidad celular inicial a 10 (Paau, A.S. 1989. Appl. Environ. Microbiol. 55:862-865) células/ml. La pauta de inoculación consistió en la adición de 1 ml de suspensión bacteriana por plántula en el momento de la siembra en las jarras Leonard.

55

60

Tras 30 días de cultivo en cámara bajo condiciones controladas de temperatura y fotoperíodo, se determinó en cada caso la actividad nitrogenasa mediante el test de reducción de acetileno (Caba, J.M. 1991. Variabilidad Genotípica del Metabolismo Simbiótico en *Vicia faba*: Efecto del Nitrato. Tesis Doctoral, Departamento de Biología Vegetal de la Universidad de Granada), así como el número y peso seco de los nódulos (PSN) inducidos en las plantas por cada uno de los aislamientos probados.

ES 2 099 679 B1

La Tabla 3 contiene los resultados de estos experimentos. La actividad reductora de acetileno (ARA) se expresa en μ moles de etileno producido por g de peso seco de nódulos y hora (ARA específica, $\text{ARA g}^{-1} \text{PSN h}^{-1}$), así como en μ moles de etileno producido por planta y hora (ARA por planta, $\text{ARA planta}^{-1} \text{h}^{-1}$). Cada valor de la Tabla 3 es la media de 4 plantas por tratamiento.

5

Los resultados de la Tabla 3 demuestran la mayor eficiencia simbiótica de la cepa Z25, en relación con otras cepas de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* utilizadas como inoculante para las leguminosas.

10 Descrita suficientemente la naturaleza del invento, así como la manera de ponerlo en práctica, se hace constar que todo cuanto no altere, cambie o modifique su principio fundamental, puede quedar sometido a variaciones de detalle.

TABLA 3

Efectividad simbiótica de distintos aislamientos de R. leguminosarum bv. viciae aplicados como inoculantes a V. faba cv. Alborea.

15

Cepa	PSN (mg)	N° nódulos	ARA $\text{g}^{-1} \text{PSN h}^{-1}$	ARA $\text{planta}^{-1} \text{h}^{-1}$
D1A	90,0	135	69,00	5,21
D14	66,0	146	100,19	6,53
D15	119,3	91	79,54	9,67
25 F14	100,0	183	29,18	2,99
F15	141,5	164	38,98	5,63
M17	170,0	162	52,92	8,88
M18	75,0	124	41,64	3,03
30 O1A	87,5	142	27,79	2,30
O1C	124,0	151	27,98	3,43
O1H	126,0	136	45,61	5,47
O22	149,0	178	21,52	3,23
O26	126,0	168	44,00	5,30
35 Z12	46,0	149	36,97	2,65
Z13	92,5	212	46,68	4,06
Z25	119,0	209	74,25	7,50
Z26	175,3	253	43,37	7,41
Z27	156,3	194	52,72	8,22
40 Media	115,5	168	48,86	5,39

45

50

55

60

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento microbiológico para la mejora del cultivo de leguminosas, **caracterizado** por la utilización de la cepa *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae* Z25 (CECT 4585).

5

2. Cultivo biológicamente puro de una cepa de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae* contramarcada con las siglas CECT 4585, **caracterizado** por su capacidad para producir antimicrobianos tipo bacteriocina.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60



INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤ Int. Cl.⁶: C05F 11/08, C12N 1/20 // (C12N 1/20, C12R 1:41)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X Y	BASE DE DATOS WPIL en QUESTEL, semana 9444, Londres: Derwent Publications Ltd., AN 94-356622, SU-1824384-A (MICROBIOLOG VIRTOLOGY INST.), resumen	1 2
X Y	BASE DE DATOS WPIL en QUESTEL, semana 9205, Londres: Derwent Publications Ltd., AN 92-039173 SU-1629295-A (AGRIC MICROBIOL RES), resumen	1 2
Y	HIRSCH, P.R. Plasmid-determined bacteriocin production by Rhizobium leguminosarum. Journal of General Microbiology, 1979, Vol. 113, páginas 219-228	2
A	WO-9425568-A (HER MAJESTY THE QUEEN IN RIGHT OF CANADA, THE MINISTER OF AGRICULTURE) 10.11.94	1,2
A	TRIPLETT, E.W. The molecular genetics of nodulation competitiveness in Rhizobium and Bradyrhizobium. Molecular Plant-Microbe Interactions, 1990, Vol. 3 (4), páginas 199-206	1,2
A	GB-1107240-A (AKTIEBOLAGET ASTRA) 21.12.66	1,2

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones n.º:

Fecha de realización del informe
28.02.97

Examinador
A. Polo Díez

Página
1/1