

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 938 215**

51 Int. Cl.:

A01N 63/30 (2010.01)

A01N 25/00 (2006.01)

A01P 5/00 (2006.01)

A01P 21/00 (2006.01)

C12N 1/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.09.2018** **E 18382653 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.11.2022** **EP 3622822**

54 Título: **Cepa *Dominikia tenuihyphara*, composiciones que la comprenden y sus usos**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.04.2023

73 Titular/es:

SYMBORG, S.L. (100.0%)
Campus de Espinardo 7. Edificio CEEIM.
30100 Murcia, ES

72 Inventor/es:

JUAREZ MOLINA, JESUS;
FERNANDEZ, FELIX;
BERNABE GARCIA, ANTONIO JOSE;
VILA MARTINEZ, ANA y
TORRES VERA, ROCIO

74 Agente/Representante:

PAZ ESPUCHE, Alberto

ES 2 938 215 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Cepa *Dominikia tenuihyphara*, composiciones que la comprenden y sus usos

Campo de la invención

- 5 La presente invención está relacionada con el campo agronómico. Específicamente, está relacionada con la cepa *Dominikia tenuihyphara*, depositada con el número de entrada MUCL 57072, con composiciones que la comprenden y con usos de dichas composiciones, tales como el uso como bio-estimulante y bio-nematicida. Se ha descubierto que las composiciones que comprenden la cepa *Dominikia tenuihyphara* son particularmente útiles en el cultivo de cereales.

Técnica antecedente

- 10 En la actualidad, entre los glomeromicetos se describen aproximadamente 300 especies en 30 géneros. Sin embargo, los estudios de biodiversidad a base de ácidos nucleicos (ADN, ARN) apuntan a una diversidad mucho mayor en los glomeromicetos y recientemente se han descrito varios géneros y especies nuevos. La mayoría de los glomeromicetos son hongos micorrícicos arbusculares (HMA) que son simbioses mutualistas de aproximadamente un 80% de todas las plantas terrestres vasculares. La absorción de nutrientes de las plantas que son colonizadas por HMA se produce
15 directamente a través de la epidermis de las raíces y de los pelos de las raíces, pero también a través de la superficie de contacto hongo-raíz, que tiene la forma característica de arbusculos o espirales de hifas intrarradiculares. Además de su papel en la potenciación en la absorción de nutrientes, los HMA desempeñan papeles importantes en la agregación del suelo y en la protección de las plantas contra el estrés por sequía y contra los patógenos de plantas nacidos en el suelo. Debido a esta naturaleza tan beneficiosa, se conocen en la técnica varias composiciones micorrícicas, y han sido desarrolladas para proporcionar efectos beneficiosos a los cultivos a los que se proporcionan.

Los documentos WO2015/000612 y WO2015/000613 dan a conocer composiciones que comprenden la cepa *Glomus iranicum* var. *tenuihypharum* var. nov., y sus usos.

- 25 En particular, el documento WO2015/000612 da a conocer una composición que comprende la cepa *Glomus iranicum* var. *tenuihypharum* var. nov. y arcillas de esmectita en una proporción de 2:1. Se divulga que la composición del documento WO2015/000612 proporciona un impacto positivo en la producción de cultivos; es decir, que puede ser usada como bio-estimulante en cultivos de lechuga.

De modo similar, el documento WO2015/000613 da a conocer una composición que comprende la cepa *Glomus iranicum* var. *tenuihypharum* var. nov. y arcillas de esmectita, iones metálicos y quitina en una proporción de 2:1. El documento WO2015/000613 divulga que dicha composición actúa como bio-nematicida en cultivos de tomate.

- 30 F. Fernández Martín y otros dan a conocer la aplicación de cepas *Glomus iranicum* var. *tenuihypharum* var. nova a plantas para mejorar la producción en lechugas y uvas (Journal of Agricultural Science and Technology B, 2017, 7(4), 221-247), así como en tomates (Journal of Horticultural Science and Biotechnology, 2014, 89(6), 679-685). E. Nicolás y otros dan a conocer los efectos del producto comercial MycoGrowth, a base de *Glomus iranicum* var. *tenuihypharum*, en las uvas de mesa (Agricultura, octubre de 2013, 674-678).

- 35 Sin embargo, las composiciones dadas a conocer en la técnica anterior no proporcionan un impacto positivo aceptable en los cultivos de cereales, ni en términos del efecto bio-estimulante ni en el bio-nematicida.

Sumario de la invención

- 40 Por tanto, un objetivo de la presente invención es proporcionar una cepa fúngica que sea susceptible de ser incluido en composiciones, concretamente composiciones adecuadas para proporcionar un impacto positivo en los cultivos, en particular en los cultivos de cereales.

Otro objetivo de la invención es proporcionar una composición que sea eficaz como bio-estimulante en los cultivos de cereales.

Otro objetivo adicional de la presente invención es proporcionar una composición que sea eficaz como bio-nematicida en los cultivos de cereales.

- 45 Un objetivo adicional de la presente invención es proporcionar un proceso para la obtención de las composiciones.

Descripción detallada

Por tanto, un objeto de la presente invención es una cepa de glomeromicetos, concretamente la cepa *Dominikia tenuihyphara*, depositada con el número de entrada MUCL 57072.

- 50 La cepa de la invención se aisló de un suelo de tipo salino sódico muy compactado muy hidromorfo (Solonetz Gley) con mucho depósito salino en la superficie, en la localidad de Fortuna, Murcia (España).

La *Dominikia tenuihyphara* de la invención fue depositada el 21/03/2018 en la Autoridad Internacional de Depósito Belgian Coordinated Collections of Micro-Organisms (BCCM), sita en la Universidad Católica de Lovaina, Mycothèque de l'Université catholique de Louvain (MUCL), Croix du Sud 2, Box L7.05.06, 1348 Louvain-la-Neuve, Bélgica, por Symborg S.L., con dirección Campus de Espinardo, 7, edificio CEEIM, 30100 Murcia, España.

- 5 La cepa *Dominikia tenuihyphara* de la invención fue identificada por el depositante con la referencia *Dominikia tenuihyphara* SMB01, y recibió el número de depósito MUCL 57072 de la autoridad internacional de depósito.

Se desconocen los esporocarpos de la cepa de la invención. En la cepa de la invención las esporas se presentan en racimos sueltos en el suelo, y pueden ser terminales o intercalares; también pueden formarse esporas dentro de las raíces. Las esporas son entre hialinas y ocráceas claras, con una estructura entre subglobosa y globosa (rara vez irregular), relativamente pequeñas; concretamente entre 24,0 y 42 µm de diámetro, con un valor promedio de $30,7 \pm 3,7$ µm en diámetro. Las esporas presentan una pared esporal de tres capas (de 1-4 µm de grosor). En particular, pueden reconocerse una capa exterior, una capa intermedia y una capa interior.

La capa exterior de la pared de la espora es sustancialmente mucilaginoso y evanescente, dando así a las esporas jóvenes un aspecto áspero, mientras que las esporas más viejas presentan un aspecto un tanto enmarañado. La capa exterior de la pared de la espora presenta una reacción dextrinoide cuando es tincionada con el reactivo de Melzer, dando a las esporas jóvenes un color rojo parduzco. La capa intermedia es la pared de la espora es sustancialmente permanente y tiene 0,5 - 2,0 µm de grosor.

La capa interior de la pared de la espora es sustancialmente laminar, con un grosor de 0,5-1,5 µm. El contenido de las esporas tiene un aspecto pálido y goteado. Las hifas que contienen las esporas tienen un color entre hialino y ocráceo pálido, y son rectas u onduladas, de 2,5 - 4,5 µm en diámetro (con un valor promedio de 3,0 µm). Las hifas tienen forma entre cilíndrica y ligeramente en embudo que se fusiona con las capas de poros abiertos de la pared de la espora, al menos en las esporas maduras. La estructura de germinación comprende un tubo germinativo crecido y se desarrolla hacia atrás a través de la unión de las hifas con las esporas. Forma micorizas arbusculares vesiculares.

El micelio extrarradicular forma una extensa red.

El Solicitante generó un análisis filogenético de 134 secuencias de ADNr 18S, incluidas secuencias medioambientales y referenciadas. De la mayoría de especies de *Dominikia* no hay disponible ninguna secuencia 18S o las que hay son relativamente cortas y parciales. En este análisis filogenético pueden incluirse secuencias de *Dominikia indica* y *D. iranica*. Las secuencias de estas dos especies eran más cortas que las del resto del conjunto de datos. El recorte del conjunto de datos a la longitud de estas secuencias dio lugar a árboles resueltos de forma bastante incompleta. Usando las secuencias de longitud completa pudieron generarse árboles con ramas que representaban los niveles taxonómicos más altos. Sin embargo, con este conjunto de datos no pudo generarse un clado monofilético robusto que constante de secuencias de *Dominikia spp.* La *Dominikia tenuihyphara* forma un clado bien mantenido junto con *Dominikia iranica* y secuencias glomerales medioambientales anónimas de diferentes plantas anfitrionas y diferentes ubicaciones.

El análisis filogenético de un conjunto de datos SSU-ITS1 que incluye secuencias de la mayoría de las especies de *Dominikia* descritas indica que *Dominikia tenuihyphara* se ramifica junto a *D. aurea*. Para el género *Dominikia* son características las esporas pequeñas (de hasta 65-70 µm de diámetro), habitualmente agregadas en racimos entre sueltos y compactos. La pared de la espora de los miembros del género *Dominikia* consta de dos o tres capas. La capa exterior, que forma la superficie de la espora, es mucilaginoso, de corta vida y se tiñe en el reactivo de Melzer o es unitaria (no dividida en subcapas), permanente y no reacciona en el reactivo de Melzer. Las hifas que contienen las esporas tienen forma entre cilíndrica y en embudo con un poro que puede estar abierto u ocluido por un tabique. Se designó como especie tipo a la *Dominikia minuta* (basidiónimo: *Glomus minutum*). La cepa de la invención, es decir, *Dominikia tenuihyphara*, tiene esporas hialinas de sustancialmente el mismo tamaño que las de *Dominikia minuta*, pero, a diferencia de *Dominikia tenuihyphara*, el poro de *G. minutum* (o sea, *Dominikia minuta*) está ocluido por un tabique. La *D. tenuihyphara* también difiere de la *Dominikia minuta* por su pared esporal de tres capas, a diferencia de la pared esporal de dos capas en la *D. minuta*, y debido a la presencia de la reacción dextrinoide, que está ausente en la *Dominikia minuta*. La *Dominikia tenuihyphara* también difiere de las otras especies y cepas descritas de *Dominikia*. La capa exterior y la capa interior de las esporas de la *Dominikia achra* se tiñen de rojo intenso en el reactivo de Melzer, mientras que en la *D. tenuihyphara* solo la capa exterior presenta una reacción dextrinoide. La *Dominikia indica* difiere de la *D. tenuihyphara* por formar esporas hialinas pequeñas en los agregados subterráneos. La pared de la espora de la *D. indica* consta de dos capas hialinas: una capa exterior mucilaginoso delgada y de corta vida que se tiñe en un color entre rosáceo y rosado en el reactivo de Melzer, y una capa interior laminada, lisa, permanente más gruesa, a diferencia de las tres capas en la *D. tenuihyphara*.

En función de la filogenia 18S-ITS1, la *Dominikia aurea* es el pariente más cercano de la *D. tenuihyphara* de la invención. Las dos especies difieren en muchas características morfológicas (véase la Tabla 1), siendo la diferencia más evidente las esporas fundamentalmente ovoides de la *Dominikia aurea*, que se agregan en esporocarpos irregulares.

Tabla 1		
	<i>Dominikia aurea</i> (Oehl y otros 2003)	<i>Dominikia tenuihyphara</i>
agregación de esporas	esporocarpos irregulares sin peridio	racimos sueltos
esporas intrarradiculares	no descritas	presentes
esporas intercalares	no descritas	presentes
color	entre anaranjado claro y anaranjado	ocráceo
forma	ovoide, raramente globosa	globosa a subglobosa
tamaño	esporas ovoides: (36-)55 - 65 × (30)45-52 µm esporas globosas: (27-) 40-60 µm	(24,0) 30,7 ± 3,7 (42) µm
pared de la spora	de dos capas	de tres capas
capa más exterior	evanescente, hialina de hasta 1,5 µm, deteriorada en las esporas maduras, dextrinoide	mucilaginoso, áspero, hialino (0,4-) 1,0 (1,5) µm, deteriorada en las esporas maduras, dextrinoide
capa intermedia		permanente, ligeramente áspero de 0,5 - 2,0 µm de grosor
capa más interior	laminada, anaranjada clara, 1,5-3 (-4) µm	laminada, lisa (0,5-1,5 µm)
hifas subtendidas	entre anaranjadas claras y anaranjadas, rectas o curvadas, cilíndricas o en forma ligeramente de embudo; 6 -10 µm	entre hialinas y ocráceas pálidas, rectas u onduladas 2,5-5 µm
germinación	desconocida	a través de la hifa subtendida

Se pudieron encontrar muchas secuencias muy similares a las de las secuencias de la *D. tenuihyphara* de la invención cuando se contrastaron con la genoteca (valor e 0,00, identidad 99%). Estas secuencias se producen en una amplia gama de diferentes anfitriones (por ejemplo, plantas hepáticas, monocotiledóneas) de diferentes países y continentes, lo que indica una distribución mundial. Estos hallazgos indican que la *D. tenuihyphara* está ampliamente distribuida.

- 5 Como se ha mencionado anteriormente, se descubrió que es particularmente útil incluir a la *Dominikia tenuihyphara* en composiciones, en particular las que han de ser proporcionadas a los cultivos de cereales.

Otro objeto de la invención es una composición que comprende *Dominikia tenuihyphara*, depositada el 21/03/2018, como se ha mencionado, con el número de entrada MUCL 57072.

- 10 Sin pretender propugnar una explicación específica, se ha observado con sorpresa que la *Dominikia tenuihyphara*, depositada con el número de entrada MUCL 57072, y una composición que la comprende son particularmente eficaces para proporcionar efectos beneficiosos a las cosechas, en particular a las cosechas de cereales.

- 15 En particular, se ha observado que, aportando una composición que comprende *Dominikia tenuihyphara*, depositada con el número de entrada MUCL 57072, a una cosecha —por ejemplo, a una cosecha de cereales (por ejemplo, una cosecha de maíz, una cosecha de trigo, una cosecha de cebada o una cosecha de arroz)— puede obtenerse un incremento en la absorción de los nutrientes y una mejora en la producción de la cosecha de los cereales con respecto a las cosechas a las que no se proporcionó *Dominikia tenuihyphara*.

La concentración de la *Dominikia tenuihyphara*, depositada con el número de entrada MUCL 57072, en la composición está entre el 4,0% y el 1,0% en peso, más preferiblemente entre el 3,0% y el 2,0% en peso, aún más preferiblemente entre el 2,5% y el 2,3% en peso.

- 20 Según algunas realizaciones, la composición de la invención es una composición líquida, sólida o en forma de gel.

Preferiblemente, la composición de la invención es una composición sólida.

Según algunas realizaciones, la composición de la invención puede estar en forma de polvo, concentrado emulsionable, gránulos o microgránulos.

- 25 La composición de la invención es una composición sólida, y la concentración de los propágulos de *Dominikia tenuihyphara*, depositada con el número de entrada MUCL 57072, en la composición se mide según el procedimiento del número más probable, "Most Probable Number Method" (Porter, Aust. J. Soil Res., 1979, 17, 515-19) entre 180 y 120 propágulos por gramo de composición, preferiblemente entre 150 y 120 propágulos por gramo de composición, más preferiblemente entre 125 y 120 propágulos por gramo de composición.

La concentración de los propágulos se refiere a la concentración de los propágulos en el producto final.

- 30 Según una realización preferida, la composición de la invención está en forma de microgránulos.

Según algunas realizaciones, dichos microgránulos tienen un tamaño que oscila entre 500 µm y 2000 µm, preferiblemente entre 800 µm y 1500 µm, más preferiblemente entre 900 µm y 1200 µm. Ventajosamente, la

concentración de la *Dominikia tenuihyphara*, depositada con el número de entrada MUCL 57072, en la composición de la invención, así como la forma de presentación de la composición —por ejemplo, microgránulos—, pueden ser seleccionadas según la aplicación final predeterminada.

5 Según algunas realizaciones, la composición de la invención comprende, además, al menos un fungicida y/o al menos un bio-fungicida y/o al menos un insecticida y/o al menos un bio-insecticida y/o al menos un nematocida y/o al menos un bio-estimulante.

Según una realización preferida, la composición de la invención se presenta en forma de un recubrimiento para semillas.

10 Por ejemplo, dicho fungicida se selecciona del grupo constituido por maneb, mancozeb, metalaxil-ridomil, miclobutanil, olpisan, propamocarb, quintoceno, estreptomicina, azufre, tiofanato-metilo, thiram, triforina, vinclozolina, blanco de cinc, zineb, ziram, banrot, cobre fijado, clorotalonil, captan, cloroneb, ciproconazol, etileno de cinc, bisditiocarbamato, etridiazol, fenaminosulf, fenarimol, flutolanil, folpet, fosetil-Al e iprodiona.

Bio-fungicidas ejemplares son: *Trichoderma* sp., *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Streptomyces* sp., *Coniothyrium minitans* y *Pythium oligandrum*.

15 Según algunas realizaciones, el insecticida se selecciona del grupo constituido por organofosfatos, carbamatos y neonicotinoides.

Según algunas realizaciones, dicho bio-insecticida se selecciona del grupo constituido por *Bacillus* sp., *Chromobacterium* sp., *Beauveria* sp. y *Metarhizium* sp.

Según algunas realizaciones, dicho nematocida es un organofosfato o un carbamato.

20 Según algunas realizaciones, dicho bio-nematocida es *Pasteuria* sp.

Otro objeto de la presente invención es un proceso para la producción de una composición que comprende la cepa *Dominikia tenuihyphara* de la invención.

El proceso de la invención comprende las siguientes etapas:

- 25 a. proporcionar un sustrato;
- b. dotar a dicho sustrato de las semillas de una planta anfitriona y de la cepa *Dominikia tenuihyphara*, depositada con el número de entrada MUCL 57072;
- 30 c. cultivar dicha planta anfitriona y regar para mantener dicho sustrato con un nivel de humedad de al menos un 75% de la capacidad de campo;
- d. suspender dicho riego durante un periodo de al menos 7 días;
- 35 e. retirar el sustrato y la parte aérea de dicha planta anfitriona;
- f. secar el sustrato retirado;
- g. triturar el sustrato seco para obtener gránulos que tengan un tamaño de partícula por debajo de 100 µm. Preferiblemente, el sustrato comprende una arcilla.

40 Según algunas realizaciones, la *Dominikia tenuihyphara* proporcionada en la etapa b. es un inóculo que comprende propágulos de la cepa *Dominikia tenuihyphara*. Preferiblemente, dicho inóculo se obtiene proporcionando al sistema radicular de una planta anfitriona una *Dominikia tenuihyphara* sustancialmente pura, cultivando dicha planta anfitriona en un sustrato que preferiblemente comprende una arcilla (preferiblemente una arcilla de esmectita estéril), preferiblemente durante un ciclo de vida de la planta anfitriona, y extrayendo subsiguientemente el sistema radicular para obtener un inóculo. En este caso, el inóculo comprende una cantidad del sustrato, de raicillas y de propágulos de *Dominikia tenuihyphara*.

Según una realización preferida, el proceso de la invención comprende además una etapa h1. de microgranulación.

Preferiblemente, mediante microgranulación puede obtenerse una composición que comprende la cepa *Dominikia tenuihyphara* de la invención en forma de microgránulos.

50 Como se ha mencionado anteriormente, dichos microgránulos tienen un tamaño que oscila entre 500 µm y 2000 µm, preferiblemente entre 800 µm y 1500 µm, más preferiblemente entre 900 µm y 1200 µm.

Según una realización preferida, el proceso de la invención comprende además una etapa h2. de preparación de un inoculante biológico concentrado para el recubrimiento de semillas de cereales, concretamente un inoculante biológico

concentrado para el recubrimiento de semillas de cereales del producto triturado obtenido según la etapa g. Tiene que hacerse notar que, en este contexto, la etapa h2. de inoculante biológico concentrado para el recubrimiento de semillas de cereales está pensada como una etapa en la que aumenta la concentración de la *Dominikia tenuihyphara* (por ejemplo, de los propágulos de *Dominikia tenuihyphara*) en la composición.

- 5 Por ejemplo, dicha etapa h2. de concentración se puede llevar a cabo tamizando el producto triturado obtenido según la etapa g. para seleccionar los gránulos que tienen un tamaño de partícula por encima de un valor predeterminado; por ejemplo, por encima de 35 µm.

- 10 Ventajosamente, la etapa h2. de concentración permite aumentar la concentración de *Dominikia tenuihyphara* (por ejemplo, de los propágulos de *Dominikia tenuihyphara*) hasta 10 veces la concentración inicial, preferiblemente hasta 50 veces la concentración inicial (es decir, la concentración de *Dominikia tenuihyphara* en el producto antes de la etapa h2), más preferiblemente hasta 100 veces la concentración inicial; es decir, 100 veces con respecto a la concentración de la composición antes de la etapa h2.

- 15 Es posible aumentar la concentración de *Dominikia tenuihyphara* (por ejemplo, de los propágulos de *Dominikia tenuihyphara*) más de 100 veces la concentración inicial (es decir, la concentración de *Dominikia tenuihyphara* en el producto antes de la etapa h2). Según una realización preferida, el proceso de la invención comprende además una etapa i. de recubrimiento de semillas, concretamente de recubrimiento de semillas del producto concentrado obtenido según la etapa h2. Dicha etapa i. de recubrimiento de semillas comprende las siguientes etapas:

- i1. Cubrir las semillas con una sustancia adhesiva;
- 20 i2. Añadir el inoculante biológico concentrado;
- i3. Opcionalmente, proporcionar uno o más tratamientos compatibles seleccionados entre:
- i3.1 Tratamientos con fungicidas, insecticidas y/o herbicidas, compatibles con hongos formadores de micorrizas,
- 25 i3.2 Tratamiento con microorganismos beneficiosos,
- i3.3 Tratamiento con macro y/o micronutrientes,
- i3.4 Tratamiento con estimulantes,
- 30 i3.5 Tratamiento con pigmentos colorantes compatibles con hongos micorrícicos;
- i4. Secar las semillas.

Otro objeto de la presente invención es el uso de una composición que comprende *Dominikia tenuihyphara*, depositada con el número de entrada MUCL 57072 como bio-estimulante.

- 35 Según se usa en el presente documento, el término “bio-estimulación” se refiere a la estimulación ejercida por una composición según la invención en plantas a las que se proporciona dicha composición.

- 40 Sin pretender propugnar una explicación científica específica, puede emitirse la hipótesis de que la cepa *Dominikia tenuihyphara* de la invención ejerce la función de translocación de nutrientes: tomando estos nutrientes del suelo o sustrato y usando dichos nutrientes en su sistema metabólico, transloca dichos nutrientes de su red micelial y subsiguientemente los intercambia en las células de la raíz.

Según una realización preferida, la composición de la presente invención se usa como bio-estimulante en cereales.

Otro objeto de la presente invención es el uso como bio-nematicida de una composición que comprende la *Dominikia tenuihyphara*, depositada con el número de entrada MUCL 57072.

En otras palabras, la composición de la presente invención puede ser usada para proteger a plantas contra nematodos.

- 45 Según una realización preferida, la composición de la presente invención es usada como bio-nematicida en cereales.

Ventajosamente, la composición de la invención puede ser proporcionada de varias maneras a plantas, es decir, a una cosecha; por ejemplo a una cosecha de cereales.

- 50 Según algunas realizaciones, la composición de la invención puede ser aplicada a la planta mediante un tratamiento para semillas (es decir, un recubrimiento para semillas), un tratamiento para raíces, el embebimiento de raíces en una emulsión, su adición al agua de riego, el riego, la aplicación de polvo al sistema radicular o la aplicación de una emulsión inyectada en el sistema radicular.

Preferiblemente, en particular cuando tiene que ser proporcionada a cereales, la composición de la invención es proporcionada mediante recubrimiento para semillas o junto con las semillas en el momento de la siembra, o en forma de microgranulado o junto con las semillas en el momento de la siembra.

Breve descripción de las figuras

- 5 – Figura 1: Dinámica de producción de esporas y de ocupación fúngica, expresada a través de la densidad visual (%) en plantas tratadas con *Dominikia tenuihyphara*.
- Figura 2: Comportamiento del micelio externo arbuscular y del endófito arbuscular en el tratamiento con *Dominikia tenuihyphara*.
- 10 – Figura 3: Relación entre el micelio arbuscular externo y el endófito arbuscular en el tratamiento con la *Dominikia tenuihyphara*.

Sección experimental

Ejemplo 1. Análisis moleculares

15 Extracción de ADN

Se transfirieron hifas aisladas y esporas a tubos Eppendorf de 1,5 ml con 0,2 g de perlas de vidrio (de 2 mm de diámetro) y 100 µl de tampón de CTAB (2% CTAB = bromuro de cetiltrimetilamonio [por sus siglas en inglés], 1,4 M NaCl, 0,1 M Tris-HCl pH 7,5, 0,2 M Na-EDTA). Se homogeneizó esta mezcla usando un molino de bolas Retsch MM301 a 50 Hz durante 30 segundos. Se añadieron otros 400 µl de tampón de CTAB y la mezcla se incubó a 65°C durante una hora. Se añadieron a la suspensión 400 µl de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) y se mezcló invirtiendo los tubos de reacción, y subsiguientemente se centrifugó durante 5 min a 15000 × g, y la capa superior se recuperó en un tubo Eppendorf limpio. Esta etapa se repitió dos veces. A esta suspensión se añadieron 200 µl de acetato de amonio 5 M; esta mezcla se incubó a 4°C durante al menos 30 minutos, seguidos por 20 minutos de centrifugación a 4°C y 15000 × g. Se precipitó ADN con 700 µl de isopropanol a -20°C durante la noche. El sedimento de ADN obtenido tras la precipitación con isopropanol se lavó con etanol al 70% enfriado con hielo, se secó al aire y se volvió a disolver en 50 µL de tampón TE (10 mM Tris, 10 mM EDTA, pH 8) + 4,5 U RNasa/ml.

Condiciones de PCR

Se amplificó el ADNr 18S usando los cebadores GEOA2, GEO11 (Schwarzott D, Schüßler A (2001), A simple and reliable method for SSU rRNA gene DNA extraction, amplification, and cloning from single AM fungal spores. Mycorrhiza 10: 203-207). Los cebadores usados para la amplificación de PCR y para la secuenciación de la región separadora transcrita interna del ADNr 18S fueron Glom1310 e ITS4i (Redecker D. (2000) Specific PCR primers to identify arbuscular mycorrhizal fungi within colonized roots. Mycorrhiza 10: 73-80). Se llevaron a cabo amplificaciones en una mezcla de 0,2 mM dNTP, 1 mM de cada cebador, 10% de tampón de reacción de PCR y agua esterilizada de calidad molecular. Se añadió ADN polimerasa GoTaq® (Promega, Mannheim, Alemania) a razón de 4 u / 100 µl de mezcla de reacción; se usaron 2 µl de plantilla de ADN genómico en cada reacción de 20 µl. Las amplificaciones se llevaron a cabo en un termociclador avanzado Primus 96 (peqLab Biotechnologie) en tubos de reacción de 200 µl usando las siguientes condiciones de PCR: 96°C, 180 s de desnaturalización inicial; seguido por 35 ciclos: 96°C, 30 s, 58°C, 30 s, 72°C, 90 s; y una extensión final a 72°C durante 10 minutos.

Datos de secuencias y taxonomía de los glomeromicetos

40 Como base de la filogenia de 18S se usó el alineamiento de referencia publicado por Krüger y otros (Krüger M, Krüger C, Walker C, Stockinger H, Schüßler A (2012) Phylogenetic reference data for systematics and phylotaxonomy of arbuscular mycorrhizal fungi from phylum to species level. New Phytol 193: 970-984; descargable en www.amf-phylogeny.com). Para identificar secuencias medioambientales similares, se contrastó la secuencia de *D. tenuihyphara* con GenBank y se incluyeron las secuencias muy similares en el alineamiento que formaba la base del árbol 18S. Se usaron las secuencias publicadas 18S-ITS1 parciales - 5.8S parciales para la filogenia de *Dominikia*.

Análisis de datos

Los alineamientos se llevaron a cabo inicialmente mediante Clustal W. Se calculó un análisis filogenético de máxima verosimilitud a través del portal de Internet CIPRES (Miller MA, Pfeiffer W, Schwartz T., 2010). Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees, en Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (GCE), 14 de noviembre de 2010, Nueva Orleans, Luisiana pp. 1 - 8; <http://www.phylo.org/>) con RAxML versión 8.0 (Stamatakis y otros 2014) usando 100 réplicas de arranque y el modelo GTRGAMMA. Se construyó un árbol de consenso bayesiano usando MrBayes versión 2.0.5. Se realizaron dos tandas MC3 separadas con árboles iniciales generados de forma aleatoria para 2M de generaciones, cada una con una cadena fría y tres calentadas usando el modelo GTR+I. Todos los parámetros se estimaron a partir de los datos. Los árboles se muestrearon cada 1000 generaciones. Se descartaron 200000 generaciones como generaciones de "rodaje" y se construyeron árboles de consenso a partir de la muestra de retorno.

Ejemplo 2. Procedimiento de producción de una realización de la composición de la invención: Composición concentrada para el recubrimiento de semillas

Primera fase: Condiciones del invernadero

5 Sustrato: Se seleccionan arcillas de esmectita con un pH entre 7,8 y 8 y se esterilizan en ciclos alternos de tres días antes de su uso como sustrato.

Cepa de HMA: Como inóculo de partida se usan propágulos de *Dominikia tenuihyphara* en condiciones puras. Este tipo de inoculante está siempre en reproducción continua en ciclos de 90-180 días, ya sea en cámara de crecimiento o en invernaderos con condiciones controladas de las plantas anfitrionas. Se usan plantas diferentes para reproducir el inóculo en ciclos sucesivos para evitar la transmisión de enfermedades en el mismo anfitrión.

10 Verano - otoño: *Sorghum vulgare* y *Ocimum sp.*

Invierno - primavera: *Lolium perenne*.

Macetas de cultivo: Se usan macetas de 15 litros de volumen.

15 Condiciones de crecimiento de las plantas anfitrionas

En la cámara de crecimiento o invernadero, el cultivo comienza con la inoculación directa del sistema radicular de la planta anfitriona con el inóculo puro de la cepa seleccionada del hongo micorrízico arbuscular (*Dominikia tenuihyphara*) en un sustrato de arcilla de esmectita estéril. Estas plantas se cultivan durante todo su ciclo de vida, según el tipo de planta, que lleva entre 90 y 180 días. Las plantas se mantienen siempre bien hidratadas, con un aporte de riego diario (agua estéril) con un intervalo de temperatura entre 25 y 28°C y una humedad relativa del 65%. Una vez completados, se extrae el sistema radicular, que contiene sustrato de esmectita, raicillas y propágulos puros del HMA, para ser usados subsiguientemente para la ampliación de escala en la segunda fase.

Para determinar la calidad del inóculo, se usan las siguientes especificaciones mínimas:

25 Esporas totales: 50-225 esporas/g.

Micelio extramático: > 70 mg/kg de sustrato.

Porcentaje de raicillas colonizadas: *Sorghum* > 50%, *Lolium* > 45%, *Ocimum* > 40%.

30 Concentración de NMP: > 1×10^4 propágulos por cada 100 ml de sustrato.

Segunda fase: Ampliación de escala

Etapas 1: Preparación de lechos

35 Los lechos se construyen con un material plástico de revestimiento para que el lecho esté aislado del suelo circundante; los lechos se construyen de modo que se produzca drenaje y se impida el crecimiento de vegetación no deseada, preferiblemente con una cubierta plástica.

Los lechos deberían rellenarse con la arcilla de esmectita seleccionada (arcilla roja Galve). La humedad de la arcilla debería ser aproximadamente del 15% para facilitar su manejo durante el llenado del lecho. Después del llenado debería proporcionarse riego hasta la saturación para mejorar la estructura.

40 – Los lechos se sitúan en sitios bien drenados.

– Los lechos pueden tener cualquier dimensión, teniendo en cuenta el acceso requerido para facilitar el tránsito de personas y del equipo necesario para el cuidado del lecho.

45 – Los lechos tienen un sistema de riego dictado en función de las necesidades locales. La configuración preferida del sistema puede ser bien riego por goteo o aspersor, y debería automatizarse para permitir el riego independiente de zonas seleccionadas del lecho.

Etapas 2: Especies de plantas anfitrionas

50 Determinación de las especies de plantas anfitrionas y de los hongos micorrízicos que pueden ponerse en el sistema: La selección y la identificación de la planta anfitriona y de la especie fúngica corresponderán a las condiciones del sitio específico y a los objetivos de la producción. Se usan césped inglés (*Lolium perenne*) y el HMA previamente producido en la primera fase.

Etapas 3: Siembra de la planta anfitriona e inoculación

Antes de la siembra de la planta anfitriona se comprueba la germinación de las semillas. En función de los resultados de esta comprobación, se determina la tasa de siembra apropiada. En el caso del césped inglés perenne, la semilla se siembra a voleo a razón de 80 kg/ha de semilla previamente certificada usando semilla formando gránulos. Junto con la semilla, también se aplican directamente a la arcilla de esmectita 20 g de inóculo de HMA por m² de lecho.

- 5 Inmediatamente después de la siembra se aplica riego como un rocío fino para evitar la redistribución de la semilla y el inóculo.

El agua usada para el riego debería tener preferiblemente las siguientes características:

- Valores de pH ≥ 6 y $\leq 7,5$
- 10 – Conductividad eléctrica: $< 1,6$ mS/m
- Sales totales solubles: < 1000 ppm
- Relación de adsorción del sodio (RAS) < 10
- 15 – Libre de elementos pesados y patógenos. Se prefiere que el agua usada para el riego sea agua potable.

Etapas 4: Riego y actividades de cultivo

- 20 El riego aplicado debería ser suficiente para lograr un 100% de la capacidad de campo, pero debería evitarse aplicar demasiada agua y causar encharcamiento o estancamiento de agua. Los lechos deberían volver a regarse cuando la humedad de la arcilla baje al 75 - 80% de la capacidad de campo.

Etapas 5: Gestión del establecimiento de la simbiosis micorrízica y conocimiento de la dinámica del desarrollo de la colonización del hongo micorrízico

- 25 Durante el crecimiento y el desarrollo de la planta anfitriona, se produce la colonización radicular del HMA y se establece la simbiosis entre la planta y el hongo. Para evaluar el desarrollo de esta relación se realiza un muestreo periódico del sistema de raíces para evaluar el desarrollo micorrízico. Los procedimientos usados para evaluar la colonización incluyen Gerdemann y Nicolson (1963) (Gerdemann J.W., Nicolson T.H. 1963. Spores of mycorrhizal endogen species extracted from soil by wet sieving and decanting. Transactions of the British Mycological Society 46(2):235-44), McGonigle (1990) (McGonigle, T.P., Miller M.H., Evans D.G., Fairchild G.L., Swan J.A. 1990. A new method which gives an objective measure of colonization of roots by vesicular arbuscular mycorrhizal fungi. New Phytologist 115 (3):495-501), y Phillips y Hayman (1970) (Phillips, J.M., Hayman D.S. 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. Transactions of the British Mycological Society 55:158-161).
- 30

- 35 El muestreo comienza dos meses después de la siembra y continúa mensualmente hasta el fin de la estación de crecimiento. Con la información obtenida de estas muestras puede determinarse la dinámica del desarrollo de la simbiosis micorrízica dentro del inoculante.

La evaluación del proceso de producción se basa en la colonización micorrízica de las raíces, en la concentración extramática del micelio y en el contenido de esporas en muestras de arcilla que se toman periódicamente. Conocer la dinámica del desarrollo de la producción de micorrizas permite determinar el momento óptimo de la cosecha y aprovechar al máximo el proceso de simbiosis entre la planta anfitriona y el hongo micorrízico.

40 Etapas 6: Cosecha

Si la planta anfitriona que se usa en el *Lolium perenne*, entonces el momento óptimo de la cosecha se produce normalmente entre 6 y 7 meses después de la siembra, porque en ese periodo las plantas maduran, completan su ciclo de vida y muestran una tendencia a la pérdida de vigor y se ponen amarillas.

- 45 Quince días antes de la fecha de cosecha programada se elimina el aporte de riego y se mantiene el follaje para permitir que la arcilla pierda humedad lentamente, asegurando la finalización del proceso de inoculación. Si esta actividad coincide con la temporada de lluvias, será necesario proteger el lecho de la lluvia para permitirle que seque oportunamente, cubriendo el lecho con un plástico impermeable. Primero se elimina manualmente el follaje de plantas anfitrionas situado por encima del suelo. La cosecha se realiza sacando la arcilla del lecho. El sustrato se quita dividiendo la masa de arcilla en porciones lo más delgadas posible para facilitar la mezcla de su contenido en toda la profundidad del perfil y ponerlo en bolsas para su transporte.
- 50

Etapas 7: Secado y trituración del inóculo

Secado: Se somete a solarización y a desinfección térmica al sustrato recogido y a los propágulos micorrízicos durante 30 días a 50°C. El periodo de secado puede extenderse hasta alcanzar un contenido de humedad por debajo del 5%, para facilitar el proceso de trituración.

Trituración: El producto se muele en un molino industrial y se enfría a 2°C para evitar el sobrecalentamiento de los propágulos micorrícicos. La trituración continúa hasta que se logra un tamaño de partícula por debajo de 100 micrómetros.

Tercera fase: Concentración

- 5 Después de la etapa 7, la trituración de la biomasa, se procede a la concentración del producto usando un tamiz de 35 micrómetros. Se descartan las partículas obtenidas por debajo de esta medida (el 60-70% del producto inicial) y quedará finalmente una composición concentrada de entre el 25 y el 30% restante del producto ultraconcentrado que no pasa a través de esa medida. Con el uso de esta tecnología, los inventores pasaron de $1,2 \times 10^4$ propágulos por cada 100 ml a $1,2 \times 10^6$ propágulos por cada 100 ml.

10 Cuarta fase: Recubrimiento de semillas

El recubrimiento de las semillas con un inoculante micorrícico puede efectuarse en una máquina especial para el recubrimiento de semillas, en una hormigonera convencional o manualmente en un recipiente de mezclado. Dicho recubrimiento requiera diversas etapas que se describen a continuación en el orden en el que se realizan.

- 15 1. Como etapa inicial, las semillas se recubren con una sustancia adhesiva. Las sustancias adhesivas que posiblemente se puedan usar además del agua incluyen adhesivos orgánicos (gelatina, etilcelulosa, propilenglicol, etc.) y adhesivos inorgánicos (aceites minerales, polivinilos, resinas plásticas, etc.). Los adhesivos preferidos usados son poliméricos o copoliméricos del grupo polivinilo, tales como la polivinilpirrolidona y el acetato de polivinilo. El adhesivo se añade a una solución acuosa o alcohólica hasta su solubilidad óptima, variando la cantidad de adhesivo usada entre un 0,1% y un 15%, preferiblemente entre un 0,5% y un 10% y aún más preferiblemente entre un 1,0% y un 5% del peso total de las semillas que han de ser recubiertas. La cantidad de adhesivo usada dependerá de sus propiedades químicas, así como del tipo de semilla que haya de tratarse. El tiempo de tratamiento de las semillas con el adhesivo puede variar entre 1 y 60 segundos, preferiblemente entre 5 y 50 segundos y aún más preferiblemente entre 10 y 40 segundos por cada 100 kg de semillas usados.

- 25 2. A continuación, después del recubrimiento con el adhesivo, se añade el inoculante micorrícico. La proporción del inoculante añadido a las semillas puede seleccionarse en el intervalo entre un 0,1% y un 15%, preferiblemente entre un 0,5% y un 10% y aún más preferiblemente entre un 1% y un 5% del peso de las semillas, que dependerá del tipo y la variedad. El tiempo de tratamiento de las semillas con el inoculante micorrícico puede variar entre 1 y 50 segundos, preferiblemente entre 5 y 40 segundos y aún más preferiblemente entre 10 y 30 segundos por cada 100 kg de semillas usados.

- 30 El tratamiento micorrícico se puede combinar con otros tratamientos que se describen en las secciones 2a a 2e. Estos tratamientos también se pueden llevar a cabo independientemente del tratamiento con inoculante micorrícico, obteniendo un recubrimiento multicapa. Las etapas que han de realizarse en el recubrimiento de cada capa son iguales que las del caso del inoculante micorrícico. Estas capas pueden separarse recubriendo las semillas con sustancias inocuas de origen calcáreo (carbonato cálcico y similares), arcilloso o polimérico. La sustancia formadora de gránulos o costras no debe superar el 50%, preferiblemente el 40% y aún más preferiblemente el 30% del peso de la semilla y se añade a la semilla con una sustancia adhesiva, como se ha mencionado en la sección 1.

- 35 2a. Tratamientos con fungicidas, insecticidas y/o herbicidas compatibles con hongos formadores de micorrizas. En términos generales, todos los herbicidas y los insecticidas comerciales son compatibles con los hongos formadores de micorrizas. Sin embargo, no todos los fungicidas son compatibles con la supervivencia de los hongos micorrícicos. Los principales fungicidas que han de usarse incluyen azoxistrobina, carboxina, ciproconazol, clorotalonil, metalaxil, miclobutanil y protioconazol. La cantidad de pesticida usada dependerá de las recomendaciones del fabricante, y pueden usarse pesticidas diversos dependiendo de la necesidad.

- 45 2b. Tratamiento con microorganismos beneficiosos, incluyendo *Trichoderma* spp., bacterias *Rhizobium* y/o una combinación de microorganismos beneficiosos para la rizosfera, tales como *Aspergillus*, *Penicillium* y bacterias fijadoras de nitrógeno.

- 50 2c. Tratamiento con macro y/o micronutrientes, siendo el nitrógeno (N), el fósforo (P), el potasio (K), el calcio (Ca), el magnesio (Mg) y azufre (S) los macronutrientes esenciales, y siendo el hierro (Fe), el cinc (Zn), el manganeso (Mn), el boro (B), el cobre (Cu), el molibdeno (Mo) y el cloro (Cl) los micronutrientes esenciales. La dosis de nutrientes para el recubrimiento puede variar entre un 0,01% y un 15%, preferiblemente entre un 0,05% y un 10%, y aún más preferiblemente entre un 0,1% y un 5% del peso total de las semillas que han de recubrirse.

- 55 2d. Tratamiento con estimulantes. Recubrir las semillas con estimulantes que inducen la germinación de las semillas y el crecimiento y la defensa de la planta y la esporulación y el crecimiento fúngico micorrícico. Los estimulantes pueden ser fitohormonas (ácido abscísico, estrigolactonas, brasinoesteroides, etc.) y sus inductores y derivados, metabolitos secundarios (flavonoides, terpenoides, etc.) y cofactores (iones metálicos, etc.).

2e. Tratamiento con pigmentos colorantes: estos pigmentos deben ser compatibles con la supervivencia del hongo micorrízico y ser claros diferenciadores entre semillas tratadas y no tratadas.

5 3. Las etapas 1 y 2 significan que se efectúa un recubrimiento completo del inoculante micorrízico con la sustancia adhesiva en un tiempo entre 1 y 40 segundos, preferiblemente entre 5 y 30 segundos y aún más preferiblemente entre 10 y 20 segundos, llevando a cabo un recubrimiento completo del inoculante micorrízico con la sustancia adhesiva.

10 4. Después de efectuar el tratamiento micorrízico, las semillas son secadas durante un tiempo que puede variar entre 1 y 50 segundos, preferiblemente entre 5 y 40 segundos y aún más preferiblemente entre 10 y 30 segundos. Esta etapa se puede realizar después de la etapa 5.

5. Por último, las semillas recubiertas se descargan en contenedores desde el componente de recubrimiento. La duración de la descarga puede variar entre 5 y 30 segundos, preferiblemente entre 10 y 25 segundos y aún más preferiblemente entre 15 y 20 segundos.

15 Ejemplo 3. Procedimiento de producción de una realización de la composición de la invención: Composición microgranulada

Primera fase: Condiciones del invernadero

Sustrato: Se seleccionan arcillas de esmectita con un pH entre 7,8 y 8 y se esterilizan en ciclos alternos de tres días antes de su uso como sustrato.

20 Cepa de HMA: Como inóculo de partida se usan propágulos de *Dominikia tenuihyphara* en condiciones puras. Este tipo de inoculante está siempre en reproducción continua en ciclos de 90-180 días, ya sea en cámara de crecimiento o en invernaderos con condiciones controladas de las plantas anfitrionas. Se usan plantas diferentes para reproducir el inóculo en ciclos sucesivos para evitar la transmisión de enfermedades en el mismo anfitrión.

25 Verano - otoño: *Sorghum vulgare* y *Ocimum sp.*

Invierno - primavera: *Lolium perenne*.

Macetas de cultivo: Se usan macetas de 15 litros de volumen.

Condiciones de crecimiento de las plantas anfitrionas

30 En la cámara de crecimiento o invernadero, el cultivo comienza con la inoculación directa del sistema radicular de la planta anfitriona con el inóculo puro de la cepa seleccionada del hongo micorrízico arbuscular (*Dominikia tenuihyphara*) en un sustrato de arcilla de esmectita estéril. Estas plantas se cultivan durante todo su ciclo de vida, según el tipo de planta, que lleva entre 90 y 180 días. Las plantas se mantienen siempre bien hidratadas, con un aporte de riego diario (agua estéril) con un intervalo de temperatura entre 25 y 28°C y una humedad relativa del 65%. Una vez completados, se extrae el sistema radicular, que contiene sustrato de esmectita, raicillas y propágulos puros del HMA, para ser usados subsiguientemente para la ampliación de escala en la segunda fase.

Para determinar la calidad del inóculo, se usan las siguientes especificaciones mínimas:

Esporas totales: 50-225 esporas/g.

40 Micelio extramático: > 70 mg/kg de sustrato.

Porcentaje de raicillas colonizadas: *Sorghum* > 50%, *Lolium* > 45%, *Ocimum* > 40%.

Concentración de NMP: > 1×10⁴ propágulos por cada 100 ml de sustrato.

45 Segunda fase: Ampliación de escala

Etapas 1: Preparación de lechos

Los lechos se construyen con un material plástico de revestimiento para que el lecho esté aislado del suelo circundante; los lechos se construyen de modo que se produzca drenaje y se impida el crecimiento de vegetación no deseada, preferiblemente con una cubierta plástica.

50 Los lechos deberían rellenarse con la arcilla de esmectita seleccionada (arcilla roja Galve). La humedad de la arcilla debería ser aproximadamente del 15% para facilitar su manejo durante el llenado del lecho. Después del llenado debería proporcionarse riego hasta la saturación para mejorar la estructura.

— Los lechos se sitúan en sitios bien drenados.

– Los lechos pueden tener cualquier dimensión, teniendo en cuenta el acceso requerido para facilitar el tránsito de personas y del equipo necesario para el cuidado del lecho.

- 5 – Los lechos tienen un sistema de riego dictado en función de las necesidades locales. La configuración preferida del sistema puede ser bien riego por goteo o aspersor, y debería automatizarse para permitir el riego independiente de zonas seleccionadas del lecho.

Etapa 2: Especies de plantas anfitrionas

- 10 Determinación de las especies de plantas anfitrionas y de los hongos micorrícicos que pueden ponerse en el sistema: La selección y la identificación de la planta anfitriona y de la especie fúngica corresponderán a las condiciones del sitio específico y a los objetivos de la producción. Se usan césped inglés (*Lolium perenne*) y el HMA previamente producido en la primera fase.

Etapa 3: Siembra de la planta anfitriona e inoculación

- 15 Antes de la siembra de la planta anfitriona se comprueba la germinación de las semillas. En función de los resultados de esta comprobación, se determina la tasa de siembra apropiada. En el caso del césped inglés perenne, la semilla se siembra a voleo a razón de 80 kg/ha de semilla previamente certificada usando semilla formando gránulos. Junto con la semilla, también se aplican directamente a la arcilla de esmectita 20 g de inóculo de HMA por m² de lecho.

Inmediatamente después de la siembra se aplica riego como un rocío fino para evitar la redistribución de la semilla y el inóculo.

El agua usada para el riego debería tener preferiblemente las siguientes características:

- 20 – Valores de pH ≥ 6 y $\leq 7,5$
- Conductividad eléctrica: $< 1,6$ mS/m
- 25 – Sales totales solubles: < 1000 ppm
- Relación de adsorción del sodio (RAS) < 10
- Libre de elementos pesados y patógenos. Se prefiere que el agua usada para el riego sea agua potable.

Etapa 4: Riego y actividades de cultivo

- 30 El riego aplicado debería ser suficiente para lograr un 100% de la capacidad de campo, pero debería evitarse aplicar demasiada agua y causar encharcamiento o estancamiento de agua. Los lechos deberían volver a regarse cuando la humedad de la arcilla baje al 75 - 80% de la capacidad de campo.

Etapa 5: Gestión del establecimiento de la simbiosis micorrícica y conocimiento de la dinámica del desarrollo de la colonización del hongo micorrícico

- 35 Durante el crecimiento y el desarrollo de la planta anfitriona, se produce la colonización radicular del HMA y se establece la simbiosis entre la planta y el hongo. Para evaluar el desarrollo de esta relación se realiza un muestreo periódico del sistema de raíces para evaluar el desarrollo micorrícico. Los procedimientos usados para evaluar la colonización incluyen Gerdemann y Nicolson (1963) (Gerdemann J.W., Nicolson T.H. 1963. Spores of mycorrhizal endogen species extracted from soil by wet sieving and decanting. Transactions of the British Mycological Society 46(2):235-44), McGonigle (1990) (McGonigle, T.P., Miller M.H., Evans D.G., Fairchild G.L., Swan J.A. 1990. A new method which gives an objective measure of colonization of roots by vesicular arbuscular mycorrhizal fungi. New Phytologist 115 (3):495-501), y Phillips y Hayman (1970) (Phillips, J.M., Hayman D.S. 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. Transactions of the British Mycological Society 55:158-161).

- 45 El muestreo comienza dos meses después de la siembra y continúa mensualmente hasta el fin de la estación de crecimiento. Con la información obtenida de estas muestras puede determinarse la dinámica del desarrollo de la simbiosis micorrícica dentro del inoculante.

- 50 La evaluación del proceso de producción se basa en la colonización micorrícica de las raíces, en la concentración extramática del micelio y en el contenido de esporas en muestras de arcilla que se toman periódicamente. Conocer la dinámica del desarrollo de la producción de micorizas permite determinar el momento óptimo de la cosecha y aprovechar al máximo el proceso de simbiosis entre la planta anfitriona y el hongo micorrícico.

Etapa 6: Cosecha

La cosecha es la etapa más crítica en el proceso de producción. Si la planta anfitriona que se usa en el *Lolium perenne*, entonces el momento óptimo de la cosecha se produce normalmente entre 6 y 7 meses después de la siembra, porque

en ese periodo las plantas maduran, completan su ciclo de vida y muestran una tendencia a la pérdida de vigor y se ponen amarillas.

- 5 Quince días antes de la fecha de cosecha programada se elimina el aporte de riego y se mantiene el follaje para permitir que la arcilla pierda humedad lentamente, asegurando la finalización del proceso de inoculación. Si esta actividad coincide con la temporada de lluvias, será necesario proteger el lecho de la lluvia para permitirle que seque oportunamente, cubriendo el lecho con un plástico impermeable.

Primero se elimina manualmente el follaje de plantas anfitrionas situado por encima del suelo. La cosecha se realiza sacando la arcilla del lecho. El sustrato se quita dividiendo la masa de arcilla en porciones lo más delgadas posible para facilitar la mezcla de su contenido en toda la profundidad del perfil y ponerlo en bolsas para su transporte.

10 Etapa 7: Secado y trituración del inóculo

Secado: Se somete a solarización y a desinfección térmica al sustrato recogido y a los propágulos micorrícicos durante 30 días a 50°C. El periodo de secado puede extenderse hasta alcanzar un contenido de humedad por debajo del 5%, para facilitar el proceso de trituración.

- 15 Trituración: El producto se muele en un molino industrial y se enfría a 2°C para evitar el sobrecalentamiento de los propágulos micorrícicos. La trituración continúa hasta que se logra un tamaño de partícula por debajo de 100 micrómetros.

Tercera fase: Microgranulación

El proceso de microgranulación se divide en tres etapas:

- 20 – Adición de soporte granular a la mezcladora biconica rotativa. Para producir el soporte se usó: Mezcla de mica, atapulgita y caliza en un intervalo del 40-90% en peso, más preferiblemente del 50-80% en peso, aún más preferiblemente del 60-70% en peso.

- 25 – Adición de micorizas (hongo micorrícico arbuscular): el HMA se dosifica, mediante un tornillo, en un 10-60% en peso, más preferiblemente en un 20-50% en peso, aún más preferiblemente en un 30-40% en peso de la *Dominikia tenuihyphara* previamente producida (etapa 7) junto con un aglutinante (cera, aceite de linaza, goma arábica, goma tragacanto, metilcelulosa, alcohol polivinílico, harina de tapioca, lactosa, sacarosa, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, lactosa en polvo, sacarosa en polvo, fécula de tapioca (harina de mandioca) y celulosa microcristalina, gomas o proteína, como clara de huevo o caseína) en un intervalo del 1 al 25% en peso, más preferiblemente del 5 al 20% en peso, aún más preferiblemente del 10 al 15% en peso dentro de la mezcladora biconica rotativa. Durante esta operación, la mezcladora se mantiene en movimiento hasta la homogeneización total de los gránulos.

- 35 – Envasado: una vez que el producto formulado está completamente homogeneizado, se descarga sobre un tamiz para eliminar grumos y el polvo producido. Por último, el producto se recoge en una tolva de envasado desde la que se procede automáticamente al correspondiente llenado de los contenedores.

La concentración final de la composición microgranulada es $> 1 \times 10^4$ propágulos por cada 100 ml de producto.

Ejemplo 4. Efecto de la composición de la invención en el desarrollo del trigo (*Triticum durum*)

- 40 Para demostrar la eficacia de la composición de la presente invención, que comprende el hongo micorrícico arbuscular (HMA) *Dominikia tenuihyphara*, depositado con el número de entrada MUCL 57072, sobre el trigo se realizó un ensayo en el campo experimental "Tres caminos", propiedad de CEBAS-CSIC en Murcia.

El diseño experimental fue de bloques aleatorios con cuatro repeticiones. Las parcelas experimentales fueron de 3 m de longitud por 4,2 m de anchura.

Se aplicaron los siguientes tratamientos:

- 45 – Control: no se aplicó fertilización química alguna ni ningún hongo
- Composición de la invención: proporcionada en forma microgranulada, a razón de 10 kg/ha, en combinación con fertilización química (Guerra, B. E. Micorriza arbuscular. Recurso microbiológico en la agricultura sostenible. Tecnología en Marcha, 2008, vol. 21, nº 1, pp. 191-201).
- 50 – Producto estándar: fertilización química (Guerra, B. E. Micorriza arbuscular. Recurso microbiológico en la agricultura sostenible. Tecnología en Marcha, 2008, vol. 21, nº 1, pp. 191-201): 150 kg/ha de nitrógeno, 54 kg/ha de fósforo, 100 kg/ha de potasio, 15 kg/ha de calcio, 15 kg/ha de magnesio, 23 kg/ha de azufre y otros micronutrientes.

La siembra se realizó el 1 de noviembre de 2013 y la cosecha tuvo lugar el 1 de junio de 2014, un total de 240 días. El tipo de siembra e inoculación usado fue mecánico y se aplicó a golpe de sembradora de cereales, y la composición de la invención, en forma microgranulada, se aplicó a razón de 10 kg/ha junto con la semilla.

5 El suelo usado se clasificó como nitisol (IUSS Working Group. WRB. World reference base for soil resources 2006. World Soil Resources Reports. Roma: FAO, 2006). Para la catalogación química del suelo se usaron los siguientes procedimientos analíticos:

– pH: relación suelo-solución 1:2,5.

10 – Materia orgánica (MO): Walkley y Black.

– P₂O₅: Oniani.

– Cationes intercambiables: extracción con NH₄ AC a 1 mol/l a pH 7 y valoración complexométrica (Ca y Mg) y fotometría de llama (Na y K).

15 Estos procedimientos están descritos en el manual de técnicas analíticas para el análisis de suelos, foliares, de abonos orgánicos y fertilizantes químicos (Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas. Manual de técnicas analíticas para análisis de suelo, foliar, abonos orgánicos y fertilizantes químicos: La Habana. 1989).

20 Los resultados de las características químicas del suelo (Tabla 2) muestran una fertilidad entre media y alta, observándose un contenido medio de materia orgánica, lo que responde a lo descrito para este tipo de suelo (Hernández, A.; Morell, F.; Ascanio, M. O.; Borges, Y.; Morales, M. y Yong, A. Cambios globales de los suelos ferralíticos rojos lixiviados (nitisoles ródicos éutricos) de la provincia La Habana. Cultivos Tropicales, 2006, vol. 27. n° 2, pp. 41-50).

Tabla 2: Características químicas del suelo.

Tabla 2	
Materia orgánica (%)	3,21
pH	7,02
P ₂ O ₅	397,25
K (cmol/kg de suelo)	0,96
Ca (cmol/kg de suelo)	14,26
Mg (cmol/kg de suelo)	3,70
Na (cmol/kg de suelo)	0,11

25 La cepa fúngica de la invención de *Dominikia tenuihyphara* se aisló de un suelo salino; este hongo es tolerante a altas concentraciones de sal.

30 Las variables analizadas fueron: el número de esporas de HMA por gramo de suelo rizosférico (Gederman, J. W. y Trappe, J. M. The endogonaceae in the Pacific Northwest. Mycologia Memoir No 5. The New York Botanic Garden. 1974, n° 5), el porcentaje de colonización micorrízica mediante la técnica de tinción de las raíces (Phillips, J. M. y Hayman, D. S. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. Transfer. Britanic: Mycology Society, 1970, vol. 55, pp. 158-161), el porcentaje de densidad visual mediante el procedimiento de intersecciones (Giovannetti, M. y Mosse, B. An evaluation of techniques to measure vesicular-arbuscular infection in roots. New Phytology, 1980, vol. 84, pp. 489-500) y el contenido de glomalina (glicoproteína) total que se obtuvo mediante el procedimiento de la olla a presión (Wright, S. E.; Nichols, K. A. y Schmidt, W. F. Comparison of efficacy of three extractants to solubilize glomalin on hyphae and in soil. Chemosphere, 2006, vol. 64, n° 7, pp. 1219-1224).

35 El contenido de nutrientes foliares (% de N, P y K) y el contenido proteínico total se determinaron a través de los procedimientos descritos en el manual de laboratorio de técnicas analíticas del INCA (Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas. Manual de técnicas analíticas para análisis de suelo, foliar, abonos orgánicos y fertilizantes químicos: La Habana. 1989).

40 La producción se evaluó como sigue: se evaluaron el número de granos por espiga, el número de espigas por m², la masa por cada 1000 granos y el rendimiento agrícola (T/ha).

El procesamiento estadístico de los resultados experimentales se efectuó mediante análisis ANOVA unidireccional y se usó la prueba de Duncan (Duncan, D. B. Multiple range and multiple F tests. Biometrics, 1955, vol. 11, n° 1) cuando había diferencias entre medios de tratamiento. En todos los casos se usó el procesador estadístico SPSS 11.5.

Resultados y discusión

La Tabla 3 muestra los resultados de los diferentes tratamientos sobre las variables micorrícicas. Estos valores mostraron claramente un número mayor de esporas cuando se aplicó la composición de la invención con respecto al control (sin fertilización química alguna) y al producto estándar.

Tabla 3: Efecto de los tratamientos sobre las variables micorrícicas estudiadas.

Tabla 3				
Tratamientos	Esporas/gramo de suelo	Colonización (%)	DV (%)	Glomalina (mg/g de suelo)
Control	42 b	12,3 b	0,12 b	1,8 b
Composición de la invención	156 a	65,3 a	3,25 a	9,27 a
Producto estándar	36 b	11,2 b	0,11 b	1,78 b
P	0,014**	0,04***	0,021**	0,017**
F	8,5	9,2	7,1	6,5
* Las diferentes letras en la misma columna son significativamente diferentes a $p < 0,05$				

- 5 Lo anterior puede deberse a una fuerte actividad colonizadora que haga difícil la colonización de las raíces por otra especie de hongos micorrícicos arbusculares. Por otra parte, muestra que la colonización micorrícica también fue más eficaz, reflejando la composición de la invención valores más altos que los de otros tratamientos.

Debería hacerse notar que las cepas nativas del suelo mostraron valores de colonización bajos. La observación de los valores de la densidad visual (variable que mide la intensidad de la colonización micorrícica) muestra que el porcentaje más elevado se obtuvo con la composición de la invención.

10 Otra variable destacable fue el contenido total de glicoproteínas, que era mayor con la composición de la invención. Este fenómeno reafirma una mayor simbiosis micorrícica cuando se aplica la composición de la invención y la posible influencia del inoculante en el incremento de la formación de agregados en el suelo. Además, los tratamientos en los que no se aplicó un inoculante micorrícico tuvieron valores bajos de esta variable, lo que puede ser atribuible a la baja efectividad de las micorrizas nativas.

15 La Tabla 4 muestra el contenido mineral foliar en cada tratamiento. Para el nitrógeno y el fósforo el contenido fue más alto cuando se aplicó la composición de la invención, mientras que el contenido en sodio fue mayor para la fertilización química.

Tabla 4: Nitrógeno, fósforo, potasio y total proteínico foliares.

Tabla 4				
Tratamientos	% N	% P	% K	Total proteínico (%)
Control	1,25 b	0,26 b	1,12	8,04 b
Composición de la invención	1,45 a	0,40 a	1,18	10,1 a
Producto estándar	1,41 a	0,36 a	1,23	9,89 a
P	0,001**	0,023**	1,23 ns	0,013*
F	7,2	5,6	8,8	6,5
* Las diferentes letras en la misma columna son significativamente diferentes a $p < 0,05$				

- 20 Debería hacerse notar que los valores documentados (López-Bellido, L. Cultivos herbáceos. Cereales. Ed. Mundi-Prensa, 1991. pp. 151-158) para esta variable (% de N foliar) están por encima del índice crítico de rendimientos del trigo entre 4 y 5 T/ha.

Resultados similares (Cornejo, P.; Borie, F.; Rubio, R. y Azcón, R. Influence of nitrogen source on the viability, functionality and persistence of *Glomus etunicatum* fungal propagules in an andisol. Applied Soil Ecology, 2007, vol. 35, nº 2, pp. 423-431; Echeverría, E. y Stiddert, G. A. El contenido de nitrógeno en la hoja bandera del trigo como predictivo del incremento de proteína en el grano por aplicaciones de nitrógeno en la espigazón). Revista de la Facultad de Agronomía, 1998, vol. 103, nº 1, p. 10) indican la presencia de este nutriente en el tejido de las hojas, debido al proceso de simbiosis micorrícica, que permite la absorción y el transporte de nutrientes a través de los micelios. El contenido de fósforo foliar no mostró diferencias significativas para ninguno de los tratamientos, lo que puede deberse al contenido de este elemento en el suelo (Tabla 4), que es absorbido por las plantas a partir de la solución en el suelo a través de su sistema de raíces; en este caso particular por la interacción tripartita vegetal-micorrícica arbuscular (simbiosis micorrícica) y suelo, lo que apunta a un valor más alto que el índice crítico foliar de este nutriente en el trigo *durum* (López-Bellido, L. Cultivos herbáceos. Cereales. Ed. Mundi-Prensa, 1991. pp. 151-158) e indica un buen desarrollo del cultivo. Este valor también tuvo una tendencia mayor cuando se aplicó la composición de la invención.

- 35 Otra variable que es relevante es el contenido proteínico foliar, que es mayor en el tratamiento con la composición de la invención (aun mayor que el tratamiento con fertilización química). Por último, el tratamiento de control tuvo un porcentaje significativamente menor.

Los resultados de producción y sus componentes (Tabla 4) reflejan claramente la respuesta del trigo *durum* a la aplicación de la composición de la invención y al producto estándar, ambos con altos contenidos de N.

Tabla 5: Efecto de los tratamientos sobre la producción y sus variables.

Tabla 5					
Tratamientos	Granos/espiga	Nº de espigas/m ²	Masa de 1000 granos (g)	Rendimiento (T/ha)	Incremento (%)
Control	25,00 b	576	29,0 b	3,25 b	----
Composición de la invención	33,00 a	641	33,4 a	5,22 a	8,8
Producto estándar	30,00 a	635	32,0 a	4,60 a	-----
P	0,02**	11,25 ns	0,015*	0,009**	
F	11,2	10,2	6,1	7,8	
* Las diferentes letras en la misma columna son significativamente diferentes a $p < 0,05$					

Los tratamientos con la composición de la invención y el producto estándar dieron los valores máximos en cada variable con respecto al control. Ello podría explicarse por la mayor eficacia del inoculante sólido y por la aplicación de altas dosis de nitrógeno.

Es bueno hacer notar que el cultivo de trigo asociado con la composición de la invención permitió lograr una respuesta productiva adecuada con indicadores aceptables de operación micorrízica, no solo para mejorar la actividad biológica del suelo, sino que promovió un incremento significativo en la producción del 8,8% en relación con el control y con el producto estándar.

Ejemplo 5. Efecto de la composición de la invención en el desarrollo del maíz (*Zea mays*)

Para demostrar la eficacia de la composición de la presente invención, que comprende el hongo micorrízico arbuscular (HMA) *Dominikia tenuihyphara*, depositado con el número de entrada MUCL 57072, sobre el maíz se realizó un ensayo en un campo cercano a la ciudad de Egea de los Caballeros. Se sometió a ensayo una forma microgranular de la composición de la invención. Se usó un producto estándar para comparar el efecto de ambos productos sobre el cultivo del maíz, var DKC 6717, Monsanto, sobre un suelo cambisol.

La siembra se realizó el 12 de abril y la cosecha tuvo lugar el 14 de diciembre de 2014, un total de 230 días. El tipo de siembra e inoculación usado fue mecánico y se aplicó a golpe de sembradora de cereales, y la composición microgranulada de la invención se aplicó a razón de 10 kg/ha junto con la semilla. La plantación usada fue de 0,7 m × 0,16 m para un total de 80 plantas por metro cuadrado. El sistema de pulverización usado fue de 18 × 18 m.

El diseño experimental fue de bloques aleatorios con tres repeticiones. Las parcelas experimentales fueron de 20 m de longitud × 20 m de anchura.

Se aplicaron los siguientes tratamientos:

– Composición de la invención: proporcionada a razón de 10 kg/ha y con fertilización química (Guerra, B. E. Micorriza arbuscular. Recurso microbiológico en la agricultura sostenible. Tecnología en Marcha, 2008, vol. 21, nº 1, pp. 191-201).

– Producto estándar: fertilización química (Guerra, B. E. Micorriza arbuscular. Recurso microbiológico en la agricultura sostenible. Tecnología en Marcha, 2008, vol. 21, nº 1, pp. 191-201): 325 kg/ha de nitrógeno, 80 kg/ha de fósforo y 200 kg/ha de potasio, con una aportación inicial de materia orgánica en forma de estiércol líquido a razón de 10 T/ha.

El suelo usado se clasificó como cambisol (IUSS Working Group. WRB. World reference base for soil resources 2006. World Soil Resources Reports. Roma: FAO, 2006). Para la catalogación química del suelo se usaron los siguientes procedimientos analíticos:

– pH: relación suelo-solución 1:2,5.

– Materia orgánica (MO): Walkley y Black.

– P₂O₅: Oniani.

– Cationes intercambiables: extracción con NH₄ AC a 1 mol/l a pH 7 y valoración complexométrica (Ca y Mg) y fotometría de llama (Na y K).

Estos procedimientos están descritos en el manual de técnicas analíticas para el análisis de suelos, foliares, de abonos orgánicos y fertilizantes químicos (Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas. Manual de técnicas analíticas para análisis de suelo, foliar, abonos orgánicos y fertilizantes químicos: La Habana. 1989).

Los resultados de las características químicas del suelo (Tabla 6) muestran una fertilidad entre media y alta, observándose un contenido medio de materia orgánica, lo que responde a lo descrito para este tipo de suelo (Hernández, A.; Morell, F.; Ascanio, M. O.; Borges, Y.; Morales, M. y Yong, A. Cambios globales de los suelos ferralíticos rojos lixiviados (nitisoles ródicos éutricos) de la provincia La Habana. Cultivos Tropicales, 2006, vol. 27. n° 2, pp. 41-50).

Tabla 6: Características químicas del suelo.

Tabla 6	
Materia orgánica (%)	2,51
pH	8,02
P ₂ O ₅	258,60
K (cmol/kg de suelo)	1,40
Ca (cmol/kg de suelo)	15,44
Mg (cmol/kg de suelo)	2,90
Na (cmol/kg de suelo)	0,30

La cepa fúngica de la invención de *Dominikia tenuihyphara* se aisló de un suelo salino; este hongo es tolerante a altas concentraciones de sal.

Las variables analizadas fueron: el porcentaje de colonización micorrícica mediante la técnica de tinción de las raíces (Phillips, J. M. y Hayman, D. S. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. Transfer. Britanic: Mycology Society, 1970, vol. 55, pp. 158-161) y el porcentaje de densidad visual (DV) mediante el procedimiento de intersecciones (Giovannetti, M. y Mosse, B. An evaluation of techniques to measure vesicular-arbuscular infection in roots. New Phytology, 1980, vol. 84, pp. 489-500). El contenido de nutrientes foliares (% de N, P y K) se determinó a través de los procedimientos descritos en el manual de laboratorio de técnicas analíticas (Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas. Manual de técnicas analíticas para análisis de suelo, foliar, abonos orgánicos y fertilizantes químicos: La Habana. 1989).

La producción se evaluó como sigue: se evaluaron el número de granos por espiga, el número de espigas por metro cuadrado, la masa por cada 1000 granos y el rendimiento agrícola (T/ha).

El procesamiento estadístico de los resultados experimentales se efectuó mediante análisis ANOVA unidireccional y se usó la prueba de Duncan (Duncan, D. B. Multiple range and multiple F tests. Biometrics, 1955, vol. 11, n° 1) cuando había diferencias entre medios de tratamiento. En todos los casos se usó el procesador estadístico SPSS 11.5.

Resultados y discusión

La Tabla 7 muestra los resultados de la evolución de la actividad micorrícica 45 y 120 días después de la siembra. Estos valores mostraron claramente una mayor actividad cuando se aplicó la composición de la invención, alcanzando no solo un mayor porcentaje de colonización micorrícica, sino también una mayor intensidad de colonización, reflejada por medio de una mayor densidad visual.

Tabla 7: Efecto de los tratamientos sobre las variables micorrícicas estudiadas.

Tabla 7				
	Colonización (%) a los 45 días	Colonización (%) a los 120 días	DV (%) a los 45 días	DV (%) a los 120 días
Composición de la invención	36,2 a	64,12 a	3,4 a	4,28 a
Producto estándar	10,1 b	11,36 b	0,3 b	0,85 b
P	0,011**	0,02***	0,01*	0,006*
F	7,2	8,2	8,1	9,4
* Las diferentes letras en la misma columna son significativamente diferentes a $p < 0,05$				

Este ensayo demostró que el inoculante más eficaz fue la composición de la invención, que reflejó valores más altos que los de otros tratamientos.

Los valores de la densidad visual (variable que mide la intensidad de la colonización micorrícica) muestran que el porcentaje más elevado también estuvo relacionado con la composición de la invención, estrechamente relacionado con la efectividad.

Se midió el contenido mineral foliar (Tabla 8). Los resultados no mostraron ninguna diferencia significativa entre la composición de la invención y el producto estándar. Sin embargo, hubo una tendencia hacia un mayor aporte nutricional, especialmente en el caso del contenido en nitrógeno en presencia de la *Dominikia tenuihyphara* (composición de la invención).

Tabla 8: Nitrógeno, fósforo, potasio foliares a los 120 días en el maíz.

Tabla 8			
Tratamientos	% N	%P	% K
Composición de la invención	1,48	0,41	1,81
Producto estándar	1,40	0,35	1,9
P	0,12 ns	0,1 ns	0,22 ns
F	8,5	8,2	7,9
* Las diferentes letras en la misma columna son significativamente diferentes a $p < 0,05$			

Debería hacerse notar que los valores de contenido en nitrógeno obtenidos con el tratamiento con la composición de la invención están por encima del índice crítico de rendimientos del trigo entre 4 y 5 T/ha (López-Bellido, L. Cultivos herbáceos. Cereales. Ed. Mundi-Prensa, 1991. pp. 151-158).

El contenido de fósforo foliar no mostró diferencias significativas para ninguno de los tratamientos, lo que puede deberse al contenido de este elemento en el suelo usado (Tabla 8). El fósforo es absorbido por las plantas a través de su sistema de raíces; en este caso particular por la interacción tripartita vegetal-micorrízica arbuscular (simbiosis micorrízica) y suelo. El contenido de fósforo foliar fue más alto que el índice crítico de este nutriente en el trigo *durum* (López-Bellido, L. Cultivos herbáceos. Cereales. Ed. Mundi-Prensa, 1991. pp. 151-158), lo que indica un buen desarrollo del cultivo. Sin embargo, este valor también tuvo una tendencia mayor en el tratamiento con la composición de la invención.

Resultados similares en el trigo y el maíz demuestran el efecto de la fertilización mineral sobre el porcentaje de longitud de raíces colonizadas cuando se aplicaron dosis bajas de fósforo. Esto apoya la importancia y la utilidad de la composición de la invención para que las plantas de maíz y trigo aumenten la absorción de fósforo del suelo ya sea en presencia o ausencia de nitrógeno y fósforo, lo que permite minimizar la dosis de fertilizante que deba aplicarse.

El contenido de potasio foliar fue similar para los tres tratamientos objeto de estudio, mostrando niveles satisfactorios para este cultivo, lo que coincide con las afirmaciones para cereales en cuanto a este macroelemento (López-Bellido, L. Cultivos herbáceos. Cereales. Ed. Mundi-Prensa, 1991. pp. 151-158). Además, se encuentran concentraciones elevadas de este elemento tanto en plantas micorrízicas como en las que no lo son (Bolleta, A. y Krugger, H. Fertilización e inoculación con hongos micorrízicos arbusculares en trigo. Buenos Aires: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. 2004. Saleque, M. A.; Timsina, J.; Panauallah, G. M.; Ishaque, M.; Pathan, D. J.; Saha, P. K.; Quayyum, M. A.; Humphreys, E. y Meisner, C. A. Nutrient uptake and apparent balances for rice-wheat sequences. II. Phosphorus. Journal of Plant Nutrition, 2006, vol. 29, n° 1, pp. 157-172), lo que puede ser debido al hecho de que este elemento se desplaza más fácilmente en la solución del suelo.

La siguiente tabla resume los resultados obtenidos (Tabla 9), que reflejan claramente la respuesta del maíz a la aplicación de la composición de la invención y al producto estándar.

Tabla 9. Efecto de los tratamientos en la producción y sus componentes en el cultivo.

Tabla 9			
Tratamientos	Rendimiento (kg/ha)	Humedad de los granos (%)	Incremento (%)
Composición de la invención	14700,2 a	22	9,18
Producto estándar	13500,3 b	20	-----
P	0,042**		
F	29,40		
* Las diferentes letras en la misma columna son significativamente diferentes a $p < 0,05$.			

Las plantas tratadas con la composición de la invención alcanzaron los valores máximos en comparación con el producto estándar, lo que podría explicarse por una mayor eficacia del inoculante sólido para establecer una simbiosis con la planta y, por tanto, una mejor asimilación de altas dosis de nitrógeno.

Por último, y en conclusión, es bueno señalar que el cultivo de maíz asociado con la composición de la invención permitió lograr una respuesta positiva de producción desde el punto de vista del rendimiento, alcanzando un incremento en la producción del 9,18% en comparación con la fertilización mineral. Los indicadores nutricionales también mostraron una tendencia mayor, y el uso del hongo micorrízico arbuscular de la invención no solo mejoró la actividad biológica del suelo, sino que promovió un incremento significativo en la producción en función de una gestión más sostenible.

Ejemplo 6. Efectividad del recubrimiento de la semilla de maíz con *Dominikia tenuihyphara* y una sustancia adhesiva sobre la actividad micorrízica

Objetivo: Averiguar la eficacia del recubrimiento de la semilla de maíz con *Dominikia tenuihyphara* y una sustancia adhesiva sobre la actividad micorrízica.

Para lograr este objetivo, se plantaron tres tiestos (cada uno considerado una repetición) con semillas de maíz recubiertas con *Dominikia tenuihyphara*, depositada con el número de entrada MUCL 57072, y una sustancia adhesiva.

Las semillas se plantaron el 8/3/2016, y los ensayos de colonización micorrícica se llevaron a cabo en la raíz usando la técnica de tinción de Phillips y Hayman, 1970, los días 21 y 35 después de la siembra.

Tabla 10. Porcentaje de colonización micorrícica (% CM) de las raíces a partir de semillas de maíz recubiertas con la combinación de *Dominikia tenuihyphara* y una sustancia adhesiva los días 21 y 35 tras la siembra (dts), respectivamente.

Tabla 10				
Fecha de evaluación	Tiesto 1 (% CM)	Tiesto 2 (% CM)	Tiesto 3 (% CM)	Promedio (X)
28/3/2016 (21 dts)	7	9	10	8,6
10/4/2016 (35 dts)	12	11	15	12,6

La Tabla 10 muestra que en cada una de las muestras analizadas hubo un porcentaje positivo de colonización micorrícica, que aumentó a medida que las plantas crecían. En esta fase, solo se detectaron puntos de colonización incipientes en el maíz, formados por la red de micelio extramático que precisamente empezaba a formarse.

Conclusiones:

- 10 El recubrimiento de la semilla de maíz con la concentración de inoculante que contiene *Dominikia tenuihyphara* y una sustancia adhesiva fue eficaz, porque generó estructuras micorrícicas en la raíz como micelio extramático en las primeras etapas de la planta. Se vieron esporas de la especie germinada y formaron una red de germinación y colonización interna.

También se muestran los valores de colonización dependientes de los momentos de crecimiento del maíz.

- 15 Ejemplo 7. Resultados obtenidos en el campo con la aplicación de la composición de la invención en forma microgranulada en el trigo y la cebada

En la Tabla 11, a continuación, se documentan los resultados obtenidos en el campo con la aplicación de la composición de la invención, que comprende *Dominikia tenuihyphara*, depositada con el número de entrada MUCL 57072, en forma microgranulada al trigo y la cebada.

Tabla 11					
Cultivo	Variedad	Riego	Tratados (kg·ha ⁻¹)	No tratados (kg·ha ⁻¹)	Mejora (%)
Cebada	volley	Cultivo de secano	2600	3000	15
Cebada	signora	Cultivo de regadío	7100	7700	8,5
Trigo	bonifacio	Cultivo de regadío	6350	7000	10,2
Trigo	badrá	Cultivo de regadío	4981	5463	9,7
Trigo	chambo	Cultivo de secano	3350	3700	10,4
Trigo	<i>durum</i>	Cultivo de secano	4300	4900	14
Trigo	<i>durum</i>	Cultivo de secano	4570	5110	11,8
Trigo	<i>durum</i>	Cultivo de regadío	6345	7135	12

- 20 Ejemplo 8. Resultados obtenidos en el campo con la aplicación de la composición de la invención en forma microgranulada en el maíz

En la Tabla 12, a continuación, se documentan los resultados obtenidos en el campo con la aplicación de la composición de la invención, que comprende *Dominikia tenuihyphara*, depositada con el número de entrada MUCL 57072, en forma microgranulada.

Tabla 12					
	Variedad-ciclo	Riego	No tratados (materia seca)	Tratados (materia seca)	MEJORA (kg/ha)
Zona 1	Lg 30369 - 365	Regadío	7,87	8,25	809,091
Zona 2	Lg 30369 - 365	Regadío	4,24	5,27	2408,655
Zona 3	Lg 30369 - 335	Regadío	4,85	5,26	963,080
Zona 4	Lg 30369 - 365	Regadío	6,84	7,89	2085,287
Zona 5	Maïsadour - 350	Regadío	7,40	8,09	1379,649

- 25 Ejemplo 9. Actividad micorrícica de la *Dominikia tenuihyphara* en el cultivo de arroz (*Oriza sativa*) en suelo anegado

Se llevó a cabo un experimento para definir la actividad micorrícica de la composición de la invención, que contiene *Dominikia tenuihyphara*, depositada con el número de entrada MUCL 57072, en forma concentrada, en condiciones de suelo salino anegado. La composición usada tenía una concentración de $1-4 \times 10^6$ propágulos/g de sustrato. Por el contrario, según algunas realizaciones, la concentración de la composición puede ser de $1-2 \times 10^4$, preferiblemente de $1,2-1,8 \times 10^4$ propágulos/g de sustrato.

Materiales y procedimientos

El experimento se realizó en la finca experimental “Tres Caminos”, propiedad de CEBAS-CSIC y situada en la zona de Matanza, municipio de Santomera (Murcia). Las plantas se cultivaron en un invernadero experimental tipo túnel monocapa con una superficie aproximada de 60 m², cubierto con policarbonato y ventana superior protegida con malla antitrips. Estaba dotado de un sistema de refrigeración y de un sistema de protección solar por pantallas aluminizadas.

- 5 El ensayo se realizó con plantas de arroz (*Oriza sativa*), variedad J 104, sometidas a dos tratamientos con inoculante micorrízico y el correspondiente control sin tratamiento micorrízico. El tratamiento micorrízico fue la composición de la invención, que contiene *Dominikia tenuihyphara*, depositada con el número de entrada MUCL 57072, en forma concentrada, a razón de una dosis de 1 kg/ha de recubrimiento de la semilla de arroz.

- 10 Cuando se aseguró la inoculación en brotes individuales, 15 días después de la germinación, las plantas se trasplantaron con una concentración de 10 plantas por cada canal de hormigón, de 2 m² de superficie, usando suelo salinizado gley nodular hidromorfo, según la clasificación de suelos de la UNESCO (Hernández, A; Pérez, J.M; Bosch, D; Rivero, L: Nueva versión de clasificación genética de los suelos de Cuba. Soil Institute. AGRINFOR, La Habana, 1999. 64p) como sustrato en ambos contenedores. En la Tabla 13 se muestran las principales características. Se realizó la labor de cultivo y se añadió una capa de agua a los 18 días de la siembra de las semillas en todos los
- 15 tratamientos.

Tabla 13. Algunas propiedades químicas y número de esporas·50 g de suelo⁻¹ del suelo salinizado gley nodular hidromorfo usado en el experimento.

Tabla 13								
M.O (%)	pH	P (cmol·kg ⁻¹)	Ca	Mg	K	Na	C.E (S·cm ⁻¹)	Nº de esporas·g de suelo ⁻¹
			cmol·kg ⁻¹					
2,3	7,5	13,2	10,2	5,6	0,9	2,2	2876	1,2

Características de la composición de la invención en forma concentrada

- 20 En el presente ejemplo, la composición inoculante micorrízica de la invención en forma concentrada contiene la hongo formador de micorizas arbusculares *Dominikia tenuihyphara*, depositado con el número de entrada MUCL 57072. La composición usada tenía una concentración de 1-4 × 10⁶ propágulos/g de sustrato.

Determinaciones realizadas

Se determinó la dinámica de crecimiento a los 90 días post trasplante (dpt), cuando se midieron la altura de la planta y la profundidad del sistema radicular, así como el rendimiento de la cosecha y algunas de sus componentes.

- 25 La acción micorrízica se determinó durante el desarrollo del cultivo realizando mediciones de porcentaje de colonización (%), densidad visual (%), micelio extramático arbuscular y endófitos arbusculares usando un microscopio estereoscópico (Zeiss, Alemania Occidental -5-) y un microscopio compuesto Axiostar (Zeiss, Alemania Occidental). Se calculó la relación entre el micelio externo arbuscular y el endófito (MEA:EA).

- 30 La evaluación micorrízica de las muestras se llevó a cabo usando la técnica de tinción de raíces (Phillips, D.M y Hayman, D.S. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. Trans. Br. Mycol. Soc. 55. 158-161. 1970) y la colonización porcentual se determinó mediante el procedimiento de intersecciones (Giovannetti, M. y Mosse, B. (1980): An evaluation of techniques to measure vesicular-arbuscular infection in roots. New Phytology, 84:489-500). El cálculo matemático de la densidad visual, de los endófitos arbusculares y de la actividad micorrízica se determinó según protocolos propuestos (Trouvelot, A., Kough, J. y Gianinazzi Pearson, V. (1986). Mesure du taux de mycorrhization VA d'un système racinaire. Recherche de méthodes d'estimation ayant une signification fonctionnelle. Proceedings of the 1st European Symposium on Mycorrhizae: Physiological and Genetical Aspects of Mycorrhizae, Dijón, 15 de julio de 1985. (ed. V. Gianinazzi Pearson y S. Gianinazzi). INRA, París. pp. 217 222; Herrera-Peraza, R. Eduardo Furrázola, Roberto L. Ferrer, Rigel Fernández Valle y Yamir Torres Arias. 2004. Functional strategies of root hairs and arbuscular mycorrhizae in an evergreen tropical forest, Sierra del Rosario, Cuba. Revista CENIC Ciencias Biológicas, Vol. 35, nº 2, 2004). También se determinaron las poblaciones totales de esporas·g de suelo⁻¹.
- 40

Análisis estadístico

- 45 El procesamiento estadístico de los resultados se realizó mediante análisis simple de la varianza de clasificación y se usó la prueba de Tukey cuando había diferencias significativas entre las medias, usando el programa Statgraphics® Plus, 4.1. Para el trazado de los gráficos (concretamente, las Figuras 1, 2 y 3), se usó el programa SigmaPlot 4.

Los valores porcentuales de la colonización micorrízica se transformaron usando la expresión 2arcsen√x.

Resultados y discusión

- 50 La Tabla 13, presentada anteriormente, muestra algunas de las propiedades químicas del suelo usado en el experimento. El suelo tenía un pH ligeramente alcalino, niveles medios de materia orgánica, P y valores Ca²⁺ del orden de 10 cmol·kg⁻¹. En cuanto a las características salinas, había un alto contenido de Na y conductividad eléctrica

elevada, indicando características fuertemente salinas, aunque la fertilidad era aceptable para el desarrollo de un cultivo de arroz.

El número de esporas halladas en este sustrato fue muy bajo, una característica de suelos agrícolas muy usados en los que la diversidad y la intensidad de los hongos micorrícicos arbusculares (HMA) son reducidas, dadas la labranza intensiva, la sobreexplotación y los procesos típicos de quimicalización y salinización, etc. (Rao, D.L.N., 1998. Biological amelioration of salt-affected soils. En: Microbial Interactions in Agriculture and Forestry, vol. 1. Science Publishers, Enfield, EE. UU., pp. 21-238)

El análisis de la dinámica de crecimiento de las plantas de arroz en estas condiciones mostró un comportamiento distinto con los tratamientos en las variables estudiadas. La altura de las plantas aumentó de manera sostenida, acelerando su crecimiento después del día 27 (Tabla 14).

Tabla 14. Altura (cm), profundidad (cm) del sistema radicular y colonización micorrícica (%CM) en plantas tratadas con *Dominikia tenuiphypha* (D.t) y plantas de control (C) durante 90 dpt en condiciones de suelo salino.

Tabla 14												
DPT	1	7	10	13	18	20	23	27	32	39	60	90
Altura												
D.t	10,5 b	10,5 b	10,9 b	12,4 b	13,0 b	17,1 a	17,0 a	19,8	23,8 a	32,8 a	63,5 a	74,1 a
C	11,1 a	11,2 a	12,2 a	14,4 a	15,6 a	15,6 b	16,7 b	18,9	20,7 b	25,7 b	58,6 b	68,1 b
Des. es.	0,2***	0,12***	0,1***	0,2***	0,3***	0,2***	0,4***	0,9 ns	0,1***	0,2***	0,6***	0,2***
PSR												
D.t	0	0,6	1,4 b	2,6	4,3	6,18	6,48	6,82	7,9 a	7,08	13,9 a	16,9 a
C	0	0,6	2,1 a	2,1	4,7	6,29	6,32	6,4	6,4 b	7,23	10,4 b	13,1 b
Des. es.	0,0 ns	0,3 ns	0,2***	0,6 ns	0,8 ns	0,3 ns	0,5 ns	0,4 ns	0,2***	0,3 ns	0,1***	0,2***
(% CM)												
D.t	2 a	6 a	13 a	14 a	14 a	17 a	18 a	24 a	35 a	38 a	38 a	41 a
C	0 b	3 b	3 b	6 b	10 b	12 b	13 b	15 b	20 b	21 b	19 b	22 b
Des. es.	0,3***	0,2**	0,13***	0,4***	0,6***	0,1***	0,2***	0,1***	0,2***	0,3***	0,2***	0,4***
Clave: PSR: Profundidad del sistema radicular, DPT: Días post tratamiento, Des. es.: Desviación estándar. Las letras iguales en la misma columna no difieren significativamente a $p \leq 0,05$.												

Ambos tratamientos muestran diferencias significativas durante la ganancia de altura. Los valores máximos se obtuvieron en el tratamiento de control hasta el día 18, después del cual hubo un cambio en el comportamiento, y los valores máximos para la altura de la planta se obtuvieron en el tratamiento inoculante con el eficiente hongo micorrícico arbuscular.

El análisis de la dinámica de crecimiento de las plantas de arroz en estas condiciones reveló un comportamiento distinto de las variables con el tratamiento. La altura de las plantas aumentó de manera sostenida, acelerando su crecimiento después del día 27.

Ambos tratamientos muestran diferencias significativas durante la ganancia de altura. Los valores máximos se obtuvieron en el tratamiento de control hasta el día 18, después del cual hubo un cambio en el comportamiento, y los valores máximos para la altura de la planta se obtuvieron en el tratamiento de inoculación con el eficiente hongo micorrícico arbuscular.

Se observó un comportamiento similar de la variable de altura en la profundidad del sistema radicular, que fue mayor en las plantas tratadas que en las de control a partir de los 32 dpt. En este caso, el comportamiento se acentuó, porque esta es la parte de la planta en la que se establece el hongo.

El estudio de la colonización micorrícica mostró un comportamiento distinto del encontrado en las variables previamente analizadas. En este caso, y en ambos tratamientos, la colonización fue progresiva y siempre alcanzó los valores más altos en el tratamiento inoculado con respecto al tratamiento de control, el cual, aunque no fue inoculado, mostró niveles naturales de colonización micorrícica, resultado típico en experimentos realizados en condiciones naturales.

El desarrollo fue muy marcado en el caso del tratamiento inoculado con HMA, alcanzando valores elevados si se tiene en cuenta que el experimento se realizó en condiciones anegadas o con una capa de agua después de 20 días. Al final del cultivo, la colonización de las raíces alcanzó un valor del 44%, que se considera elevado en comparación con otros estudios de micorrizas en el arroz, en donde los máximos de colonización no superan el 25% con inoculación en una base sólida (Fernández, F.; Ortiz, R.; Martínez, M.A.; Costales, A.; Llonín, D. The effect of commercial arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) inoculants on rice (*Oryza sativa*) in different types of soils. Cultivos Tropicales 18(1): 5-9, 1997).

La Figura 1 muestra el desarrollo de dos variables fúngicas muy importantes en la actividad micorrícica en el tratamiento con el inoculante con la composición de la invención en forma concentrada: la población de esporas y la ocupación fúngica, expresada por medio del porcentaje de densidad visual, que no es otra cosa que la intensidad con la cual el micelio coloniza el interior de la raíz.

- 5 La densidad visual mostró un comportamiento microbiano típico con una fase de latencia muy definido en la que el hongo colonizó lentamente el interior de la raíz entre los días 0 y 20 y subsiguientemente mostró un crecimiento exponencial hasta el día 40, momento en el que alcanzó la fase estacionaria y el fin del cultivo.

- 10 En el caso de la población de esporas, en los primeros días se detectaron los valores en el suelo, derivados de la inoculación (hasta 15 días en los tallos), que, a continuación, desaparecieron gradualmente con el tiempo, producto de la germinación en condiciones favorables de humedad y alta temperatura hasta que cayó su población en el suelo. Después de 30 días comenzó la producción de nuevas esporas, derivada del desarrollo de la biomasa fúngica externa y del desarrollo de la simbiosis con la planta. En este caso, la población siguió creciendo hasta valores próximos a 12 esporas·g⁻¹ de suelo.

- 15 El análisis del micelio externo arbuscular y de las variables endófitas arbusculares (Fig. 2) es muy interesante, ya que muestra cómo se producen los comportamientos internos y externos del simbionte micorrícico a medida que se desarrolla la simbiosis en los ciclos anuales de cultivo.

- 20 En este caso se observaron valores elevados de micelio externo durante las primeras fases de desarrollo de la simbiosis, causados por el crecimiento fúngico a expensas del de la planta, expresado tras unos años (Bethlenfalvay, G.J., Brown, M.S., Franson, R.L., Mihara, K.L., 1989. The glycine-glomus-bradyrhizobium symbiosis. IX. Nutritional, morphological and physiological response of nodulated soybean to geographic isolates of the mycorrhizal fungus of *Glomus mosseae*. *Physiol. Plant.* 76, 226-232) como un franco proceso parasitario, derivado del crecimiento exuberante del micelio en las fases tempranas de la colonización micorrícica en plantas (horas) con una fase fotosintética baja y un alto coste metabólico. El desarrollo de los endófitos arbusculares sigue la tendencia opuesta. Hubo muy pocos valores bajos durante los primeros días, no logrando un crecimiento significativo hasta después de los 25 días de crecimiento, fase que se considera que es transitoria en la simbiosis micorrícica arbuscular.

Después de 30 días hay una reducción y una estabilización del micelio externo y un aumento gradual del endófito relacionados con el crecimiento de la planta y el desarrollo de la simbiosis.

- 30 La Figura 3 muestra la relación establecida entre los componentes micorrícicos en el cultivo de arroz (la relación entre el micelio externo arbuscular y el micelio endófito (MEA:EA)). Esta correspondencia entre los dos componentes principales de la simbiosis —el micelio externo y el endófito— expresa la actividad de esta asociación, que atraviesa diferentes fases de desarrollo (Hirrel, M.C., 1981. The effect of sodium and chloride salts on the germination of *Gigaspora margarita*. *Mycology* 43, 610-617).

- 35 Una fase inicial en la que hay valores elevados de micelio externo en correspondencia con valores muy bajos de endófitos, lo que propicia un franco parasitismo, expresado no solo por estas variables, sino también en una reducción del crecimiento de la planta en comparación con el control no inoculado o ineficientemente micorrizado, que no causa cambios sustanciales en el desarrollo de la planta (Tabla 2). Una fase intermedia o transitoria en la que ambas partes empiezan a equilibrarse, y una fase de intercambio mutualista, cuando los componentes se equilibran con un valor de 1 o aún menor, para que haya un notable incremento dentro de la raíz que garantice el debido intercambio de nutrientes al nivel de los arbusculos dentro de las células.

- 40 Para este cultivo en particular, pueden definirse claramente dos fases: una inicial de transición, de hasta 20-25 días y una fase mutualista después de este tiempo. En paralelo con esto, un análisis de la altura de la planta muestra un despegue en el crecimiento de la planta con respecto al control no inoculado tras los 27 días de la siembra, lo que coincide con la fase mutualista de la simbiosis micorrícica en estas condiciones de salinidad. Este efecto se puede mostrar subsiguientemente en el análisis de la producción y de sus componentes (Tabla 15).

- 45 Tabla 15. Número de panículas por planta (n), peso de las panículas (g), peso de 100 granos (g) y rendimiento (g. planta⁻¹) en plantas de arroz tratadas con *Dominikia tenuihyphara* (D.t) y en plantas de control no tratadas (C) en suelo salino.

Tabla 15				
Tratamientos	NPP	PP	P 100 g	R
D.t	8,33 a	2,70 a	3,69 a	21,66 a
C	5,40 b	1,87 b	2,70 b	15,40 b
Des. es.	0,12***	0,05***	0,001***	1,34***
C.V (%)	11,2	9,2	6,5	14,6
Clave: NPP: Número de panículas por planta (n), PP: Peso de las panículas (g), P 100 g: Peso de 100 granos (g), R: rendimiento (g·planta ⁻¹), Des. es.: Desviación estándar. Las letras iguales en la misma columna no difieren significativamente a p ≤ 0,05.				

Hubo un aumento en todas las componentes de la producción medidas en las plantas tratadas con *Dominikia tenuihyphara* en comparación con las plantas de control no inoculadas. Esto fue particularmente interesante en las condiciones de salinidad del trabajo.

- 5 A modo de conclusión, el uso de esta cepa de hongo micorrízico fue eficaz para estas condiciones de suelo. Esto es muy interesante como alternativa viable y sostenible para las condiciones adversas causadas por el estrés salino.

REIVINDICACIONES

1. La cepa *Dominikia tenuihyphara*, depositada con el número de entrada MUCL 57072.
2. Una composición que comprende la cepa *Dominikia tenuihyphara*, depositada con el número de entrada MUCL 57072, estando la concentración de la *Dominikia tenuihyphara* en dicha composición entre el 4,0% y el 1,0% en peso.
- 5 3. La composición según la reivindicación 2, estando la concentración de la *Dominikia tenuihyphara* en dicha composición entre el 3,0% y el 2,0% en peso, preferiblemente entre el 2,5% y el 2,3% en peso.
4. La composición según la reivindicación 2 en donde dicha composición es una composición sólida.
5. La composición según la reivindicación 4 en donde dicha composición está en forma de polvo, concentrado emulsionable, gránulos o microgránulos.
- 10 6. La composición según la reivindicación 5 en donde dicha composición está en forma de microgránulos.
7. La composición según la reivindicación 6 en donde dichos microgránulos tienen un tamaño que oscila entre 500 μm y 2000 μm , preferiblemente entre 800 μm y 1500 μm , más preferiblemente entre 900 μm y 1200 μm .
8. La composición según cualquier reivindicación 2 a 7 que, además, comprende al menos un fungicida y/o al menos un bio-fungicida y/o al menos un insecticida y/o al menos un bio-insecticida y/o al menos un nematocida y/o al menos un bio-estimulante.
- 15 9. Un proceso para la preparación de una composición que comprende la cepa *Dominikia tenuihyphara*, depositada con el número de entrada MUCL 57072, que comprende las siguientes etapas:
 - a. proporcionar un sustrato;
 - 20 b. dotar a dicho sustrato de las semillas de una planta anfitriona y de la cepa *Dominikia tenuihyphara*, depositada con el número de entrada MUCL 57072;
 - c. cultivar dicha planta anfitriona y regar para mantener dicho sustrato con un nivel de humedad de al menos un 75% de la capacidad de campo;
 - 25 d. suspender dicho riego durante un periodo de al menos 7 días;
 - e. retirar el sustrato y la parte aérea de dicha planta anfitriona;
 - 30 f. secar el sustrato retirado;
 - g. triturar el sustrato seco para obtener gránulos que tengan un tamaño de partícula por debajo de 100 μm .
10. El proceso según la reivindicación 9 en donde dicha cepa *Dominikia tenuihyphara* de la etapa b. es un inóculo que comprende propágulos de la cepa *Dominikia tenuihyphara*.
- 35 11. El proceso según la reivindicación 9 o 10 que, además, comprende una etapa h1. de microgranulación.
12. El proceso según la reivindicación 9 o 10 que, además, comprende una etapa h2. de preparación de un inoculante biológico concentrado para el recubrimiento de semillas de cereales.
13. El proceso según la reivindicación 12 en donde dicha etapa h2. de preparación de un inoculante biológico concentrado para el recubrimiento de semillas de cereales se lleva a cabo tamizando el producto triturado obtenido en la etapa g. para seleccionar los gránulos que tienen un tamaño de partícula por encima de un valor predeterminado.
- 40 14. El proceso según la reivindicación 12 que, además, comprende una etapa i. de recubrimiento de semillas.
15. El proceso según la reivindicación 14 en donde dicha etapa i. de recubrimiento de semillas comprende las etapas:
 - i1. Cubrir las semillas con una sustancia adhesiva;
 - 45 i2. Añadir dicho inoculante biológico concentrado;
 - i3. Opcionalmente, proporcionar uno o más tratamientos compatibles seleccionados entre:
 - i3.1 Tratamientos con fungicidas, insecticidas y/o herbicidas, compatibles con hongos formadores de micorrizas,
 - 50 i3.2 Tratamiento con microorganismos beneficiosos,

i3.3 Tratamiento con macro y/o micronutrientes,

i3.4 Tratamiento con estimulantes,

5 i3.5 Tratamiento con pigmentos colorantes compatibles con hongos micorrícicos;

i4. Secar las semillas.

16. El uso de una composición que comprende la cepa *Dominikia tenuihyphara*, depositada con el número de entrada MUCL 57072, como bio-estimulante en plantas.

10 17. El uso de una composición que comprende la cepa *Dominikia tenuihyphara*, depositada con el número de entrada MUCL 57072, como bio-nematicida en plantas.

18. El uso según la reivindicación 16 o 17 en donde dichas plantas son cereales.

19. La composición según la reivindicación 2 caracterizada por ser proporcionada mediante recubrimiento de semillas o junto con las semillas en el momento de la siembra.

20. Una semilla de cereal recubierta con una composición según la reivindicación 2.