

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-138538- -00000-0000

Fecha: 2013-06-07 15:19:31

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR

Tra. 11 PATENTEIYII

Eve: 378 FASENACIONALI

Act. 411 PRESENTACION

Folios: 45

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No.

54. TITULO: COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA MEJORAR EL CRECIMIENTO Y RESTRINGIR LA CAPTACIÓN DE ARSÉNICO EN EL ARROZ.

51. CLASIFICACION INTRNACIONAL A01N 63/02

71. SOLICITANTE: UNIVERSITY OF DELAWARE

DOMICILIO: Delaware, Estados Unidos de América.

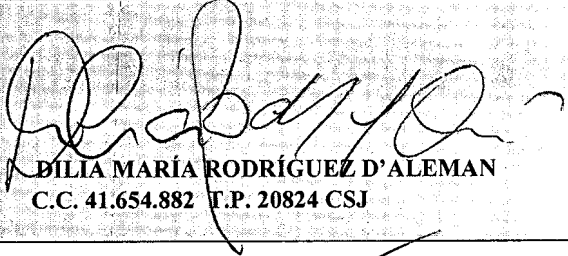
74. APODERADO DILIA RODRIGUEZ D'ALEMAN

22. BOGOTÁ, D.C.

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO  No. 13-138538-00000-0000 Fecha: 2013-06-07 15:19:31 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI Act. 411 PRESENTACION Folios: 45 icación
--	--

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
SOLICITUD FASE NACIONAL – PCT

1	TIPO DE SOLICITUD	☒ Patente de invención ☒ Capítulo I	☐ Patente de Modelo de Utilidad ☐ Capítulo II
2	DATOS SOLICITUD INTERNACIONAL PCT (86)		
Solicitud Internacional No.		PCT/US2011/026693	Fecha 01 de Marzo de 2011
Publicación Internacional No.		WO 2012/ 067668 A1	Fecha 24 de Mayo de 2012
3	TÍTULO DE LA INVENCIÓN (200 caracteres o espacios máximos)		
COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA MEJORAR EL CRECIMIENTO Y RESTRINGIR LA CAPTACIÓN DE ARSÉNICO EN EL ARROZ			
4	CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL (CIP) A01N 63/02		
5	SOLICITANTE (S) ☐ Esta persona también es inventor. Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria		
APELLIDOS O RAZÓN SOCIAL		NOMBRE	IDENTIFICACIÓN TIPO
UNIVERSITY OF DELAWARE			
6	DATOS DEL SOLICITANTE		
DIRECCIÓN: 1 Innovation Way, Delaware Technology Park Building 1, Suite 500 Newark,		No. TELÉFONO: CORREO ELECTRONICO:	
CIUDAD: Delaware 19711,		LUGAR DE CONSTITUCIÓN: Estados Unidos de América	
PAÍS DE RESIDENCIA: Estados Unidos de América			
7	INVENTOR (ES)		
APELLIDOS		NOMBRES	NACIONALIDAD
1.BAIS,		Harsh	Estadounidense
2.SHERRIER,		Darla, Janine	Estadounidense
3.ALFF,		Emily	Estadounidense
DIRECCIÓN DE CORREO ELECTRÓNICO:			
8	DATOS INVENTOR (ES)		
DIRECCIÓN		CIUDAD	ESTADO PAÍS RESIDENCIA
1.46 Palo Lane,		Newark,	Delaware 19702, Estados Unidos de América
2.803 Walnut Hill Court,		Hockessin,	Delaware 19707, Estados Unidos de América
3.704 Church Street,		Royersford,	Pennsylvania 19468, Estados Unidos de América
OTRO(S) SOLICITANTE(S) Y/O (OTRO(S)) INVENTOR(ES)			
☐ Los demás solicitantes y/o (demás) inventores se indican en una hoja a continuación.			
9	☐ REPRESENTANTE LEGAL ☒ APODERADO		
APELLIDOS		NOMBRES	IDENTIFICACIÓN
RODRIGUEZ D'ALEMAN		DILIA MARIA	C.C.41.654.882 T.P.20824 CSJ
DIRECCIÓN Cra. 11 No. 86 – 53, Piso 6		No. TELÉFONO 6181088	
CIUDAD Bogotá, D.C.		CORREO ELECTRÓNICO clarkemodet@clarkemodet.com.co	
PAÍS Colombia			
10	DECLARACIONES DE PRIORIDAD ☒ SI ☐ NO		
(33) PAÍS DE ORIGEN		CÓDIGO PAÍS	(31) NÚMERO (32) FECHA AAA/MM/DD
1.Estados Unidos de América		US	61/414.258 2010/11/16
2.Estados Unidos de América		US	61/414.108 2010/11/16
3.Estados Unidos de América		US	61/416.043 2010/11/22
4.Estados Unidos de América		US	61/420.372 2010/12/07

11	DECLARACIÓN SOBRE USO DE RECURSOS GENÉTICOS O BIOLÓGICOS		
Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de recursos genéticos o biológicos de los que cualquiera de los países miembros de la Comunidad Andina es país de origen.			
☐ SI ☐ NO			
Nota: En caso afirmativo deberá anexar copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, o certificado o número de registro, expedido por la Autoridad competente.			
12	DECLARACIÓN SOBRE USO DE CONOCIMIENTOS TRADICIONALES		
Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de conocimientos tradicionales de comunidades indígenas, afroamericanas o locales de países miembros de la Comunidad Andina.			
☐ SI ☐ NO			
Nota: En caso afirmativo deberá anexar la licencia o autorización de uso de conocimiento tradicional, o certificado, o número de registro expedido por la Autoridad competente.			
13	REDUCCIÓN DE TASAS		
Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente.			
☐ SI ☐ NO			
Nota: En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolución vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.			
Micro, pequeñas y medianas empresas ☐			
Universidades públicas o privadas ☐			
Entidades sin ánimo de lucro ☐			
Debe aportar los documentos que se indican en el numeral 17 de anexos			
14	AUTORIZACIÓN DE NOTIFICACIÓN EN LÍNEA ☐ SI ☐ NO		
Manifiesto que he leído y entendido perfectamente los términos y condiciones de uso de medios electrónicos para las notificaciones en línea a través de Internet de los actos administrativos proferidos por la Superintendencia de Industria y Comercio que deben ser notificados personalmente y, en consecuencia, autorizo el servicio de notificación a través de internet.			
15	COMPROBANTE DE PAGO O PAGO ELECTRÓNICO	N° 13-053337 13-051175	Fecha 04/06/2013 28/05/2013
16	FIRMA DEL APODERADO :		
 DILIA MARÍA RODRÍGUEZ D'ALEMAN C.C. 41.654.882 T.P. 20824 CSJ			
17	ANEXOS		
Documentación Técnica Solicitud Internacional en castellano		Documentación Jurídica	
1. ☒ Descripción N° de folios: 29		9. ☐ Poderes, si fuera el caso.	
2. ☒ Reivindicaciones N° Reivindicaciones: 20		10. ☐ Documento que legalmente pruebe la cesión del inventor al solicitante o a su causante.	
3. ☒ Dibujos y/o figuras N° folios: 8		11. ☐ Copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, certificado o número de registro, si fuera el caso.	
4. ☒ Resumen.		12. ☐ Copia de la licencia o autorización de Conocimientos Tradicionales, certificado o número de registro, si fuera el caso.	
5. ☐ Certificado de depósito de material biológico si fuera el caso.		13. Reducción de tasas	
6. ☐ Listado de secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos en forma digital si fuera el caso.		Micro, pequeñas o medianas empresas	
7. ☐ Arte final 12 x 12.		☐ Copia simple de la declaración de renta del año inmediatamente anterior, o en su defecto prueba documental idónea.	
8. ☐ Anexo formato digital.		☐ Documento de constancia de cumplimiento con lo establecido en la ley 905 de 2004.	
		Universidades públicas o privadas	
		☐ Copia acto de reconocimiento institucional emitido por el Ministerio de Educación	
		Entidades sin ánimo de lucro	
		☐ Copia de registro vigente en Cámara de comercio.	
		☐ Hoja de información complementaria.	
		☐ Otros, especificar	
		14. ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.	
		15. ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad.	
		16. ☐ Comprobante de pago de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación.	
		17. ☒ Comprobante de pago por reivindicación adicional a 10.	

**COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA MEJORAR EL CRECIMIENTO Y
RESTRINGIR LA CAPTACIÓN DE ARSÉNICO EN EL ARROZ**

REFERENCIA A SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud invoca prioridad de la Solicitud N° Acta 61/414,108, presentada el 16 de noviembre, 2010, de la Solicitud N° Acta 61/414,258, presentada el 16 de noviembre, 2010, de la Solicitud N° Acta 61/416,043, presentada el 22 de noviembre, 2010, y de la Solicitud N° Acta 61/420,372, presentada el 7 de diciembre, 2010, que se incorporan por completo en la presente a modo de referencia y para todo propósito.

DECLARACIÓN DE APOYO GUBERNAMENTAL

Las investigaciones que condujeron a las invenciones divulgadas se llevaron a cabo, en parte, con el Subsidio N° 0923806 de la *National Science Foundation*. Por lo tanto, el gobierno de los EE.UU. puede tener ciertos derechos en esta invención.

CAMPO DE LA INVENCIÓN

Esta invención se relaciona en general con el uso de microbios aislados de una rizosfera de arroz para contar con un efecto antifúngico para los patógenos vegetales, para mejorar el crecimiento de las plantas y para restringir la captación de arsénico en plantas de arroz.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

El arroz (la semilla de las plantas monocotiledóneas *Oryza sativa* u *Oryza glaberrima*) es el alimento básico más importante para más de dos tercios de la población mundial, que provee una proporción significativa de las calorías consumidas. La inducción de mayores velocidades de crecimiento en el arroz puede ayudar a asegurar una mayor disponibilidad de la materia prima esencial para la población mundial en crecimiento.

El brusone (*Magnaporthe oryzae*) del arroz es un hongo

000002

patógeno de plantas que causa una enfermedad severa que afecta al arroz y plantas relacionadas. Anualmente, causa pérdidas en los cultivos que son económicamente significativas, lo cual contribuye a un 40% aproximadamente de pérdida en el rendimiento del cultivo. El brusone del arroz destruye una cantidad suficiente de arroz como para alimentar a millones de personas en todo el mundo en cada estación de crecimiento. Dado que el arroz es un importante alimento básico para en gran parte del mundo, los efectos del brusone del arroz tienen un gran impacto sobre la salud humana y el medio ambiente. La escasez de arroz contribuye directamente con el hambre en humanos. El brusone del arroz también contribuye con la pérdida de cultivo y requiere del uso de recursos adicionales para compensar el rendimiento reducido causado por la enfermedad. Persiste una gran necesidad de métodos para reducir el brusone del arroz, así como métodos para aumentar el crecimiento de las plantas de arroz.

La contaminación del arroz y de otros cultivos con arsénico afecta a numerosas regiones de todo el mundo incluyendo Bangladesh, China, Chile, India, México, Europa y los EE.UU. El arsénico inorgánico es una toxina comprobada y se ha demostrado que es un carcinógeno. En particular, el arroz producido en la Planicie del Delta de Bengala en Bangladesh, en especial en los puntos calientes de arsénico, se acumula arsénico inorgánico y su consumo contribuye en el envenenamiento masivo a gran escala de los habitantes de la región. La intoxicación severa por arsénico es común en Bangladesh y da como resultado lesiones en la piel y daño neurológico. La exposición crónica a niveles bajos aumento la incidencia de diversos tipos de cáncer y causa desfiguración y diarrea recurrente. Para empeorar la situación, las concentraciones elevadas de

000003

arsénico en el suelo son fitotóxicas y pueden contribuir en un menor llenado de los granos, un menor rendimiento y una disponibilidad reducida de alimento.

Afortunadamente, las plantas han desarrollado múltiples
5 mecanismos para superar los distintos tipos de estrés
abiótico observados durante el crecimiento, y estas
estrategias de supervivencia inherentes se pueden utilizar
para reducir la asimilación de arsénico. Actualmente, se
están cultivando variedades de arroz con una acumulación
10 reducida de arsénico. Además, se han utilizado enfoques de
manipulación mediante ingeniería genética para reducir la
disponibilidad de arsénico en el suelo. A pesar de estos
esfuerzos importantes y sustanciales, se estima que unas 50
millones de personas en esta región que actualmente tienen
15 riesgo de sufrir un envenenamiento por arsénico
debilitante. Sigue habiendo una gran necesidad de
prácticas agronómicas sustentables que permitan reducir las
concentraciones de arsénico en el grano de arroz.

RESUMEN DE LA INVENCION

20 De acuerdo con la presente invención, se provee un método
para inhibir una infección fúngica de una planta, en
particular de una planta de arroz o de un cultivo
relacionado (por ejemplo, cebada), por un patógeno de
plantas que comprende administrar una o más formas aisladas
25 de rizosferas de arroz a la planta, a las semillas de la
planta o al suelo que rodea a la planta, en una cantidad
eficaz para inhibir una infección por el patógeno de
plantas en comparación con una planta no tratada.

Otro método de acuerdo con la invención comprende
30 administrar una o más formas aisladas de rizosferas de
arroz a una planta, en particular una planta de arroz o un
cultivo relacionado (por ejemplo, cebada), a la semilla de
la planta o al suelo que rodea a la planta en una cantidad

000004

eficaz para producir una mayor biomasa en la planta en comparación con una planta no tratada.

Otro método de acuerdo con la invención comprende administrar una o más formas aisladas de rizosferas de arroz a una planta, a la semilla de la planta o al suelo que rodea a la planta, en una cantidad eficaz para producir una menor concentración de arsénico en la planta en comparación con una planta no tratada.

Formas de realización adicionales proveen vehículos para uso en agricultura y recubrimientos de semillas que comprenden una o más formas aisladas de rizosferas de arroz. Las plantas pueden ser inoculadas con las formas aisladas de rizosferas de arroz mediante cualquier método conocido, incluyendo inoculación de raíces, de semillas o foliar.

DESCRIPCIÓN BREVE DE LAS FIGURAS

Figura 1. Los microbios rizosféricos promueven el crecimiento y la aptitud del arroz, como lo demuestran la mayor longitud de raíces y brotes en las plantas de arroz (*Nipponbare*) inoculadas con las formas aisladas combinadas de rizosferas de arroz que se muestran en la Tabla 1 en comparación con plantas no tratadas.

Figura 2. Peso seco de la biomasa de plantas de arroz (*Nipponbare*) en el momento de la cosecha después de la inoculación con las formas aisladas combinadas de rizosferas de arroz que se muestran en la Tabla 1 en comparación con plantas no tratadas.

Figura 3. Aberturas de los estomas en arroz (*Nipponbare*) como respuesta a la inoculación con una mezcla de las formas aisladas de rizosferas de arroz que se muestran en la Tabla 1. Las células oclusivas de los estomas se observaron después de 4 semanas de tratamiento.

Figura 4. Diámetros promedio de crecimiento de *M. oryzae* in

000005

vitro después del tratamiento con las formas aisladas de rizosferas de arroz.

Figura 5. Efecto de las formas aisladas de rizosferas de arroz sobre la formación de lesiones de hojas de *M. oryzae*.

5 Figura 6. Contenido total de hierro (Fe) y fósforo (P) en plantas de arroz tratadas con una mezcla de las diez formas aisladas de rizosferas de arroz que se muestran en la Tabla 1.

10 Figura 7. Tolerancia al arsénico en arroz suplementado con la forma aislada de rizosfera de arroz EA106.

Figura 8. Tolerancia al arsénico en formas aisladas de raíz de arroz.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

15 La presente invención se relaciona con el uso de microbios aislados de una rizosfera de arroz para tener un efecto antifúngico sobre patógenos de plantas, en particular el brusone del arroz (por ejemplo, *Magnaporthe oryzae*), para inducir un mayor crecimiento de la planta y la biomasa resultante, y para restringir la captación de arsénico en
20 plantas, en particular en plantas de arroz.

Los Solicitantes identificaron, por medio de secuenciación del ARN 16S, diversas proteobacterias de la rizosfera de arroz de arroz sano cultivado en Norte América, y otros cultivos aislados y establecidos de doce rizobacterias
25 diferentes y las identificaron mediante análisis de ácidos grasos. Los Solicitantes también usaron un medio rico y mínimo media como técnicas de cultivo para cultivar los microbios rizosféricos enumerados en la Tabla 1. Brevemente, se resuspendieron muestras de rizosfera en
30 medio mínimo sin carbono a una concentración de 0,1 g FW ml⁻¹. Esta suspensión se usó para inocular una serie de dilución en serie 10X en placas de 96 cavidades que contenían medio mínimo con benzoato de sodio (1 g l⁻¹) como

000006

única fuente de carbono. Las placas se incubaron con aire ambiente humidificada a temperatura ambiente durante cinco días antes de calificar el crecimiento y la interpretación utilizando tablas MPN estándar.

- 5 Para caracterizar y distinguir las especies de bacterias aisladas de la rizosfera de arroz, se analizaron los tipos y las proporciones de ácidos grasos presentes en la membrana celular y los lípidos de la membrana externa (Gram negativa) de las células utilizando FAME. Para conducir
- 10 este análisis, se cultivaron cepas individuales *in vitro*, y los ácidos grasos se extrajeron y usaron para formar metil ésteres. Los derivados volátiles se separaron mediante cromatografía gaseosa. Las muestras fraccionadas se midieron como un patrón de los picos o "huellas
- 15 dactilares", que se comparó con una biblioteca microbiana de referencia costosa con el fin de identificar al organismo. Esta técnica se utiliza ampliamente en la caracterización de bacterianas especies, incluyendo nuevas especies de bacterias que no están presentes en la
- 20 biblioteca de referencia, y es de utilidad para identificar cepas bacterianas patógenas. Los resultados del análisis FAME sobre diez de las formas aisladas de rizosferas de arroz se resumen en la Tabla 1. No se determinaron las identidades de las dos formas aisladas remanentes.

25 **Tabla 1**

Nombre de la forma aislada	Índice Sim	Nombre de la entrada	Nivel de confianza/comentario
EA101	0.682	<i>Pedobacter-heparinus</i> (<i>Cytophaga heparina</i> , <i>Sphingobacterium</i>)	ESPECIE

000007

EA102	0.776	<i>Chryseobacterium-balustinum</i> (<i>Flavobacterium</i>)	ESPECIE, estrechamente relacionada con <i>C. indologenes</i>
	0.712	<i>Chryseobacterium-</i> <i>indologenes</i> (<i>Flavobacterium</i>)	
EA103	0.807	<i>Gordonia-rubripertincta</i> -GC subgrupo A (<i>Rhodococcus</i>)	ESPECIE, estrechamente relacionada con <i>R. erythropolis</i>
	0.787	<i>Rhodococcus-erythropolis</i> / <i>R.</i> <i>globerulus</i> / <i>N. globerula</i>	
EA104	0.761	<i>Pseudomonas-corrugata</i>	Especie inconclusa- grupo de <i>P.</i> <i>fluorescens</i>
	0.761	<i>Pseudomonas-putida</i> -biotipo <i>B/vancouverensis</i>	
	0.742	<i>Pseudomonas-fluorescens-</i> biotipo B	
EA105	0.598	<i>Pseudomonas-</i> <i>clororaphis/aureofaciens/au</i> <i>rantiaca</i>	GÉNERO
EA106	0.896	<i>Pantoea-agglomerans</i> -GC subgrupo A (<i>Entb. agglom.</i> , <i>Er.</i>	ESPECIE
EA107	0.77	<i>Pseudomonas-</i> <i>clororaphis/aureofaciens/au</i> <i>rantiaca</i>	ESPECIE, estrechamente relacionada con <i>P. putida</i>
	0.769	<i>Pseudomonas-putida</i> -biotipo	

000008

		<i>B/vancouverensis</i>	
EA108	0.785	<i>Pseudomonas-putida-biotipo</i> <i>B/vancouverensis</i>	ESPECIE, estrechamente relacionada con <i>P. fluorescens</i>
	0.725	<i>Pseudomonas-fluorescens-</i> <i>biotipo G/taetrolens</i>	
EA201	0.758	<i>Arthrobacter-oxidans</i>	ESPECIE, estrechamente relacionada con <i>A. globiformis</i>
	0.709	<i>Arthrobacter-globiformis-GC</i> subgrupo A (algunas 48 hs)	
EA202		**Sin coincidencias en la biblioteca RTSBA6 - Especie Gram (-)	SIN COINCIDENCIA- Especie Gram(-)

Según se usa en la presente, "una o más formas aisladas de rizosferas de arroz" se refiere a una o más de las diez formas aisladas de rizosferas de arroz provistas en la Tabla 1.

- 5 Notablemente, la mayoría de las rizobacterias cultivadas aisladas de la rizosfera de arroz pertenece a la clase de las proteobacterias y eran predominantemente pseudomonadas lo cual es indicativo de la abundancia de esas proteobacterias en la rizósfera de arroz. Las formas
- 10 aisladas de rizosferas de arroz se identificaron más próximamente mediante el análisis FAME como *Pedobacter heparinus* ("EA101"), *Chryseobacterium indologenes* (*Flavobacterium*) ("EA102"), *Rhodococcus erythropolis* (actinomicete) ("EA103"), grupo de *Pseudomonas fluorescens* ("EA104"), *Pseudomonas* ("EA105"), *Pantoea agglomerans* ("EA106"), *Pseudomonas putida* ("EA107"), *Pseudomonas fluorescens* ("EA108"), *Arthrobacter oxidans*
- 15

(actinobacterias) ("EA201") y *Dyadobacter* ("EA202"). En los casos donde la especie no estaba representada en la biblioteca bacteriana de referencia, se indicó la coincidencia de especie más próxima (Tabla 1).

- 5 Las formas aisladas de rizosferas de arroz descritas previamente (EA101-EA202) representan un subconjunto de bacterias rizosféricas de arroz que fueron evaluadas por el efecto sobre el transcriptoma de arroz. El conjunto completo de bacterias analizadas se agrupan en siete
- 10 géneros diferentes, representados por un total de 14 secuencias determinadas por secuenciación de los clones de ADNr 16S 2514, y los números de las secuencias se resumen en la Tabla 2.

Tabla 2: Cuentas de la secuencia de ADNr 16S a lo largo de los linajes de la cepa

Filum	Clase	Orden	Familia	Género	N° cepa
Bacteroidetes 119	Sphingobacteria 82	Sphingobacteriales 82	Cytophagaceae 14	Dyadobacter 0	EA202
			Sphingobacteriaceae 9	Pedobacter 1	EA101
	Flavobacteria 9	Flavobacteriales 9	Flavobacteriaceae 7	Chryseobacterium 0	EA102
Actinobacteria 43		Actinomycetales 21	Nocardiaceae 0	Rhodococcus 0	EA103
			Micrococcaceae 9	Arthrobacter 9	EA201
Proteobacteria 1339	Gamma Proteobacteria 111	Pseudomonadales 9	Pseudomonadaceae 4	Pseudomonas 4	EA104, EA105, EA107, EA108
		Enterobacteriales 28	Enterobacteriaceae 28	Pantoea 0	EA106

000011

A partir de ello se puede observar que para la cepa bacteriana EA201 hay otras nueve secuencias ADNr 16S que se agrupan dentro del mismo género (*Arthrobacter*) y 43 que pertenecen al mismo phylum (*Actinobacteria*). Hay una
5 representación relativamente alta dentro de las secuencias ADNr 16S de un género dentro de la población aislada total. Por el contrario, cuatro secuencias en un género de cepas de *Pseudomonas* (EA104, EA105, EA107 y EA108), y una cepa adicional (1339) del mismo phylum estaba representada en la
10 población aislada. El género y las especies de las cepas EA102, EA103, EA106, y EA202 no están representados por secuencias en el conjunto de datos de ADNr 16S, lo cual indica que son cepas bacterianas únicas y no descritas con anterioridad.

15 Los Solicitantes han demostrado que las formas aisladas de rizosferas de arroz descritas previamente (es decir, microbios aislados de una rizosfera de arroz, tal como del suelo que rodea a las plantas de arroz) provocan una respuesta de cierre general de los estomas en plantas, en
20 particular en plantas de arroz. Han mostrado que el crecimiento del brusone del arroz sobre arroz y cebada es atenuado por la adición anterior (utilizando cualquier método de inoculación) de una o más formas aisladas de rizosferas de arroz. Además, los Solicitantes han mostrado
25 que la inoculación con una o más formas aisladas microbianas de arroz mejora el crecimiento vegetativo y de granos de arroz y el rendimiento de granos.

El método para inhibir la infección de una planta por un patógeno de plantas, tal como un patógeno fúngico, de
30 acuerdo con la invención comprende administrar una o más formas aisladas de rizosferas de arroz a una planta, a la semilla de la planta o al suelo que rodea a la planta, en una cantidad eficaz para inhibir la infección por el

patógeno de plantas en comparación con una planta no tratada. Los ejemplos de plantas incluyen plantas de arroz y cebada, tal como el cultivar de arroz *Nipponbare*. En una forma de realización particular, la presente invención
5 provee métodos para inhibir la infección de una planta de arroz con el brusone del arroz, que comprende administrar una o más de las formas aisladas de rizosferas de arroz a la planta de arroz, a la semilla de la planta de arroz o al suelo que rodea a la planta o a la semilla de arroz en una
10 cantidad eficaz como para inhibir la infección de la planta de arroz por el brusone del arroz en comparación con una planta de arroz no tratada. Las plantas de arroz adecuadas para su uso en la invención incluyen *Oryza sativa*, *Oryza glaberrima*, y todas las subespecies y cultivares de las
15 mismas. Según se usa en la presente, el "brusone del arroz" se refiere al hongo patógeno de plantas *Magnaporthe grisea* o *Magnaporthe oryzae*.

Los síntomas del brusone del arroz incluyen lesiones o manchas (que pueden ser, por ejemplo, blancas o grises)
20 producidas sobre cualquier parte de la planta, en particular sobre las partes aéreas de la planta, tal como las hojas. Según se usa en la presente, "inhibir la infección" se refiere a la producción de una infección fúngica reducida en la planta de arroz, medida por una
25 reducción en los síntomas de la infección fúngica, por ejemplo, un número reducido de lesiones sobre las porciones aéreas de la planta de arroz en comparación con una planta no tratada, o un tamaño reducido de algunas o todas las lesiones. Por ejemplo, en formas de realización
30 particulares, se administra una o más formas aisladas de rizosferas de arroz a una planta de arroz, a la semilla de la planta de arroz o al suelo que rodea a la planta o a la semilla de arroz en una cantidad eficaz como para reducir

el número de lesiones sobre la planta de arroz causados por el brusone del arroz en al menos aproximadamente 5%, al menos aproximadamente 10%, al menos aproximadamente 20% o entre aproximadamente 5% y aproximadamente 100%, entre aproximadamente 10% y aproximadamente 80%, entre aproximadamente 20% y aproximadamente 60% o entre aproximadamente 30% y aproximadamente 50%, en comparación con una planta de arroz no tratada. Según se muestra, por ejemplo, en la Tabla 4 y en la Figura 5, el número promedio de lesiones observado por planta se redujo cuando las plantas eran inoculadas con EA103 (reducido en aproximadamente 60%), EA104 (reducido en aproximadamente 36%), EA105 (reducido en aproximadamente 30%), EA106 (reducido en aproximadamente 68%) y EA201 (reducido en aproximadamente 40%), en comparación con el control (es decir, sin tratamiento con formas aisladas de rizosferas de arroz).

En otras formas de realización, se administra una o más formas aisladas de rizosferas de arroz a una planta de arroz, a la semilla de la planta de arroz o al suelo que rodea a la planta o a la semilla de arroz en una cantidad eficaz como para reducir el crecimiento radial de *Magnaporthe oryzae in vitro* en al menos aproximadamente 5%, al menos aproximadamente 10%, al menos aproximadamente 20% o entre aproximadamente 5% y aproximadamente 100%, entre aproximadamente 10% y aproximadamente 80%, entre aproximadamente 20% y aproximadamente 60% o entre aproximadamente 30% y aproximadamente 50%, en comparación con una planta de arroz no tratada. Según se muestra, por ejemplo, en la Tabla 3 y en la Figura 4, EA105 y EA106 redujeron el crecimiento radial de *Magnaporthe oryzae* entre aproximadamente un 77% y aproximadamente un 50%, respectivamente, en comparación con los controles.

000014

La presente invención también provee métodos para producir una mayor biomasa en una planta que comprende administrar una o más de las formas aisladas de rizosferas de arroz a una planta, a la semilla de la planta o al suelo que rodea a la planta o a la semilla en una cantidad eficaz para producir una mayor biomasa en la planta en comparación con una planta no tratada. Según se usa en la presente, en una planta la biomasa se refiere a la masa total de la materia de la planta. A menos que se especifique de otra manera, la biomasa comprende tanto la biomasa aérea (es decir, la biomasa área que incluye, pero en un sentido no limitativo tallos, hojas y/o granos) y la biomasa subterránea (es decir, las raíces). La biomasa de una planta a la cual se le ha administrado una o más formas aisladas de rizosferas de arroz se puede medir de acuerdo con métodos conocidos. En una forma de realización, la biomasa de la planta se mide de acuerdo con el peso seco (DW) de la planta en gramos.

La biomasa de una planta a la cual se le ha administrado una o más de las formas aisladas de rizosferas de arroz se puede medir en un punto de tiempo que comprende entre aproximadamente 3 días y aproximadamente 100 días, entre aproximadamente 5 días y aproximadamente 85 días o entre aproximadamente 15 días y aproximadamente 35 días después de la administración de una o más de las formas aisladas de rizosferas de arroz a la planta. Como alternativa, la biomasa de una planta de cultivo a la cual se le ha administrado una o más de las formas aisladas de rizosferas de arroz se puede medir en el momento de la cosecha de la planta para recolectar sus granos o productos, es decir, en el momento en que la planta madura es recogida de un campo (por ejemplo, a los 80 días de post-inoculación de una planta de arroz). A modo de ejemplo, una planta de cultivo

000015

a la cual se le ha administrado una o más de las formas aisladas de rizosferas de arroz de acuerdo con un método de la presente invención produce una mayor cantidad de biomasa medida en gramos de peso seco de biomasa aérea y subterránea, en una cantidad que se determina mediante un análisis estadístico estándar como mayor que en una planta no tratada. Por ejemplo, en una forma de realización, el método comprende administrar una o más de las formas aisladas de rizosferas de arroz a la planta semilla en una cantidad eficaz como para producir una mayor biomasa en la planta en una cantidad entre aproximadamente 5% y aproximadamente 100% mayor que una planta no tratada, después de la administración de dichas una o más las formas aisladas de rizosferas de arroz.

Los Solicitantes han descubierto además que la inoculación de arroz con formas aisladas de rizosferas de arroz (es decir, microbios aislados del suelo que rodea a plantas de arroz) restringe la captación de As y reduce la acumulación de As en el grano de arroz. En particular, los Solicitantes han identificado microbios naturales, no patógenos de las raíces de arroz sano y han mostrado que promueven el crecimiento del arroz sano y mejoran el potencial de oxidación de la rizosfera. Esto crea un microambiente donde el As se encuentra menos disponible para su asimilación por la planta en la cercanía inmediata de las raíces. Los inoculantes microbianos identificados por los Solicitantes se pueden usar para reducir la captación de As en arroz como un medio para mejorar la calidad del alimento. La presente invención tiene el potencial para reducir la ingesta de As por el alimento y de esa manera ofrecer una mejora casi inmediata y de bajo costo para la salud y calidad de vida humana que afectaría millones de personas. Aún más, se sabe que el As en arroz a

000010

grandes concentraciones en el suelo reduce el rendimiento de granos de arroz, y la presente invención puede ofrecer el beneficio adicional de cosechas mejoradas de granos de arroz. Dado que la contaminación del suelo y del alimento
5 afecta a numerosas regiones en todo el mundo incluyendo Bangladesh, China, Chile, India, Méjico, Europa y los EE.UU., la presente invención puede ofrecer aplicaciones de amplio alcance para la calidad del alimento y la salud humana en todas la regiones en desarrollo e
10 industrializadas del mundo.

Formas de realización adicionales de la presente invención proveen métodos para producir una menor concentración de arsénico en una planta que comprende administrar una o más formas aisladas de rizosferas de arroz a una planta, en
15 particular una planta de arroz, a la semilla de la planta antes de sembrarla o al suelo que rodea a la planta, en una cantidad eficaz para producir una menor concentración de arsénico en la planta en comparación con una planta no tratada. En particular, la forma aislada microbiana de
20 arroz EA106, descrita previamente en las Tablas 1 y 2, presenta una sorprendentemente fuerte actividad sideróforo de Fe que puede facilitar la formación de placas de Fe sobre las raíces. Esto se ilustra, por ejemplo, en las Figuras 7 y 8.

25 La concentración de arsénico en una planta se puede medir mediante métodos conocidos. Por ejemplo, se puede emplear ICP junto con ICP MS para medir As en plantas. La utilización de ICP MS también conduce a la cuantificación de especies de As en plantas. En formas de realización
30 particulares, se administra una o más formas aisladas de rizosferas de arroz a una planta de arroz, a la semilla de la planta de arroz antes de la siembra, o al suelo que rodea a la planta o a la semilla de arroz en una cantidad

000017

eficaz como para reducir la concentración de arsénico en la planta de arroz en al menos aproximadamente 5%, al menos aproximadamente 10%, al menos aproximadamente 20%, o entre aproximadamente 5% y aproximadamente 100%, entre
5 aproximadamente 10% y aproximadamente 80%, entre aproximadamente 20% y aproximadamente 60% o entre aproximadamente 30% y aproximadamente 50%, en comparación con una planta de arroz no tratada.

La presente invención provee además vehículos para uso en
10 agricultura que comprenden EA106, que se pueden aplicar a plantas (por ejemplo, a las raíces), al suelo que rodea a las plantas o a las semillas antes de la siembra, así como recubrimientos de semillas que comprenden EA106, que se pueden aplicar a las semillas de las plantas. La presente
15 invención también provee una semilla de una planta, preferiblemente una semilla de una planta de arroz, que está recubierta con EA106, de modo tal que todo o parte de la semilla tiene un recubrimiento o una película que comprende EA106. El vehículo agronómico puede comprender
20 EA106 en una cantidad de entre aproximadamente 1×10^7 CFU/ml y aproximadamente 1×10^9 CFU/ml, más preferiblemente aproximadamente 1×10^8 CFU/ml. El recubrimiento de semillas puede comprender EA106 en una cantidad de entre aproximadamente 1×10^7 CFU/semilla y aproximadamente 1×10^9
25 CFU/semilla, más preferiblemente de aproximadamente 1×10^8 CFU/semilla. El vehículo agronómico y el recubrimiento de semillas pueden, cada uno, consistir esencialmente de EA106 en un medio de crecimiento sin aditivos o materiales adicionales de ningún tipo. Como alternativa, el vehículo
30 agronómico y el recubrimiento de semillas pueden comprender, cada uno, EA106 en un medio de crecimiento, tal como agua, una solución acuosa o un polvo. El medio de crecimiento, la solución acuosa o el polvo pueden contener

aditivos adicionales, tal como un insecticida o un fungicida.

Según se usa en la presente, una "planta no tratada" se refiere a una planta de la misma especie y cultivada bajo
5 sustancialmente las mismas condiciones (por ejemplo, por el mismo tiempo, en el mismo clima y además cultivada de acuerdo con los mismos métodos usando los mismos materiales, midiéndose la biomasa, la tolerancia a patógenos, la concentración de arsénico y otras
10 características de acuerdo con los mismos métodos) que una planta a la cual se le ha administrado una o más formas aisladas de rizosferas de arroz de acuerdo con un método de la presente invención, excepto que a la planta no tratada no se le ha administrado una o más formas aisladas de
15 rizosferas de arroz, pero que en su lugar fue tratada con una inoculación falsa que consiste del medio de vehículo sin las bacterias. Según se usa en la presente, una mayor biomasa, una infección fúngica reducida o una concentración de arsénico reducida en una planta a la cual se le ha
20 administrado una o más formas aisladas de rizosferas de arroz en comparación con una planta no tratada se refiere a una mayor biomasa, una infección fúngica reducida o una concentración de arsénico reducida medidas en el mismo punto de tiempo, respectivamente.

25 En formas de realización particulares de los métodos que se describen en la presente relacionadas con la producción de una mayor biomasa, la reducción de una infección fúngica por patógenos y la restricción de la captación de arsénico, dichas una o más formas aisladas de rizosferas de arroz se
30 administran a las raíces de una planta en una cantidad de entre aproximadamente 1×10^7 CFU/planta y aproximadamente 1×10^9 CFU/planta, más preferiblemente aproximadamente 1×10^8 CFU/planta, y la planta se planta luego en el suelo o se

000019

cultiva en un medio de crecimiento hidropónico estandarizado. En formas de realización alternativas, se administra una o más formas aisladas de rizosferas de arroz a una semilla que luego será sembrada en una cantidad de entre aproximadamente 1×10^7 CFU/semilla y aproximadamente 1×10^9 CFU/semilla, más preferiblemente aproximadamente 1×10^8 CFU/semilla. Por ejemplo, se puede administrar una o más formas aisladas de rizosferas de arroz a una la semilla de una planta de arroz antes de sembrar la semilla en suelo y antes de la germinación.

Los métodos de la presente invención se pueden usar para tratar muchos tipos de plantas (así como sus semillas o el suelo que las rodea) para inhibir una infección por patógenos, producir una mayor biomasa y/o restringir la captación de arsénico por las plantas. Las plantas pueden incluir monocotiledóneas o dicotiledóneas. Los métodos de la presente invención están dirigidas particularmente a plantas de arroz o cebada, más particularmente a plantas de arroz.

De acuerdo con la invención, se puede administrar una o más formas aisladas de rizosferas de arroz a una planta mediante cualquier método conocido, en donde toda o parte de la planta es tratada, tal como por inoculación de raíces, de semillas o foliar. Por ejemplo, se puede administrar una o más formas aisladas de rizosferas de arroz a las porciones aéreas de una planta, tales como las hojas y el tallo, a las raíces de la planta, a la semilla de la planta antes de sembrar la semilla en suelo o al suelo que rodea a la planta o a la semilla de la planta. Los métodos de administración incluyen embebimiento, rociado, recubrimiento, inyección u otros métodos conocidos por los especialistas en el arte. Según se usa en la presente, la administración de una o más formas aisladas de

000020

rizosferas de arroz se refiere ya sea a una administración única, a una administración repetida (es decir, la administración de una o más formas aisladas de rizosferas de arroz más de una vez) o a una administración continua.

- 5 Se puede administrar una o más formas aisladas de rizosferas de arroz en cualquier momento del ciclo de vida de la planta (por ejemplo, antes o después de la germinación). Por ejemplo, se puede administrar una o más formas aisladas de rizosferas de arroz a una la semilla de
- 10 una planta de arroz antes de sembrar la semilla en suelo y antes de la germinación. Como alternativa, se puede administrar una o más formas aisladas de rizosferas de arroz a la planta, a la semilla de la planta o al suelo que rodea a la planta después que tuvo lugar la germinación.
- 15 Una vez tratadas con una o más formas aisladas de rizosferas de arroz, las semillas se pueden plantar en el suelo y cultivar usando métodos convencionales para generar crecimiento en las plantas.

- De acuerdo con formas de realización de la presente
- 20 invención, se puede administrar una o más formas aisladas de rizosferas de arroz a una planta, a la semilla de una planta o al suelo ya sea solas o en una mezcla con otros materiales. Por ejemplo, se puede administrar una o más formas aisladas de rizosferas de arroz en una composición
- 25 que consiste esencialmente de una o más formas aisladas de rizosferas de arroz en un medio de crecimiento sin ningún aditivo o material adicional. Como alternativa, se puede administrar una o más formas aisladas de rizosferas de arroz en una composición que comprende una o más formas
- 30 aisladas de rizosferas de arroz en un medio de crecimiento, un vehículo, tal como agua, en una solución acuosa o un polvo. El medio de crecimiento, el vehículo, la solución acuosa o el polvo pueden contener aditivos adicionales, tal

000021

como un insecticida o un fungicida. Como alternativa, se puede administrar una o más formas aisladas de rizosferas de arroz separadamente con otros aditivos o materiales que se aplicarán en tiempos diferentes.

- 5 La presente invención provee además vehículos para uso en agricultura que comprenden una o más formas aisladas de rizosferas de arroz, que se pueden aplicar a plantas (por ejemplo, a las raíces), al suelo que rodea a las plantas o a las semillas antes de la siembra, así como recubrimientos
- 10 de semillas que comprenden una o más formas aisladas de rizosferas de arroz, que se pueden aplicar a las semillas de las plantas. La presente invención también provee una semilla de una planta, preferiblemente una semilla de una planta de arroz, que está recubierta con una o más formas
- 15 aisladas de rizosferas de arroz, de modo tal que todo o parte de la semilla tiene un recubrimiento o una película que comprende una o más formas aisladas de rizosferas de arroz. El vehículo agronómico puede comprender una o más formas aisladas de rizosferas de arroz en una cantidad de
- 20 entre aproximadamente 1×10^7 CFU/ml y aproximadamente 1×10^9 CFU/ml, más preferiblemente aproximadamente 1×10^8 CFU/ml. El recubrimiento de semillas puede comprender una o más formas aisladas de rizosferas de arroz en una cantidad de entre aproximadamente 1×10^7 CFU/semilla y aproximadamente
- 25 1×10^9 CFU/semilla, más preferiblemente de aproximadamente 1×10^8 CFU/semilla. El vehículo agronómico y el recubrimiento de semillas pueden, cada uno, consistir esencialmente de una o más formas aisladas de rizosferas de arroz en un medio de crecimiento sin ningún aditivo o
- 30 material adicional. Como alternativa, el vehículo agronómico y el recubrimiento de semillas pueden comprender, cada uno, una o más formas aisladas de rizosferas de arroz en un medio de crecimiento, tal como

000022

agua, una solución acuosa o un polvo. El medio de crecimiento, la solución acuosa o el polvo pueden contener aditivos adicionales, tal como un insecticida o un fungicida.

5 Los depósitos de las formas aisladas de rizosferas de arroz descritas previamente en la Tabla 1 se encuentran disponibles desde antes del 16 de noviembre, 2010, en el *Delaware Biotechnology Institute*, 15 Innovation way, Room # 145, Newark, DE 19711. Se realizará un depósito de una o
10 más de las formas aisladas de rizosferas de arroz descritas previamente en la Tabla 1 en *American Type Culture Collection* (ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, Va. 20110-2209, EE.UU. El acceso a este depósito estará disponible durante el período en que la solicitud esté
15 pendiente ante el Comisionado de Patentes y Marcas y para las personas a las que la Comisión otorga permiso de acceso. El depósito se mantendrá en el Depósito de ATCC, que es un depósito público, por un período de 30 años, o 5 años después de la petición más reciente o mientras se
20 prolongue la vida sustentable de la patente, lo que tome más tiempo, y se reemplazará si se volviera no viable durante dicho período. El depósito estará disponible según los requisitos de las leyes de patente extranjeras en aquellos países en se presentan contrapartes de la presente
25 solicitud, o su progenie.

Además, los depósitos del cultivo de la invención se guardarán y estarán disponibles para el público de acuerdo con las disposiciones del Tratado de Budapest para el Depósito de Microorganismos, es decir, se guardarán con
30 todo el cuidado necesario para mantenerlos en buenas condiciones y no contaminados durante un período de por lo menos cinco años, después de la petición más reciente de actuación de una muestra del depósito y, en cualquier caso,

000023

durante un período de por lo menos treinta (30) años después de la fecha de depósito o durante la vigencia aplicable de cualquier patente que se pueda otorgar y que revele los cultivos.

- 5 Los siguientes ejemplos se proveen para describir la invención con mayor detalle y se ofrecen en un sentido ilustrativo, no limitante, de la invención.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

- 10 Se inocularon plantas de arroz (*Nipponbare*) con aproximadamente 10^8 CFU/ml de una combinación de las formas aisladas de rizosferas de arroz descritas previamente en la Tabla 1. Según se ilustra en la Figura 1 (en donde RBI se refiere a las rizobacterias inoculadas y RBU se refiere a las rizobacterias no inoculadas), las formas aisladas de
15 rizosferas de arroz promovieron el crecimiento del arroz, medido a los 0 días de post-inoculación (dpi), 7 dpi y 15 dpi. La Figura 2 ilustra los valores promedio de biomasa en arroz tratado con una mezcla de las formas aisladas de
20 rizosferas de arroz que se muestran en la Tabla 1 a 80 dpi (es decir, en el momento de la cosecha), en cuyo momento se observó un aumento de aproximadamente un 50% en la biomasa de brotes en comparación con el control.

Ejemplo 2

- 25 Para evaluar si las formas aisladas de rizosferas de arroz colonizan las raíces de arroz, los Solicitantes inocularon plantas de arroz (cultivar *Nipponbare*) con las formas aisladas microbianas de arroz descritas previamente y examinaron las raíces de las plantas de arroz 96 hs post-
30 inoculación por medio de microscopía de barrido con láser confocal. Las observaciones confirmaron que las formas aisladas microbianas de arroz beneficiosas forman una biopelícula sobre la superficie de las raíces. En

000024

particular, los datos sugieren que las formas aisladas microbianas de arroz colonizan eficientemente las raíces de arroz a las 96 hs de post-tratamiento, lo cual indica que las raíces de arroz proporcionan soporte a la colonización de microbios beneficiosos.

Los Solicitantes demostraron con anterioridad que las rizobacterias intervienen en el funcionamiento de las células oclusivas de una planta para restringir la entrada de patógenos foliares. La entrada de un patógeno foliar por los poros estomáticos presentes en las hojas queda restringida debido a la colonización de las raíces por el microbio beneficioso. Para evaluar si el tratamiento de plantas de arroz con formas aisladas microbianas de arroz produce algún cambio en la apertura de los estomas, los Solicitantes analizaron las plantas de arroz tratadas con las formas aisladas microbianas de arroz. Se agregó una mezcla de 10 de las formas aisladas microbianas diferentes que se muestran en la Tabla 1 a las plantas de arroz (*Nipponbare*). Las células oclusivas de los estomas se observaron después de 4 semanas de tratamiento. Los resultados mostraron que el tratamiento de arroz (cultivar *Nipponbare*) con las formas aisladas microbianas de arroz cerraron los estomas en las plantas de arroz tratadas, según se ilustra en la Figura 3.

25 **Ejemplo 3**

Para evaluar si las formas aisladas microbianas de arroz descritas previamente atenúan el crecimiento del brusone del arroz (es decir, *Magnaporthe oryzae* o *Magnaporthe grisea*) los Solicitantes expusieron *M. oryzae* a cultivos de la forma aislada microbiana de arroz. Las placas de compartimento cualitativas y los datos cuantitativos mostraron que las formas aisladas microbianas de arroz atenuaron el crecimiento de *M. oryzae*, según lo muestra el

crecimiento radial reducido de los cultivos fúngicos expuestos a las formas aisladas microbianas de arroz. Una comparación con el control (TY) demuestra la extensión del crecimiento del patógeno sin tratamiento. Estos resultados se resumen en la Tabla 3 y en la Figura 4. *Pseudomonas* ("EA105") y *Pantoea agglomerans* ("EA106") redujeron el crecimiento radial de *Magnaporthe oryzae* en aproximadamente un 77% y aproximadamente un 50%, respectivamente. Por ello, los Solicitantes observaron resistencia sistémica inducida mediada por las formas aisladas microbianas de arroz a *Magnaporthe oryzae*.

Tabla 3: Efecto de las formas aisladas microbianas de arroz sobre el crecimiento de *Magnaporthe oryzae* in vitro.

	Diámetro promedio (cm)	% de control
Control TY	3.175	100
EA101	3.342	105.25
EA102	3.266	102.86
EA103	3.102	97.71
EA104	2.81	88.51
EA105	0.746	23.49
EA106	1.578	49.71
EA107	2.972	93.61
EA108	3.084	97.15
Control LB	3.098	100
EA201	3.068	99.03
EA202	2.87	92.65
EA303	2.968	95.79

Ejemplo 4

En un ensayo de patogenicidad en plantas completas, se inocularon plantas de arroz Maratelli de 18 días con formas aisladas microbianas de arroz (2 ml de 0.5 DO por planta) por medio de embebimiento radicular. Las formas aisladas de

arroz se cultivaron durante la noche en los medios LB y TY hasta una densidad óptica de 0.5 a 600 nm. A las 48 horas de post-tratamiento, las plantas fueron rociadas con 1×10^5 esporas/ml de *M. oryzae*. Los datos morfométricos tomados a las 2 semanas de post-infección se ilustran en la Tabla 4 y en la Figura 5. Por ejemplo, el número promedio de lesiones observado por planta se redujo cuando las plantas eran inoculadas con EA103 (reducido en aproximadamente 60%), EA104 (reducido en aproximadamente 36%), EA105 (reducido en aproximadamente 30%), EA106 (reducido en aproximadamente 68%) y EA201 (reducido en aproximadamente 40%), en comparación con el control (es decir, sin tratamiento con formas aisladas de rizosferas de arroz).

Tabla 4

	N° hojas infectadas	N° promedio de lesiones por planta
Control	7/22	21.4
EA101	7/18	18.55
EA102	8/19	37.25
EA103	6/23	8.6
EA104	5/19	13.6
EA105	6/23	15
EA106	6/18	6.8
EA107	4/13	22.75
EA108	5/22	29
EA201	6/23	12.8

Ejemplo 5

Para evaluar el impacto de las cepas de proteobacterias aisladas y cultivadas sobre las plantas de arroz, se inocularon las raíces con un inóculo mixto de las diez especies que se muestran en la Tabla 1. El crecimiento de las plantas y el contenido total de clorofila y

000027

carotenoides de plantas de arroz cultivadas bajo condiciones experimentales hidropónicas controladas mejoraron con la inoculación de rizobacterias. Estos datos indican que la microbiota facilita un aumento en la biomasa vegetal.

Los Solicitantes examinaron las raíces de arroz (cultivar *Nipponbare*) a las 96 hs de post-inoculación por medio de inoculaciones de rizobacterias mixtas. Las raíces se visualizaron por microscopía de barrido con láser confocal y las observaciones mostraron que las raíces de arroz ofrecían soporte a la colonización de microbios beneficiosos.

Para evaluar si el co-cultivo de arroz con microbios beneficiosos afectaba el contenido de hierro en las plantas, los Solicitantes evaluaron el contenido de Fe por ICP-MS. Se agregaron suplementos de bacterias ($\sim 10^8$ células/planta) en plantas de arroz cultivadas hidropónicamente. El contenido total de Fe y P se evaluó a los 60 días de post-tratamiento en granos de arroz. Los datos mostraron que las plantas de arroz tratadas con mezclas de las diez formas aisladas de rizosferas de arroz de la Tabla 1 aumentaron el contenido global de Fe en los granos de arroz, pero no el contenido global de fósforo (P) en los , según se ilustra en la Figura 6. Estos datos sugieren que los suplementos microbianos a las plantas de arroz pueden aumentar el contenido de Fe, que puede ser crítico para aumentar la calidad nutricional global del arroz.

Ejemplo 6

Se ha demostrado en numerosos estudios que se forman placas de hierro sobre las raíces de plantas acuáticas, incluyendo el arroz, y esto también es afectado por las raíces de las plantas. Se cree que el (hidr)óxido de hierro precipita

000028

por difusión de oxígeno radial del aerénquima y por oxidación de hierro ferroso. Los (hidr)óxidos de hierro son los principales adsorbentes de metal(oídes) tóxicos, tal como el arsenato (As[V]), y por consiguiente las placas

5 formadoras de hierro serían importantes en el secuestro de As de modo que se encuentre menos disponible para su captación por las raíces y otras partes de las plantas. Además, dado que es probable que el arsenito (As[III]) se pueda oxidar en arsenato (As[V]) en las estrechas zonas

10 aeróbicas de la rizosfera debido a la liberación de oxígeno del aerénquima, se propuso como hipótesis que las placas cumplan un rol importante en limitar el secuestro de As. Hay estudios que han sugerido que la función de las placas sería como secuestrantes a granel de arsenato (As[V]) de la

15 rizosfera, aún bajo condiciones agronómicas normales. Los datos que se muestran en la Figura 7 ilustran la tolerancia en plantas de arroz contra As (V) después del tratamiento con EA106. Se administraron suplementos de hierro a las plantas de arroz y luego fueron co-inoculadas

20 con ambas especies de As (As(V) y As(III)) y EA106. Los datos que se muestran en la Figura 7 indican que el suplemento con EA106 conduce a tolerancia a As(V) en comparación con As(III) en las plantas de arroz. Estos datos son críticos ya que el As(V) es la especie

25 predominante que se acumula en las placas de arroz y que puede ser perjudicial para la captación global de As en plantas de arroz. Los datos de la Figura 8 ilustran tolerancia de EA106 contra las especies de As, (As(V) y As(III)). Los datos muestran que EA106 es más tolerante

30 para el arsenato en comparación con el arsenito. Aunque la presente invención ha sido descrita con referencia a formas de realización específicas, se comprenderá que la invención, tal como se la reivindica, no

se halla limitada indebidamente a dichas formas de
realización específicas. Además, diversas modificaciones y
variaciones de las composiciones y los métodos que se
describen en la invención serán evidentes para los
5 especialistas en el arte y se consideran dentro del alcance
de las reivindicaciones adjuntas.

Se hace constar que con relación a esta fecha, el mejor
método conocido por la solicitante para llevar a la
práctica la citada invención, es el que resulta claro de la
10 presente descripción de la invención.

000030

REIVINDICACIONES:

Habiéndose descrito la invención como antecede, se reclama como propiedad lo contenido en las siguientes reivindicaciones:

- 5 1. Un método para inhibir una infección fúngica en una planta por un patógeno de plantas que comprende administrar una o más formas aisladas de rizosferas de arroz a la planta, a la semilla de la planta o al suelo que rodea a la planta, en una cantidad eficaz para inhibir la infección
10 por el patógeno de plantas en comparación con una planta no tratada.
2. El método de la reivindicación 1, en donde la planta es una planta de arroz y el patógeno fúngico es el brusone del arroz.
- 15 3. El método de la reivindicación 2, que comprende administrar dichas una o más formas aisladas de rizosferas de arroz a las raíces de la planta de arroz.
4. El método de la reivindicación 2, que comprende administrar dichas una o más formas aisladas de rizosferas
20 de arroz a las semillas de la planta de arroz antes de la siembra.
5. El método de la reivindicación 3, que comprende administrar dichas una o más formas aisladas de rizosferas de arroz a las raíces de la planta de arroz en una cantidad
25 de entre aproximadamente 1×10^7 y aproximadamente 1×10^9 CFU/planta.
6. El método de la reivindicación 2, en donde los síntomas del brusone del arroz se reducen entre aproximadamente 5% y aproximadamente 100% en comparación
30 con una planta no tratada.
7. Un método para producir una mayor biomasa en una planta que comprende administrar una o más formas aisladas de rizosferas de arroz a la planta, a la semilla de la

000031

planta o al suelo que rodea a la planta, en una cantidad eficaz como para producir una mayor biomasa en la planta en comparación con una planta no tratada.

8. El método de la reivindicación 7, en donde dicha
5 planta es una planta monocotiledónea.

9. El método de la reivindicación 8, que comprende administrar dichas una o más formas aisladas de rizosferas de arroz a las raíces de la planta de arroz.

10. El método de la reivindicación 8, que comprende
10 administrar dichas una o más formas aisladas de rizosferas de arroz a las semillas de la planta de arroz antes de la siembra.

11. El método de la reivindicación 9, que comprende administrar dichas una o más formas aisladas de rizosferas
15 de arroz a las raíces de la planta de arroz en una cantidad de entre aproximadamente 1×10^7 y aproximadamente 1×10^9 CFU/planta.

12. Un método para producir una menor concentración de arsénico en una planta que comprende administrar una o más
20 formas aisladas de rizosferas de arroz a la planta, a la semilla de la planta o al suelo que rodea a la planta, en una cantidad eficaz para producir una menor concentración de arsénico en la planta en comparación con una planta no tratada.

13. El método de la reivindicación 12, en donde dicha
25 planta es una planta monocotiledónea.

14. El método de la reivindicación 13, que comprende administrar dichas una o más formas aisladas de rizosferas de arroz a las raíces de la planta de arroz.

15. El método de la reivindicación 13, que comprende
30 administrar dichas una o más formas aisladas de rizosferas de arroz a las semillas de la planta de arroz antes de la siembra.

000032

16. El método de la reivindicación 14, que comprende administrar dichas una o más formas aisladas de rizosferas de arroz a las raíces de la planta de arroz en una cantidad de entre aproximadamente 1×10^7 y aproximadamente 1×10^9 CFU/planta.

17. El método de la reivindicación 13, que comprende administrar dichas una o más formas aisladas de rizosferas de arroz en una cantidad eficaz para producir una menor concentración de arsénico en la planta de entre aproximadamente 5% y aproximadamente 100% en comparación con una planta no tratada.

18. Un método para producir una menor concentración de arsénico en una planta que comprende administrar EA106 a una planta, a la semilla de la planta o al suelo que rodea a la planta, en una cantidad eficaz para producir una menor concentración de arsénico en la planta en comparación con una planta no tratada.

19. Un vehículo agronómico que comprende una o más formas aisladas de rizosferas de arroz.

20. Un vehículo agronómico que comprende EA106.

000033

**COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA MEJORAR EL CRECIMIENTO Y
RESTRINGIR LA CAPTACIÓN DE ARSÉNICO EN EL ARROZ**

RESUMEN

Métodos para administrar una o más formas aisladas de
5 rizosferas de arroz a una planta, en particular a una
planta de arroz, a la semilla de la planta o al suelo que
rodea a la planta, en una cantidad eficaz para inhibir una
infección por un patógeno de plantas, en particular del
brusone del arroz, para aumentar la biomasa de la planta
10 y/o para disminuir la captación de arsénico por la planta.

000034

Figura 1

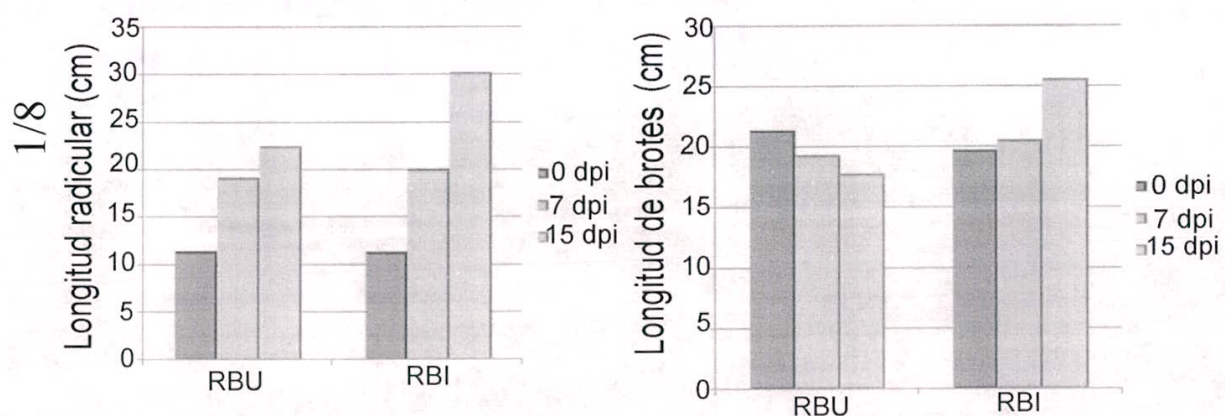


Figura 2

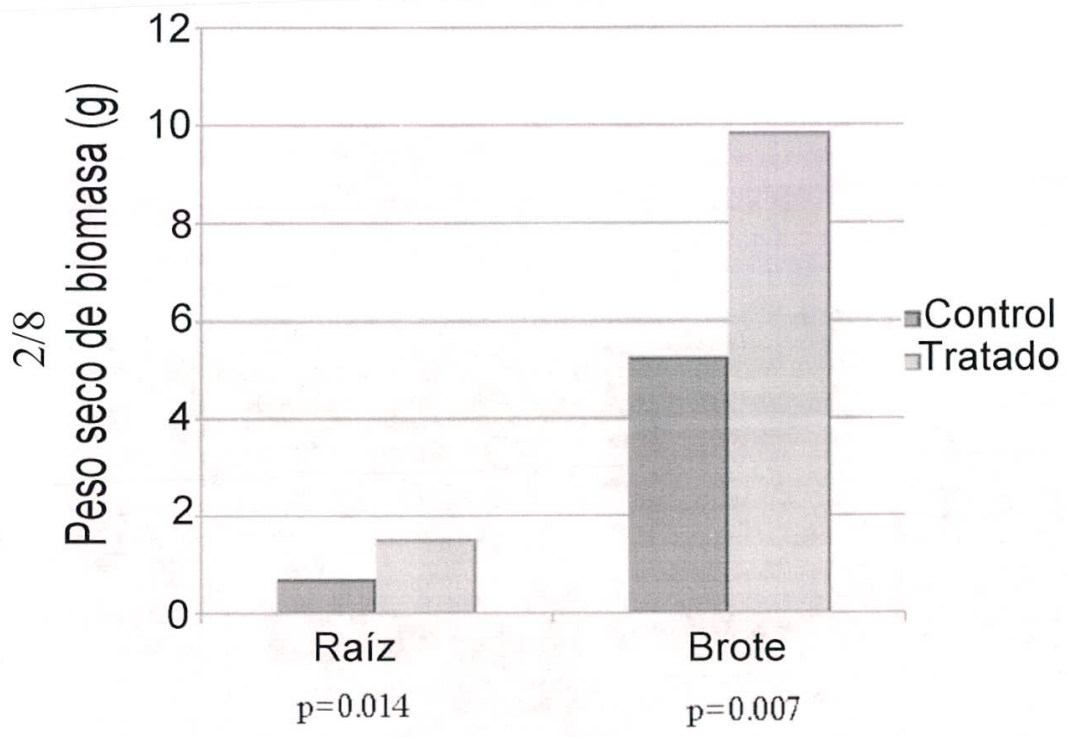


Figura 3

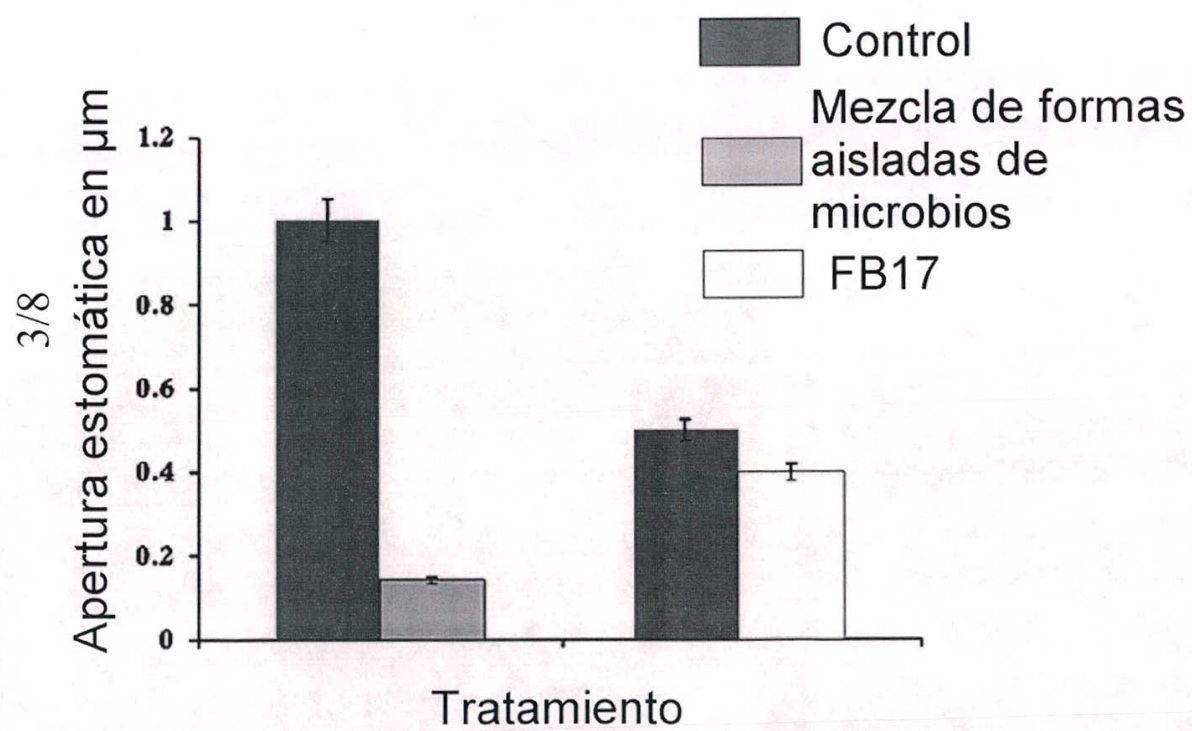


Figura 4

Efecto de volátiles bacterianos sobre el crecimiento de *M. oryzae*

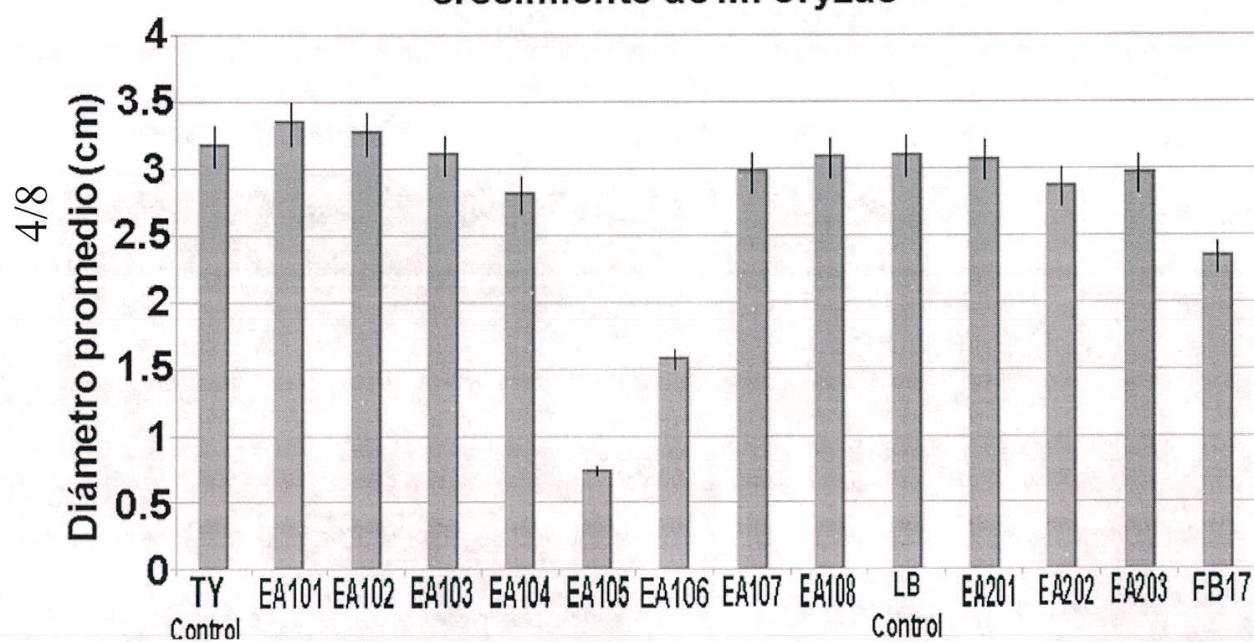
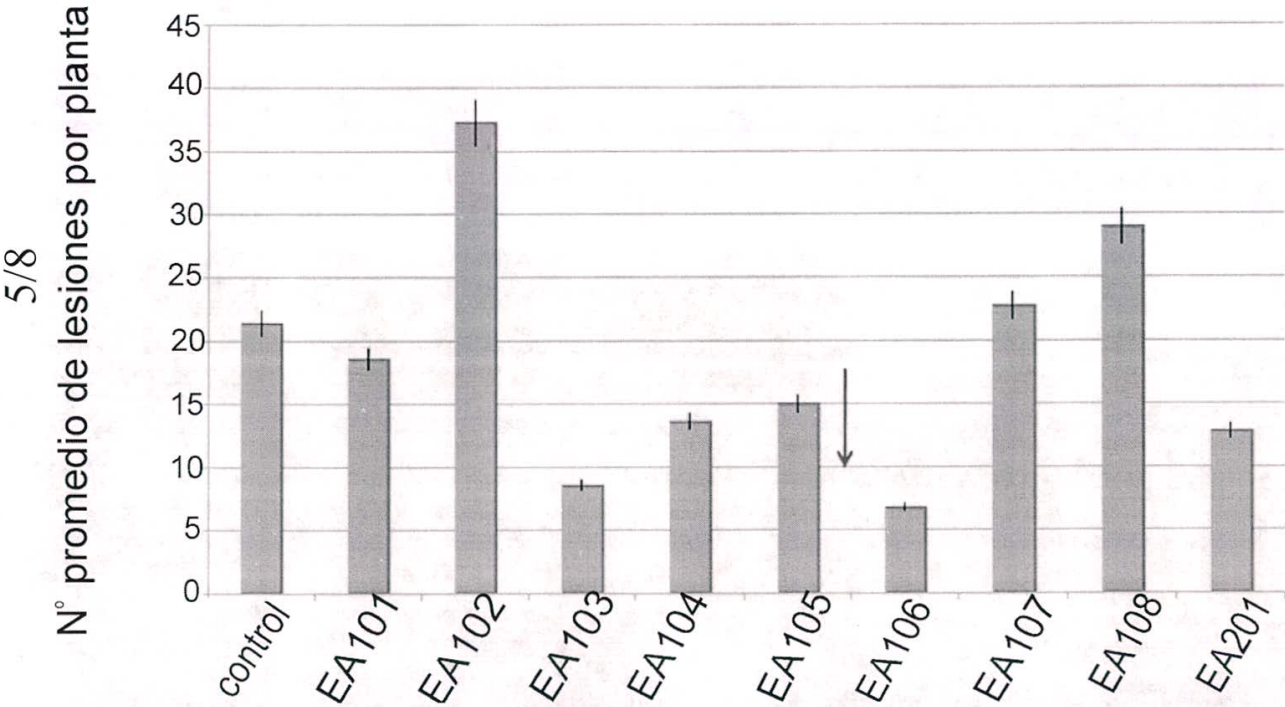


Figura 5

Efecto de formas aisladas de arroz sobre la formación de lesiones foliares por *M. oryzae*



000039

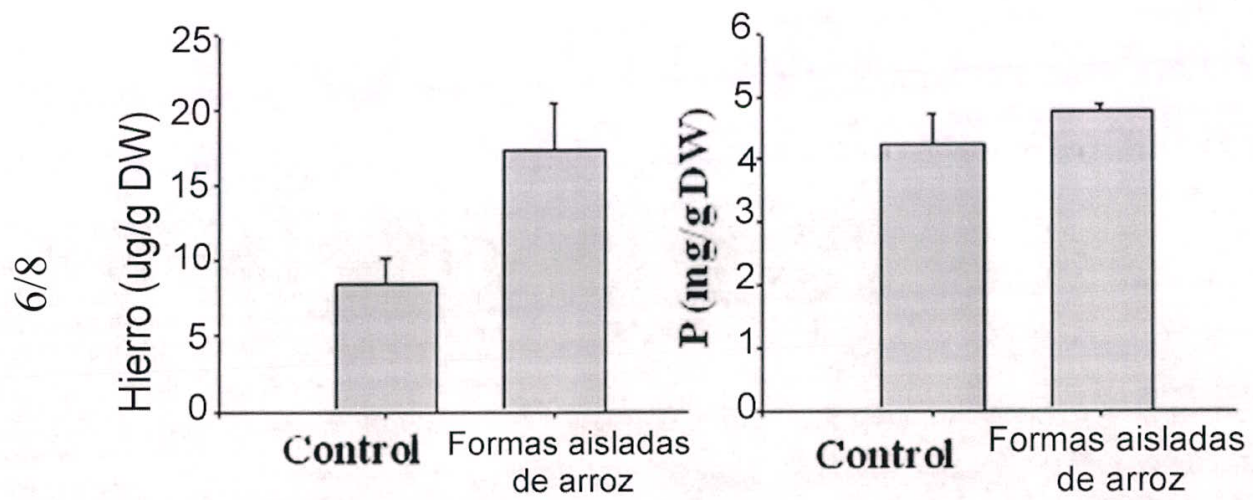


Figura 6

Formación de placas de hierro sobre raíces de arroz
tratadas con rizobacterias y arsénico

7/8

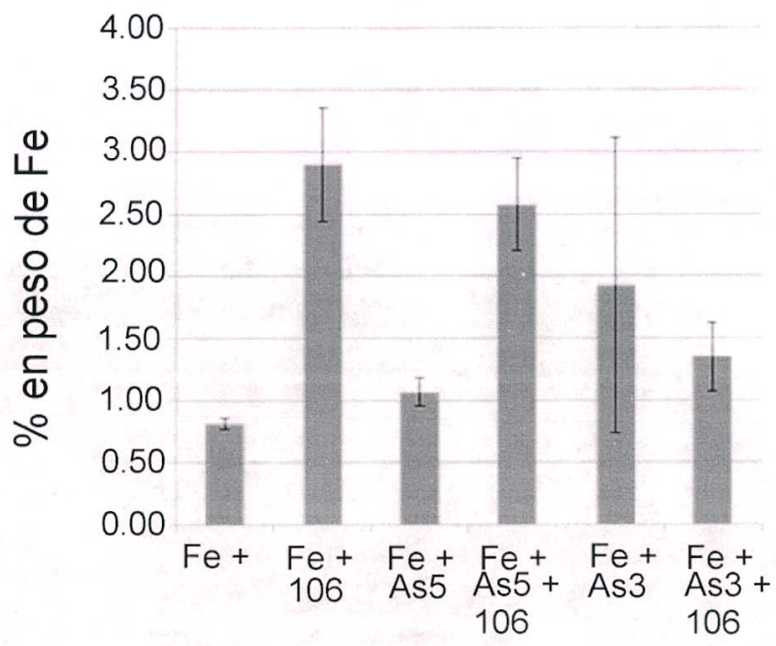


Figura 7

Tolerancia a arsénico en formas aisladas de raíz de arroz

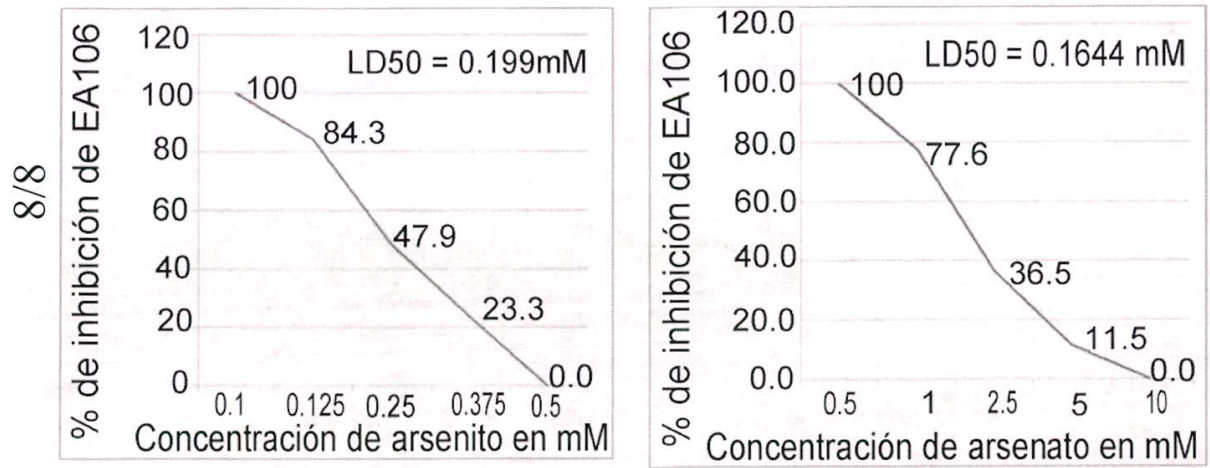


Figura 8

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)
(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
24 May 2012 (24.05.2012)



(10) International Publication Number
WO 2012/067668 A1

- (51) International Patent Classification:
A01N 63/02 (2006.01) A01P 1/00 (2006.01)
A01N 63/04 (2006.01) A01P 3/00 (2006.01)
A01N 65/44 (2009.01)
- (21) International Application Number: PCT/US2011/026693
- (22) International Filing Date: 1 March 2011 (01.03.2011)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
61/414,258 16 November 2010 (16.11.2010) US
61/414,108 16 November 2010 (16.11.2010) US
61/416,043 22 November 2010 (22.11.2010) US
61/420,372 7 December 2010 (07.12.2010) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): UNIVERSITY OF DELAWARE [US/US]; 1 Innovation Way, Delaware Technology Park, Building 1, Suite 500, Newark, DE 19711 (US).
- (72) Inventors; and
- (75) Inventors/Applicants (for US only): BAIS, Harsh [IN/US]; 46 Palo Lane, Newark, DE 19702 (US). SHER-RIER, Darla, Janine [US/US]; 803 Walnut Hill Court, Hockessin, DE 19707 (US). ALFF, Emily [US/US]; 704 Church Street, Royersford, PA 19468 (US).
- (74) Agents: WEED, Stephen, J. et al.; Ratnerprestia, P.O. Box 980, Valley Forge, PA 19482 (US).
- (81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Declarations under Rule 4.17:
- as to applicant's entitlement to apply for and be granted a patent (Rule 4.17(ii))
 - as to the applicant's entitlement to claim the priority of the earlier application (Rule 4.17(iii))
- Published:
- with international search report (Art. 21(3))

(54) Title: COMPOSITIONS AND METHODS FOR IMPROVING RICE GROWTH AND RESTRICTING ARSENIC UPTAKE

Arsenic tolerance in rice root isolates

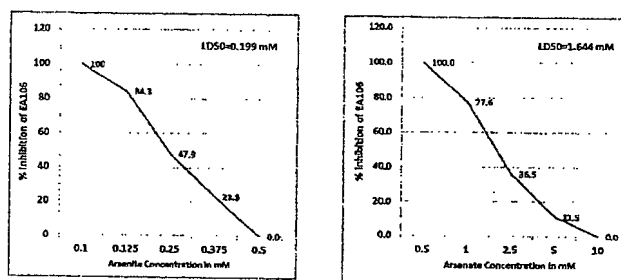


Figure 8

(57) Abstract: Methods according to the invention administering one or more rice rhizosphere isolates to a plant, particularly a rice plant, to the seed of the plant, or to soil surrounding the plant in an amount effective to inhibit infection by a plant pathogen, particularly rice blast, to increase the biomass of the plant, and/or to decrease arsenic uptake by the plant.

WO 2012/067668 A1

000043

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -



RECIBO DE CAJA

No. 13 - 0053337

Bogotá D.C., Junio 04 de 2013 - 09:57:05

RECIBIDO DE : CLARKE MODET

NI 83.008.643

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
RECIBO DE CA	999999999	40921	30/04/2013		530.000.00
RECIBO DE CA	999999999	40922	30/04/2013		530.000.00
RECIBO DE CA	999999999	40923	30/04/2013		530.000.00
RECIBO DE CA	999999999	40924	30/04/2013		530.000.00
RECIBO DE CA	999999999	40925	30/04/2013		530.000.00
RECIBO DE CA	999999999	40926	30/04/2013		530.000.00
RECIBO DE CA	999999999	40927	30/04/2013		530.000.00
RECIBO DE CA	999999999	40941	30/04/2013		125.000.00
RECIBO DE CA	999999999	40942	30/04/2013		125.000.00
RECIBO DE CA	999999999	51550	28/05/2013		505.000.00
RECIBO DE CA	999999999	51551	28/05/2013		505.000.00
RECIBO DE CA	999999999	51552	28/05/2013		505.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	500.000.00	500.000.00
			\$500.000.00

SON: **QUINIENTOS MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-138538- -00000-0000

Fecha: 2013-06-07 15:19:31 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 45

044

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 -00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mai: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Junio 4 de 2013 - 09:57:08

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -



RECIBO DE CAJA

No. 13 - 0051175

Bogotá D.C., Mayo 28 de 2013 - 09:53:06

RECIBIDO DE : CLARKE MODET

NI 830.008.643

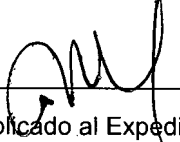
*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
EFFECTIVO	999999999	40917	30/04/2013		530.000.00
EFFECTIVO	999999999	40918	30/04/2013		530.000.00
EFFECTIVO	999999999	40919	30/04/2013		530.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL	2232 INSCRIPCION ACUERDOS DE COEXISTENCIA	300.000.00	300.000.00
				\$300.000.00

SON: **TRESCIENTOS MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: 

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-138538- -00000-0000

Fecha: 2013-06-07 15:19:31 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 45

000045

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mai: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Mayo 28 de 2013 - 09:53:07

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO DE UTILIDAD ☐

Art 33 Decisión 486/00

☐	Indicación que se solicita una patente.
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Descripción de la invención
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)
Completa ☐	Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☒ MODELO DE UTILIDAD PCT ☐ Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

☒	Indicación que se solicita una PCT
☒	Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☒	Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
Completa ☒	Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita Diseño industrial
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita un esquema de trazado
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica de un esquema de trazado
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

PI02-F08 (2009-11-18)



No. 13-138538- -00000-0000

Fecha: 2013-06-07 15:19:31 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 45