

DESCRIPCIÓN

Cepa de *Dominikia sp.*, composiciones que la comprenden y usos

5 Campo de la invención

La presente invención está relacionada con el campo de la agronomía. Específicamente, versa sobre una cepa de *Dominikia sp.*, composiciones que la comprenden y usos de dichas
10 composiciones, tales como el uso como bioestimulante y bionematicida. Se ha descubierto que las composiciones que comprenden una cepa de *Dominikia sp.* son particularmente útiles en cultivos de cereales.

15 Técnica antecedente

En la actualidad, se describen aproximadamente 300 especies en 30 géneros entre los hongos Glomeromycota. Sin embargo, los estudios de biodiversidad basados en ácidos nucleicos
20 (ADN, ARN) apuntan hacia una diversidad mucho mayor en los Glomeromycota y recientemente se han descrito varias especies y géneros nuevos.

La mayoría de los Glomeromycota son hongos micorrícicos
25 arbusculares (AMF) que son simbioses mutualistas de aproximadamente el 80% de todas las plantas terrestres vasculares. La absorción de nutrientes de las plantas colonizadas por AMF ocurre directamente a través de la epidermis de la raíz y los pelos de la raíz, pero también a
30 través de la superficie de contacto hongo-raíz que tiene la forma característica de arbusculos o espirales hifales

intrarradicales. Además de su papel en la potenciación de la absorción de nutrientes en su anfitriona, los AMF desempeñan un papel importante en la agregación del suelo y en la protección de las plantas contra el estrés por sequía y los patógenos de plantas nacidos en el suelo. Debido a esta naturaleza sumamente beneficiosa, se conocen varias composiciones de micorrizas en la técnica, y han sido desarrolladas para proporcionar efectos beneficiosos en los cultivos a los que se las proporciona.

10

Los documentos W02015/000612 y W02015/000613 dan a conocer composiciones que comprenden la cepa *Glomus iranicum* var. *tenuihypharum* var. nov. y sus usos.

15 En particular, el documento W02015/000612 da a conocer una composición que comprende la cepa *Glomus iranicum* var. *tenuihypharum* var. nov. y arcillas de esmectita 2:1. Se da a conocer la composición del documento W02015/000612 para proporcionar un impacto positivo en la producción del cultivo; es decir, puede ser usada como bioestimulante en cultivos de lechuga.

De manera similar, el documento W02015/000613 da a conocer una composición que comprende la cepa *Glomus iranicum* var. *tenuihypharum* var. nov. y arcillas de esmectita 2:1., iones metálicos y quitina. El documento W02015/000613 da a conocer que dicha composición actúa como bionematicida en cultivos de tomate.

30 Sin embargo, las composiciones dadas a conocer en la técnica anterior no proporcionan un impacto positivo aceptable en

cultivos de cereales, en términos de efecto tanto bioestimulante como bionematicida.

Compendio de la invención

5

Un objetivo de la presente invención es, así, proporcionar una cepa de hongo que es adecuada para ser incluida en composiciones; concretamente en composiciones adecuadas para proporcionar un impacto positivo en cultivos, en particular
10 en cultivos de cereales.

Otro objetivo de la invención es proporcionar una composición que es efectiva como bioestimulante en cultivos de cereales.

15 Otro objetivo adicional de la presente invención es proporcionar una composición que es efectiva como bionematicida en cultivos de cereales.

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

Descripción detallada

25 Un objeto de la presente invención es, así, una cepa de Glomeromycota, concretamente una cepa de *Dominikia sp.*, depositada con el número de acceso MUCL 57072.

La cepa de la invención fue aislada de un tipo de suelo
30 salino sódico muy hidromórfico, altamente compactado

(gleysol de solonetz) con mucho depósito de sal en la superficie, en la localidad de Fortuna, Murcia (España).

La cepa de *Dominikia sp.* de la invención fue depositada el
5 21/03/2018 en la Autoridad Depositaria Internacional de las
Colecciones Coordinadas Belgas de Microorganismos (BCCM),
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
10 dirección Campus de Espinardo, 7, edificio CEEIM, 30100
Murcia, España.

La cepa de *Dominikia sp.* de la invención ha sido identificada
por el depositante con la referencia SMB01, y recibió el
15 número de depósito MUCL 57072 de la autoridad depositaria
internacional.

Los esporocarpios de la cepa de la invención se desconocen.
En la cepa de la invención, las esporas se presentan en
20 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 subglobulosa y globulosa (rara vez
irregularmente), relativamente pequeñas, concretamente entre
25 24,0 y 42 μm de diámetro, con un valor medio de $30,7 \pm 3,7$
 μm en diámetro. Las esporas presentan una pared compuesta
esporal de tres capas (1-4 μm de grosor). En particular,
pueden reconocerse una capa externa, una capa intermedia y
una capa interna.

La capa externa de la pared de la espora es sustancialmente mucilagínosa y evanescente, dando así a las esporas un aspecto basto, mientras que las esporas más viejas presentan un aspecto algo enmarañado. La capa externa 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 de la pared de la espora es sustancialmente permanente, y tiene 0,5 - 2,0 μm de grosor.

10

La capa interna 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 gutulado. 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 de diámetro (con un valor medio de 3,0 μm) Las hifas tienen una forma entre cilíndrica y ligeramente en embudo que se fusiona con las capas alveolares de la pared de la espora, al menos en las esporas maduras. La estructura de germinación comprende un tubo germinal que crece y se desarrolla hacia atrás a través de la unión de la hifa con las esporas. Forma micorrizas arbusculares vesiculares.

20

El micelio extrarradical forma una extensa red.

25

El solicitante realizó un análisis filogenético de 134 secuencias de ADNr 18S, incluyendo las secuencias ambientales y referenciadas. No hay disponible ninguna secuencia o secuencias parciales breves de 18S de la mayoría de las especies de *Dominikia*. En este análisis filogenético pueden incluirse secuencias de *Dominikia indica* y de *D. iranica*.

30

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 muy incompleta. Usando las secuencias de longitud máxima podían generarse árboles con ramas que representaban los niveles taxonómicos más altos. Sin embargo, no pudo generarse con este conjunto de datos un clado robusto monofilético consistente en secuencias de *Dominikia spp.* La *Dominikia sp.* forma un clado bien soportado junto con *Dominikia iranica* y secuencias glomeraleanas ambientales anónimas procedentes 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 descritas de *Dominikia* indica que *Dominikia sp.* 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 grupos entre sueltos y compactos. La pared esporal de los miembros del género *Dominikia* consiste en dos o tres capas. La capa externa, que forma la superficie de la espora, es mucilagínosa, de corta duración 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 una forma entre cilíndrica y ligeramente en embudo con un poro que puede estar abierto u ocluido por un tabique. Se designó como especie tipo a la *Dominikia minuta* (basónimo: *Glomus minutum*). La cepa de la invención, es decir, *Dominikia sp.*, tiene esporas hialinas

sustancialmente del mismo tamaño que las de *Dominikia minuta*, pero, a diferencia de *Dominikia sp.*, el poro de *G. minutum* (es decir, *Dominikia minuta*) está ocluido por un tabique. *Dominika sp.* también difiere de *Dominikia minuta* por su pared
5 esporal de tres capas, a diferencia de la pared esporal de dos capas en *D. minuta*, y debido a la presencia de la reacción dextrinoide, que está ausente en *Dominikia minuta*.

Dominikia sp. también difiere de las otras especies y cepas
10 descritas de *Dominikia*. La capa externa y la capa interna de las esporas de *Dominikia achra* se tiñen profundamente en el reactivo de Melzer, mientras que en *Dominikia sp.* solo muestra la capa externa una reacción dextrinoide. *Dominikia indica* difiere de *Dominikia sp.* por formar esporas hialinas
15 pequeñas en agregados hipogeos. La pared esporal de *D. indica* consiste en dos capas hialinas: una capa externa delgada, mucilaginoso y de corta duración que se tiñe entre rosácea y rosa en el reactivo de Melzer y una capa interna laminada, lisa, permanente y más gruesa, a diferencia de las tres capas
20 en *Dominikia sp.*

Según la filogenia de 18S-ITS1, *Dominikia aurea* es el pariente más cercano de la cepa de *Dominikia sp.* de la invención. Las dos especies difieren en muchas
25 características morfológicas (véase la Tabla 1), siendo la diferencia más evidente las esporas mayormente ovoides de *Dominikia aurea*, que se agregan en esporocarpios irregulares.

Tabla 1		
	<i>Dominikia aurea</i> (Oehl et al. 2003)	<i>Dominikia sp.</i>
agregación de esporas	esporocarpios irregulares sin peridio	racimos sueltos
esporas intrarradicales	no descritas	presentes
esporas intercalares	no descritas	presentes
color	anaranjado claro a anaranjado	ocráceo
forma	ovoide, raramente globulosa	globulosa a subglobulosa
tamaño	esporas ovoides: (36-)55 - 65 x (30)45-52 µm esporas globulosas: (27-) 40-60 µm	(24,0) 30,7 ± 3,7 (42) µm
pared esporal	de dos capas	de tres capas
capa más externa	evanescente, hialina de hasta 1,5 µm, deteriorada en las esporas maduras, dextrinoide	mucilaginoso, basta, hialina (0,4-) 1,0 (1,5) µm, deteriorada en las esporas maduras, dextrinoide
capa intermedia		permanente, ligeramente basta 0,5 - 2,0 µm de grosor
capa más interna	laminada, anaranjada clara, 1,5-3 (-4) µm	laminada, lisa (0,5-1,5 µm)
hifas subyacentes	anaranjadas claras a anaranjadas, rectas o curvadas, de forma cilíndrica o ligeramente en embudo; 6 -10 µm	hialinas a ocráceas pálidas, rectas u onduladas 2,5 - 5 µm
germinación	Desconocido	a través de las hifas subyacentes

Se pudieron hallar muchas secuencias muy similares a las secuencias de la *Dominikia sp.* de la invención cuando fueron

comparadas mediante el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, Herramienta básica de búsqueda de alineamiento local) con el banco de genes (valor e 0,00, identidad 99%). Estas secuencias se dan en una amplia gama de anfitriones
5 diferentes (por ejemplo, hepáticas de las fuentes, monocotiledóneas) de diferentes países y continentes, lo que indica una distribución mundial. Estos hallazgos indican que *Dominikia sp.* está distribuida de forma generalizada.

10 Según se ha mencionado anteriormente, se descubrió que es particularmente útil que la *Dominikia sp.* sea incluida en composiciones, en particular composiciones que hayan de ser proporcionadas a cultivos de cereales.

15 Otro objeto de la invención es una composición que comprende *Dominikia sp.*, depositada el 21/03/2018 con el número de acceso MUCL 57072, según se ha mencionado anteriormente.

Sin entrar en una explicación específica, se ha observado
20 con sorpresa que *Dominikia sp.* y una composición que la comprende son particularmente efectivas para proporcionar efectos beneficiosos para los cultivos, en particular a los cultivos de cereales.

25 En particular, se ha observado que, proporcionando una composición que comprende *Dominikia sp.* a un cultivo, por ejemplo, a un cultivo de cereales (por ejemplo, un cultivo de maíz, un cultivo de trigo, un cultivo de cebada o un cultivo de arroz), puede obtenerse un aumento en la absorción
30 de nutrientes y una mejora en la producción del cultivo de

cereal con respecto a los cultivos a los que no se proporcionó *Dominikia sp.*

Preferiblemente, la concentración de *Dominikia sp.* en la
5 composición se encuentra entre un 4,0% y un 1,0% en peso,
mas preferiblemente entre un 3,0% y un 2,0% en peso, aún más
preferiblemente entre un 2,5% y un 2,3% en peso.

Dependiendo de la realización, la composición de la invención
10 es una composición líquida, sólida o en gel.

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

15 Dependiendo de la realización, la composición de la invención
puede estar en forma de polvo, concentrado emulsionable,
gránulos o microgránulos.

La composición de la invención es una composición sólida, y
20 la concentración de los propágulos de *Dominikia sp.* 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)), de 180 a 120 propágulos por
gramo de composición, preferiblemente de 150 a 120 propágulos
25 por gramo de composición, más preferiblemente de 125 a 120
propágulos por gramo de composición.

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

Según una realización preferida, la composición de la invención tiene la forma de microgránulos.

Dependiendo de la realización, dichos microgránulos tienen
5 un tamaño que oscila de 500 μm a 2000 μm , preferiblemente de 800 μm a 1500 μm , más preferiblemente de 900 μm a 1200 μm .

Ventajosamente, la concentración de *Dominikia sp.* en la composición de la invención, así como la forma de
10 presentación de la composición –por ejemplo, microgránulos–, puede seleccionarse según la aplicación final predeterminada.

Dependiendo de la realización, la composición de la invención
15 comprende, además, al menos un fungicida y/o al menos un biofungicida y/o al menos un insecticida y/o al menos un bioinsecticida y/o al menos un nematocida y/o al menos un bioestimulante.

20 Según una realización preferida, la composición de la invención está en forma de un recubrimiento de semillas.

Por ejemplo, dicho fungicida se selecciona del grupo constituido por Maneb, Mancozeb, Metalaxyl-Ridomil,
25 Miclobutanil, Olpisan, Propamocarb, quintoceno, estreptomicina, azufre, metil-tiofanato, Thiram, triforina, vinclozolina, blanco de cinc, Zineb, Ziram, Banrot, cobre fijado, clorotalonilo, captano, Cloroneb, Cyproconazol, cinc etileno, bisditiocarbamato, etridiazol, Fenaminosulf,
30 fenarimol, Flutolanil, folpet, Fosetyl-Al e iprodiona.

Son biofungicidas ejemplares: *Trichoderma* sp, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Streptomyces* sp, *Coniothyrium minitans* y *Pythium oligandrum*.

5

Dependiendo de la realización, el insecticida se selecciona del grupo constituido por organofosfatos, carbamatos y neonicotinoides.

10 Dependiendo de la realización, dicho bioinsecticida es seleccionado del grupo constituido por *Bacillus* sp., *Chromobacterium* sp., *Beauveria* sp. y *Metarhizium* sp.

Dependiendo de la realización, dicho nematocida es organofosfato o carbamato.

15

Dependiendo de la realización, dicho bionematicida es *Pasteuria* sp.

Otro objeto de la presente invención es un proceso para la
20 producción de una composición que comprende la cepa de *Dominikia* sp. 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 de *Dominikia* sp., depositada con el número de acceso MUCL 57072;

30

c. cultivar y regar dicha planta anfitriona para mantener dicho sustrato con un nivel de humedad de al menos un 75% de la capacidad del terreno;

d. interrumpir dicho riego durante un periodo de al menos 7 días;

e. eliminar la parte aérea de dicha planta anfitriona y el sustrato;

5 f. secar el sustrato retirado;

g. moler el sustrato secado para obtener gránulos que tengan un tamaño de partícula por debajo de 100 μm .

Preferiblemente, el sustrato comprende una arcilla.

10

Dependiendo de la realización, la *Dominikia sp.* proporcionada en la etapa b. es un inóculo que comprende propágulos de *Dominikia sp.* Preferiblemente, dicho inóculo es obtenido dotando al sistema radicular de una planta anfitriona de una *Dominikia sp.* sustancialmente pura, cultivando dicha planta anfitriona sobre un sustrato que, preferiblemente, comprenda una arcilla (preferiblemente, una arcilla de esmectita estéril), preferiblemente para el ciclo vital de la planta anfitriona, y extrayendo posteriormente el sistema radicular, para obtener un inóculo. En este caso, el inóculo comprende una cantidad del sustrato, raicillas y propágulos de *Dominikia sp.*

15

20

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

25

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

30

Según 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 .

5

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 molido obtenido según la etapa g. Cabe señalar que, en este contexto, la etapa h2. del inoculante biológico concentrado para el recubrimiento de semillas de cereales se concibe como una etapa en la que aumenta la concentración de *Dominikia sp.* (por ejemplo, los propágulos de *Dominikia sp.*) en la composición.

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

Ventajosamente, la etapa de concentración h2. permite aumentar la concentración de *Dominikia sp.* (por ejemplo, los propágulos de *Dominikia sp.*) hasta 10 veces la concentración inicial, preferiblemente hasta 50 veces la concentración inicial (es decir, la concentración de *Dominikia sp.* 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.

Dependiendo de la realización, es posible aumentar la
5 concentración de *Dominikia sp.* (por ejemplo, los propágulos de *Dominikia sp.*) más de 100 veces la concentración inicial (es decir, la concentración de *Dominikia sp.* en el producto antes de la etapa h2).

10 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.

15 Dicha etapa i. de recubrimiento de semillas comprende las siguientes etapas:

- i1. cubrir las semillas con una sustancia adhesiva;
- i2. añadir el inoculante biológico concentrado;
- 20 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,
 - i3.5. tratamiento con pigmentos colorantes compatibles con hongos micorrícicos;
- 30 i4. secar las semillas.

Otro objeto de la presente invención es el uso de una composición que comprende *Dominikia sp.*, depositada con el número de acceso MUCL 57072, como bioestimulante.

5 Según se usa en la presente memoria, el término "bioestimulación" se refiere a la estimulación ejercida por una composición según la invención en plantas a las que se dota de dicha composición.

10 Sin entrar en una explicación científica específica, puede emitirse la hipótesis de que la cepa de *Dominikia sp.* 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
15 nutrientes de su red de micelio y posteriormente los intercambia en las células de la raíz.

Según una realización preferida, la composición de la presente invención es usada como bioestimulante en cereales.

20 Otro objeto de la presente invención es el uso de una composición que comprende *Dominikia sp.*, depositada con el número de acceso MUCL 57072, como bionematicida.

En otras palabras, la composición de la presente invención
25 puede ser usada para proteger a las plantas de los nematodos. Según una realización preferida, la composición de la presente invención es usada como bionematicida en cereales. Ventajosamente, la composición de la invención puede ser proporcionada a plantas, es decir, a un cultivo –por ejemplo
30 a un cultivo de cereales– de varias maneras.

Dependiendo de la realización, la composición de la invención puede ser aplicada a la planta mediante un tratamiento de las semillas (es decir, un recubrimiento de las semillas), un tratamiento de las raíces, raíces metidas en una emulsión, 5 adición al agua de riego, aplicación de polvo al sistema radicular o aplicación de una emulsión inyectada en el sistema radicular.

Preferiblemente, en particular cuando tenga que ser 10 proporcionada a cereales, la composición de la invención es proporcionada por recubrimiento de semillas o en conjunción con las semillas en el momento de la siembra, o en forma de microgranulado y en conjunción con las semillas en el momento de la siembra.

15

Breve descripción de las Figuras

- Figura 1: Dinámica de producción de esporas y ocupación fúngica, expresada a través de la densidad visual (%), 20 en plantas tratadas con *Dominikia sp.*.
- Figura 2: Comportamiento del micelio externo arbuscular y del endófito arbuscular en el tratamiento con *Dominikia sp.*.
- Figura 3: Relación entre el micelio externo arbuscular 25 y el endófito arbuscular en el tratamiento con *Dominikia sp.*

Sección experimental

30 Ejemplo 1. Análisis moleculares

Extracción de ADN

Se transfirieron hifas y esporas aisladas a tubos Eppendorf de 1,5 mL con 0,2 g de perlas de vidrio (2 mm de diámetro) y 100 µL de tampón CTAB (CTAB = bromuro de hexadeciltrimetilamonio, al 2%, 1,4 M de NaCl, 0,1 M de Tris-HCl pH 7,5, 0,2 M de Na-EDTA). Esta mezcla fue homogeneizada usando un molino de bolas Retsch MM301 a 50 Hz durante 30 segundos. Se añadieron otros 400 µL de tampón CTAB y la mezcla fue incubada a 65°C durante una hora. Se añadieron a la suspensión 400 µL de cloroformo-alcohol isoamílico (24 : 1) y se mezclaron invirtiendo los tubos de reacción y, posteriormente, se centrifugó durante 5 minutos a 15000 × g, y la capa superior fue recuperada al interior de un tubo Eppendorf limpio. Esta etapa fue repetida dos veces. A esta suspensión se añadieron 200 µL de acetato amónico 5 M; esta mezcla fue incubada a 4°C durante al menos 30 minutos seguidos por una centrifugación durante 20 minutos a 4°C y 15000 × g. Se precipitó ADN con 700 µL de isopropanol a -20°C de un día para otro. El sedimento de ADN obtenido después de la precipitación por isopropanol se lavó con etanol helado al 70%, se secó al aire y fue redissuelto en 50 µL de tampón TE (10 mM de Tris, 10 mM de EDTA, pH 8) + 4,5 U de 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 por PCR y para la secuenciación de la región espaciadora interna transcrita por el 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 dNTP 0,2 mM, 1 mM de cada cebador, tampón de reacción de PCR al 10% y agua estéril de calidad molecular. Se añadió ADN polimerasa GoTaq® (Promega, Mannheim, Alemania) a razón de 4 u / 100 µL de la mezcla de reacción; se usaron 2 µL de plantilla de ADN genómico en cada 20 µL de reacción. Se llevaron a cabo amplificaciones en un termociclador avanzado Primus 96 (peqLab Biotechnology) en tubos de reacción de 200 µL usando las siguientes condiciones de PCR: 96°C, desnaturalización inicial de 180 segundos; seguido por 35 ciclos: 96°C 30 segundos, 58°C, 30 segundos, 72°C, 90 segundos; y una extensión final a 72°C durante 10 minutos.

15 Datos de secuencias y taxonomía de los hongos Glomeromycota Se usó el alineamiento de referencia publicado por Krüger et al. (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 de www.amf-phylogeny.com) como base para una filogenia del 18S. Para identificar secuencias ambientales similares, la secuencia de *Dominikia sp.* fue comparada con GenBank mediante el programa BLAST y se incluyeron secuencias muy similares en el alineamiento que formaba la base del árbol del 18S. Para la filogenia de *Dominikia* se usaron secuencias de 18S-ITS1 parcial-5.8S parcial publicadas.

Análisis de datos

Se llevaron a cabo alineamientos mediante Clustal W. Se realizó un análisis filogenético de máxima probabilidad a través del portal electrónico 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 et al. 2014) usando 100 duplicados de partida y el modelo GTRGAMMA. Se construyó un árbol de consenso bayesiano utilizando MrBayes versión 2.0.5. Se efectuaron dos tandas MC3 separadas con árboles de partida generados aleatoriamente para generaciones 2M, cada una con una cadena fría y tres cadenas calentadas usando el modelo GTR+I. Todos los parámetros se estimaron a partir de los datos. Los árboles fueron muestreados cada 1000 generaciones. Se descartaron 200000 generaciones como árboles de “quemado” y de consenso contruidos 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 de invernadero

25

Sustrato: Se seleccionan arcillas de esmectita con un pH entre 7,8 y 8 y se las esteriliza en ciclos alternantes de 3 días antes de su uso como sustrato.

30 Cepa del hongo micorrícico arbuscular (AMF): Se utilizan como inóculo iniciado propágulos de *Dominikia sp.* en condiciones

puras. Este tipo de inoculante está siempre en reproducción continua en ciclos de 90-180 días, ya sea en una cámara de cultivo 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.

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

10 Invierno - primavera: *Lolium perenne*.

Tiestos de cultivo: Se usan tiestos con un volumen de 15 litros.

15 Condiciones de crecimiento de las plantas anfitrionas:

En la cámara de cultivo o invernadero, el cultivo comienza con la inoculación directa en el sistema radicular de la planta anfitriona con inóculo puro de la cepa seleccionada del hongo micorrícico arbuscular (*Dominikia sp.*) en un sustrato de arcilla de esmectita estéril. Estas plantas se cultivan en todo su ciclo vital completo, que dura, según el tipo de planta, entre 90 y 180 días. Las plantas siempre se mantienen bien hidratadas, con un suministro de riego diario (agua esterilizada) con un intervalo de temperatura entre 25 y 28°C y una humedad relativa del 65%. Una vez completado, se extrae el sistema radicular, que contiene sustrato de esmectita, raicillas y propágulos de AMF puros, que han de usarse subsiguientemente para su aumento de escala en la segunda fase.

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

Esporas totales: 50-225 esporas/g.

5

Micelio extramatricial: > 70 mg/kg de sustrato.

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

10

NPM (número más probable) de la concentración: > 1×10^4 propágulos por cada 100 ml de sustrato.

Segunda fase: Aumento de escala

15

Etapas 1: Preparación de lechos

Los lechos se construyen con un material de revestimiento de plástico 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 de plástico.

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

30

– Los lechos son colocados en sitios bien drenados.

- Los lechos pueden tener cualquier dimensión, teniendo en consideración el acceso requerido para facilitar el tránsito de personas y equipos necesarios para el cuidado de los lechos.

5

- Los lechos tienen un sistema de riego dictado en función de las necesidades locales. La configuración preferida del sistema puede ser ya sea un riego por goteo o un aspersor y debe estar automatizado y permitir un riego independiente de zonas seleccionadas del lecho.

10

Etapas 2: Especies de plantas anfitrionas

Determinación de las especies de plantas anfitrionas y de los hongos micorrícicos que se pueden establecer en el sistema: La selección y la identificación de la planta anfitriona y de la especie fúngica corresponderán a las condiciones específicas del sitio y a los objetivos de la producción. Se usan *lolium* (*Lolium perenne*) y el AMF producido previamente en la primera fase.

20

Etapas 3: Siembra e inoculación de la planta anfitriona

Antes de plantar la planta anfitriona, se somete a ensayo la germinación de las semillas. En función de los resultados de este ensayo, se determina la tasa adecuada de siembra. En el caso del *lolium perenne*, las semillas se siembran esparciéndolas a razón de 80 kg/ha de semilla previamente certificada usando semillas granuladas. Además, en conjunción con la semilla, se aplican directamente a la arcilla de esmectita 20 g de inóculo de AMF por m² de lecho.

30

Inmediatamente después de la siembra, se aplica riego como una aspersión fina para impedir la redistribución de la semilla y el inóculo.

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

- Valores de $\text{pH} \geq 6$ y $\leq 7,5$
- Conductividad eléctrica $< 1,6 \text{ mS/m}$
- 10 – Sales totales solubles $< 1000 \text{ ppm}$
- Relación de absorción de sodio (SAR) < 10
- Estar libre de elementos pesados y patógenos. Se prefiere que el agua usada para el riego sea agua potable.

15 Etapa 4: Actividades de cultivo y riego

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

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

Durante el crecimiento y el desarrollo de la planta anfitriona, se produce la colonización de la raíz por AMF y ello establece la simbiosis entre la planta y el hongo. Para
30 evaluar el desarrollo de esta relación, se realiza un muestreo periódico del sistema radicular para evaluar el

desarrollo de micorrizas. Los procedimientos usados para evaluar la colonización incluyen Gerdeman y Nicolson (1963) (Gerdemann J.W., Nicolson T.H. 1963. Spores of mycorrhizal endogen species extracted from soil by wet sieving and
5 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
10 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
15 55:158-161).

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

La evaluación del proceso de producción se basa en la colonización micorrícica de las raíces, en la concentración
25 extramatricial del micelio y en muestras de arcilla que se toman periódicamente con contenido de esporas.

Conocer la dinámica del desarrollo de la producción de micorrizas permite determinar el momento óptimo de la recolección y aprovechar al máximo el proceso de simbiosis
30 en la planta anfitriona y el hongo micorrícico.

Etapa 6: Recolección

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

Quince días antes de la fecha programada de recolección, se elimina el suministro de riego y se mantiene el follaje para permitir que la arcilla pierda humedad lentamente, garantizando la finalización del proceso de inoculación. Si esta actividad coincide con la temporada de lluvias, será necesario proteger al lecho de la lluvia para permitir que seque a tiempo, cubriendo el lecho con un plástico impermeable.

En primer lugar se elimina manualmente el follaje que hay sobre el suelo procedente de las plantas anfitrionas. La recolección se realiza retirando la arcilla del lecho. Se retira el sustrato dividiendo la masa de arcilla en porciones lo más finas posible para facilitar la mezcla de su contenido en toda la profundidad del perfil y se coloca en bolsas para su transporte.

25

Etapa 7: Secado y trituration del inóculo

Secado: El sustrato y los propágulos micorrícicos recolectados son sometidos a solarización y a desinfección térmica durante 30 días a 50°C. El periodo de secado se puede

prolongar hasta un contenido de humedad por debajo de 5%, para facilitar el proceso de trituración.

Trituración: El producto es molido en un molino industrial,
5 enfriado hasta 2°C para impedir el sobrecalentamiento de los propágulos micorrícicos. La molienda continúa hasta que se logra un tamaño de partícula por debajo de 100 micrómetros.

Tercera fase: Concentración

10

Después de la etapa 7, de molienda de la biomasa, llega el momento de la concentración del producto usando un tamiz de 35 micrómetros. La partícula obtenida por debajo de esta medida (entre el 60 - 70% del producto inicial) se descarta
15 y se retiene entre el 25 y el 30% del producto ultra concentrado que no pasa a través de ese tamaño y que, al final, será una composición concentrada. Con el uso de esta tecnología se pasó de $1,2 \times 10^4$ propágulos por cada 100 ml a $1,2 \times 10^6$ propágulos por cada 100 ml.

20

La humedad relativa de salida del producto está por debajo del 5%.

Control de calidad: La pureza y la concentración del producto
25 final se determinan siguiendo el procedimiento del número más probable de Porter (1979) (Porter, W.M. 1979. The most probable number method for enumerating infective propagules of vesicular arbuscular mycorrhizal fungi in soils. Aust. J. Soil Res. 17:515-519).

30

Embalaje: El producto terminado es embalado y etiquetado para su envío.

La concentración final de la composición concentrada es:

5

NPM de la concentración: $> 1,2 \times 10^6$ propágulos por cada 100 ml de producto.

Cuarta fase: Recubrimiento de semillas

10

El recubrimiento de semillas con inoculante micorrízico se puede llevar a cabo en una máquina especial para recubrir semillas, en una hormigonera convencional o manualmente en un recipiente de mezcla. Dicho recubrimiento requiere
15 diversas etapas que se describen a continuación en el orden en el que se llevan a cabo.

1. Como etapa inicial, las semillas son recubiertas con una sustancia adhesiva. Las sustancias adhesivas que pueden
20 usarse además del agua incluyen adhesivos orgánicos (gelatina, etilcelulosa, propilenglicol, etc.) y adhesivos inorgánicos (aceites minerales, polivinilos, resinas plásticas, etc.). Los adhesivos preferidos usados son polímeros y copolímeros del grupo polivinilo, como la
25 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 usado entre el 0,1% y el 15%, preferiblemente entre el 0,5% y el 10% y aún más preferiblemente entre el 1,0% y
30 el 5% del peso total de las semillas que hayan de recubrirse. La cantidad de adhesivo usado 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 usadas.

2. Tras el recubrimiento con adhesivo, se añade el inoculante micorrízico. La proporción del inoculante añadido a las semillas puede seleccionarse en el intervalo entre el 0,1% y el 15%, preferiblemente entre el 0,5% y el 10% y aún más preferiblemente entre el 1% y el 5% del peso de las semillas, lo que dependerá del tipo y la variedad. El tiempo de tratamiento de las semillas con el inoculante micorrízico 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 usadas.

El tratamiento micorrízico se puede combinar con otros tratamientos que se describen en las secciones 2a a 2e. Estos tratamientos también se pueden realizar independientemente del tratamiento con el inoculante micorrízico, obteniendo un recubrimiento multicapa. Las etapas que han de llevarse a cabo en el recubrimiento de cada capa son los mismos que en el caso del inoculante micorrízico. Estas capas pueden separarse recubriendo las semillas con sustancias inocuas de origen calcáreo (carbonato de calcio y similares), arcilloso o polimérico. La sustancia granuladora o incrustante no debe superar el 50%, preferiblemente el 40% y aún más preferiblemente el 30% del peso de la semilla y se la añade a la semilla con

una sustancia adhesiva, según se ha mencionado en la sección 1.

2a. Tratamientos con fungicidas, insecticidas y/o
5 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
10 hongos micorrícicos. Los principales fungicidas que han de usarse incluyen azoxystrobina, carboxina, ciproconazol, clorotalonil, metalaxil, miclobutanil y protioconazol. La cantidad de pesticida usada dependerá de las recomendaciones del fabricante, y pueden usarse diversos
15 pesticidas, dependiendo de la necesidad.

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

2c. Tratamiento con macro y/o micronutrientes, siendo el nitrógeno (N), el fósforo (P), el potasio (K), el calcio
25 (Ca), el magnesio (Mg) y el azufre (S) 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) micronutrientes esenciales. La dosis de nutrientes para el recubrimiento puede variar entre
30 0,01% y 15%, preferiblemente entre 0,05% y 10%, y aún más preferiblemente entre 0,1% y 5% del peso total de las semillas que hayan de ser recubiertas.

- 2d. Tratamiento con estimulantes. Recubrir las semillas con estimulantes que inducen la germinación y el desarrollo de la semilla y la defensa de la planta y la esporulación y el desarrollo 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 micorrícico y ser un diferenciador claro entre las semillas tratadas y las no tratadas.
3. Las etapas 1 y 2 significan que se lleva a cabo un recubrimiento completo del inoculante micorrícico por 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 micorrícico por la sustancia adhesiva.
4. Después de llevar a cabo el tratamiento micorrícico, las semillas son secadas 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 llevar a cabo después de la etapa 5.
5. Por último, las semillas recubiertas son descargadas en contenedores desde el componente de recubrimiento. La duración de la descarga puede variar de 5 a 30 segundos,

preferiblemente de 10 a 25 segundos y aún más
preferiblemente de 15 a 20 segundos.

Ejemplo 3. Procedimiento de producción de una realización de

5 la composición de la invención: Composición microgranulada

Primera fase: Condiciones de invernadero

Sustrato: Se seleccionan arcillas de esmectita con un pH
10 entre 7,8 y 8 y se las esteriliza en ciclos alternantes de 3
días antes de su uso como sustrato.

Cepa del AMF: Se utilizan como inóculo iniciado propágulos
de *Dominikia sp.* en condiciones puras. Este tipo de
15 inoculante está siempre en reproducción continua en ciclos
de 90-180 días, ya sea en una cámara de cultivo 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
20 enfermedades en el mismo anfitrión.

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

Invierno - primavera: *Lolium perenne*.

25

Tiestos de cultivo: Se usan tiestos con un volumen de 15
litros.

Condiciones de crecimiento de las plantas anfitrionas:

30

En la cámara de cultivo o invernadero, el cultivo comienza con la inoculación directa en el sistema radicular de la planta anfitriona con inóculo puro de la cepa seleccionada del hongo micorrízico arbuscular (*Dominikia sp.*) en un
5 sustrato de arcilla de esmectita estéril. Estas plantas se cultivan en todo su ciclo vital completo, que dura, según el tipo de planta, entre 90 y 180 días. Las plantas siempre se mantienen bien hidratadas, con un suministro de riego diario (agua esterilizada) con un intervalo de temperatura entre 25
10 y 28°C y una humedad relativa del 65%. Una vez completado, se extrae el sistema radicular, que contiene sustrato de esmectita, raicillas y propágulos de AMF puros, que han de usarse subsiguientemente para su aumento de escala en la segunda fase.

15

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

Esporas totales: 50-225 esporas/g.

20

Micelio extramatricial: > 70 mg/kg de sustrato.

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

25

NPM de la concentración: > 1×10^4 propágulos por cada 100 ml de sustrato.

Segunda fase: Aumento de escala

30

Etapas 1: Preparación de lechos

Los lechos se construyen con un material de revestimiento de plástico 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,
5 preferiblemente con una cubierta de plástico.

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

- Los lechos son colocados en sitios bien drenados.
15
- Los lechos pueden tener cualquier dimensión, teniendo en consideración el acceso requerido para facilitar el tránsito de personas y equipos necesarios para el cuidado de los lechos.
- 20 – Los lechos tienen un sistema de riego dictado en función de las necesidades locales. La configuración preferida del sistema puede ser ya sea un riego por goteo o un aspersor y debe estar automatizado y permitir un riego
25 independiente de zonas seleccionadas del lecho.

Etapas 2: Especies de plantas anfitrionas

Determinación de las especies de plantas anfitrionas y de
30 los hongos micorrícicos que se pueden establecer en el sistema: La selección y la identificación de la planta anfitriona y de la especie fúngica corresponderán a las

condiciones específicas del sitio y a los objetivos de la producción. Se usan lolium (*Lolium perenne*) y el AMF producido previamente en la primera fase.

5 Etapa 3: Siembra e inoculación de la planta anfitriona

Antes de plantar la planta anfitriona, se somete a ensayo la germinación de las semillas. En función de los resultados de este ensayo, se determina la tasa adecuada de siembra. En el
10 caso del lolium perenne, las semillas se siembran esparciéndolas a razón de 80 kg/ha de semilla previamente certificada usando semillas granuladas. Además, en conjunción con la semilla, se aplican directamente a la arcilla de esmectita 20 g de inóculo de AMF por m² de lecho.
15 Inmediatamente después de la siembra, se aplica riego como una aspersión fina para impedir la redistribución de la semilla y el inóculo.

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

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

Etapa 4: Actividades de cultivo y riego

30

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

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

10

Durante el crecimiento y el desarrollo de la planta anfitriona, se produce la colonización de la raíz por AMF y ello establece la simbiosis entre la planta y el hongo. Para evaluar el desarrollo de esta relación, se realiza un muestreo periódico del sistema radicular para evaluar el desarrollo de micorrizas. Los procedimientos usados para evaluar la colonización incluyen Gerdeman 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).

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

La evaluación del proceso de producción se basa en la colonización micorrícica de las raíces, en la concentración extramatricial del micelio y en muestras de arcilla que se toman periódicamente con contenido de esporas.

Conocer la dinámica del desarrollo de la producción de micorrizas permite determinar el momento óptimo de la recolección y aprovechar al máximo el proceso de simbiosis en la planta anfitriona y el hongo micorrícico.

Etapa 6: Recolección

La recolección es la etapa más crítica en el proceso de producción. Si la planta anfitriona que se usa es *Lolium* perenne, el tiempo óptimo de recolección se produce normalmente entre 6 y 7 meses después de la siembra, porque en ese periodo las plantas maduran, completan su ciclo vital y muestran una tendencia a la pérdida de vigor y se ponen amarillas.

Quince días antes de la fecha programada de recolección, se elimina el suministro de riego y se mantiene el follaje para permitir que la arcilla pierda humedad lentamente, garantizando la finalización del proceso de inoculación. Si esta actividad coincide con la temporada de lluvias, será

necesario proteger al lecho de la lluvia para permitir que seque a tiempo, cubriendo el lecho con un plástico impermeable.

5 En primer lugar se elimina manualmente el follaje que hay sobre el suelo procedente de las plantas anfitrionas. La recolección se realiza retirando la arcilla del lecho. Se retira el sustrato dividiendo la masa de arcilla en porciones lo más finas posible para facilitar la mezcla de su contenido
10 en toda la profundidad del perfil y se coloca en bolsas para su transporte.

Etapas 7: Secado y trituración del inóculo

15 Secado: El sustrato y los propágulos micorrícicos recolectados son sometidos a solarización y a desinfección térmica durante 30 días a 50°C. El periodo de secado se puede prolongar hasta un contenido de humedad por debajo de 5%, para facilitar el proceso de trituración.

20

Trituración: El producto es molido en un molino industrial, enfriado hasta 2°C para impedir el sobrecalentamiento de los propágulos micorrícicos. La molienda continúa hasta que se logra un tamaño de partícula por debajo de 100 micrómetros.

25

Tercera fase: Microgranulación

El proceso de microgranulación se divide en tres etapas:

30 – Adición de soporte granular en el mezclador biconico giratorio. Para producir el soporte se usó: Mezcla de mica,

atapulgita y piedra caliza en un intervalo entre 40-90% en peso, más preferiblemente entre 50-80% en peso, aún más preferiblemente entre 60-70% en peso.

- 5 – Adición de micorrizas (hongo micorrícico arbuscular): se dosifica el AMF entre 10-60% en peso, más preferiblemente entre 20-50% en peso, aún más preferiblemente entre 30-40% en peso de *Dominikia sp.* producido previamente (etapa 7) junto con un aglutinante (cera, aceite de linaza, goma
- 10 arábiga, goma de tragacanto, metilcelulosa, alcohol polivinílico, harina de tapioca, lactosa, sacarosa, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, lactosa en polvo, sacarosa en polvo, fécula de tapioca (harina de
- 15 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 del mezclador giratorio biconico mediante un tornillo. Durante esta
- 20 operación, el mezclador se mantiene en movimiento hasta la total homogeneización del gránulo.
- Embalaje: una vez que el producto formulado está totalmente homogeneizado, es descargado en un tamiz para eliminar los terrones y el polvo producidos. Por último,
- 25 el producto se recoge en una tolva de embalaje desde la cual se procede automáticamente a facilitar los correspondientes contenedores de llenado.

Control de calidad y embalaje

30

Control de calidad: La pureza y la concentración del producto final se determinan siguiendo el procedimiento del número

más probable de Porter (1979) (Porter, W.M. 1979. The most probable number method for enumerating infective propagules of vesicular arbuscular mycorrhizal fungi in soils. Aust. J. Soil Res. 17:515-519).

5

Embalaje: El producto terminado es embalado y etiquetado para su envío.

La concentración final de la composición microgranulada es:

10 NPM de la concentración: $> 1 \times 10^4$ propágulos por cada 100 ml de producto.

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

15

Para demostrar la efectividad de la composición de la presente invención –que comprende el hongo micorrízico arbuscular (AMF) *Dominikia sp.*, depositado con el número de acceso MUCL 57072– sobre trigo, se realizó un ensayo en el
20 campo experimental “Tres caminos”, propiedad de CEBAS-CSIC, en Murcia.

El diseño experimental fue de bloques al azar con cuatro repeticiones. Las parcelas experimentales tenían 3 m de
25 longitud por 4,2 m de anchura.

Se aplicaron los siguientes tratamientos:

– Control: no se aplicó fertilización química ni hongo
30 alguno

– Composición de la invención: proporcionada en forma microgranulada, con una tasa 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).

– 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 recolección tuvo lugar el 1 de junio de 2014, para un total de 240 días. El tipo de siembra e inoculación usado fue mecánico y fue aplicado por una carrera de una sembradora de líneas, y la composición de la invención, en forma microgranulada, fue aplicada a razón de 10 kg/ha junto con la semilla.

La tierra usada se clasificó como nitisol (IUSS Working Group. WRB. World reference base for soil resources 2006. World Soil Resources Reports. Roma: FAO, 2006). Para la caracterización química del terreno, se usaron los siguientes procedimientos analíticos:

- pH: proporción suelo-solución 1:2,5.
- Materia orgánica (MO): Walkley y Black.

- P_2O_5 : Oniani.
- Cationes intercambiables: extracción con NH_4 AC a 1 mol/L con un pH de 7 y titulación complexométrica (Ca y Mg) y fotometría de llama (Na y K).

5

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

Los resultados de las características químicas del suelo (Tabla 2) muestran una fertilidad entre media y alta,
15 destacándose un contenido medio de materia orgánica, lo que responde a lo descrito para este tipo de terreno (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
20 Habana. Cultivos tropicales, 2006, vol. 27, nº 2, pp. 41-50).

Tabla 2: Características químicas del suelo.

Tabla 2	
Materia orgánica (%)	3,21
pH	7,02
P_2O_5	397,25
K (cmol/kg de tierra)	0,96
Ca (cmol/kg de tierra)	14,26
Mg (cmol/kg de tierra)	3,70

Na (cmol/kg de tierra)	0,11
------------------------	------

La cepa fúngica de la invención de *Dominikia sp.* se aisló de suelo salino. Este hongo es tolerante a altas concentraciones de sal.

5

Las variables analizadas fueron: el número de esporas de AMF por gramo de suelo rizosférico (Gederman, JW y Trappe, JM The Endogonaceae in the Pacific Northwest. Mycologia Memoir No 5. The New York Botanic Garden. 1974, nº 5), el porcentaje
10 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. Tranfer. Britanic: Mycology Society, 1970, vol.
15 55, pp. 158-161), el porcentaje de densidad visual (DV) a través del procedimiento de interceptaciones (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 total de glomalina
20 (glicoproteína) 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, nº 7, pp. 1219-1224).

25

El contenido de los nutrientes foliares (% de N, P y K) y el contenido total de proteínas se determinaron mediante procedimientos descritos en el manual de laboratorio de técnicas analíticas del INCA (Instituto Nacional de Ciencias
30 Agrícolas. Manual de técnicas analíticas para análisis de

suelo, foliar, abonos orgánicos y fertilizantes químicos: La Habana, 1989).

El rendimiento fue evaluado como sigue: se evaluó el número de granos por espiga; el número de espigas por m²; la masa por cada 1000 granos y las producciones agrícolas (T/ha).

El procesamiento estadístico de los resultados experimentales se realizó mediante el análisis de ANOVA unidireccional y se usó la prueba de Duncan (Duncan, D. B. Multiple range and multiple F tests. Biometrics, 1955, vol. 11, nº 1) cuando hubo diferencias entre medias de tratamiento. En todos los casos se utilizó el procesador estadístico SPSS 11.5.

Resultados y exposición

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

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

Tabla 3				
Tratamiento	Esporas/gramo de tierra	Colonización (%)	DV (%)	Glomalina (mg/g de tierra)
Control	42 b	12,3 b	0,12 b	1,8 b

Tabla 3				
Tratamientos	Esporas/gramo de tierra	Colonización (%)	DV (%)	Glomalina (mg/g de tierra)
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 letras diferentes en la misma columna son significativamente diferentes a $p < 0,05$.

Lo anterior puede deberse a una intensa actividad colonizadora, haciendo difícil la colonización radicular por parte de otras especies de hongos micorrícicos arbusculares. Por otra parte, muestra que la colonización micorrícica también fue más efectiva, reflejando la composición de la invención valores mayores que otros tratamientos.

10

Cabría señalar que las cepas nativas del suelo mostraron valores de colonización bajos. Observando los valores de la densidad visual (variable que mide la intensidad de la colonización micorrícica), se ve que el mayor porcentaje se obtuvo con la composición de la invención.

15

Otra variable que destacar fue el contenido total de glicoproteínas, que fue mayor con la composición de la invención. Este fenómeno reafirma una mayor simbiosis micorrícica cuando se aplica la composición de la invención

20

y la posible influencia del inoculante para aumentar la formación de agregados en el suelo. Además, los tratamientos en los que no se aplicó inoculante micorrícico tenían valores bajos de esta variable, lo que puede ser atribuible a la baja efectividad de las micorrizas nativas.

La Tabla 4 muestra los contenidos minerales foliares en cada tratamiento. Para el nitrógeno y el fósforo, el contenido fue mayor 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 proteína total foliares.

Tabla 4				
Tratamientos	% N	% P	% K	Proteína total (%)
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 letras diferentes en la misma columna son significativamente diferentes a $p < 0,05$.

Cabría señalar 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 producciones de trigo de 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 la hoja, 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 terreno (Tabla 4), que es absorbido por las plantas de la solución del suelo a través de su sistema radicular, en este caso particular por la interacción tripartita planta-micorrizas arbusculares (simbiosis micorrícica) y suelo, señalando un valor mayor que el índice crítico foliar de este nutriente en el *Triticum durum* (López-Bellido, L. Cultivos herbáceos. Cereales. Ed. Mundi-Prensa, 1991, pp. 151-158) e indicando un buen desarrollo del cultivo. Además, este valor tuvo una tendencia más alta cuando se aplicó la composición de la invención.

Otra variable que es relevante es el contenido de proteína foliar, que es mayor en el tratamiento con la composición de la invención (aún más alto 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 *Triticum durum* a la aplicación de la composición de la invención y al producto estándar, ambos con altos contenidos de N.

5

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

Tabla 5					
Tratamientos	Granos/es piga	Nº de espiga s/m²	Masa de 1000 gran os (g)	Producecc ión (T/ha)	Increme nto (%)
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	0,01 5*	0,009**	
F	11,2	10,2	6,1	7,8	

* Las letras diferentes en la misma columna son
significativamente diferentes a $p < 0,05$.

10

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

15

Es bueno observar que el cultivo de trigo asociado con la composición de la invención permitió lograr una respuesta productiva adecuada con indicadores aceptables de operación micorrícica, no solo para mejorar la actividad biológica del terreno, sino que promovió un aumento significativo de la producción en un 8,8% con respecto al control y al producto estándar.

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

Para demostrar la efectividad de la composición de la presente invención –que comprende el hongo micorrícico arbuscular (AMF) *Dominikia sp.*, depositado con el número de acceso MUCL 57072– sobre maíz, se realizó un ensayo en el campo cercano a la población 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 en el cultivo de maíz –var. DKC 6717, Monsanto– en un terreno de cambisol.

La siembra se efectuó el 12 de abril y la recolección tuvo lugar el 14 de diciembre de 2014, para un total de 230 días. El tipo de siembra e inoculación usado fue mecánico y fue aplicado por una carrera de una sembradora de líneas, y la composición de la invención, en forma microgranulada, fue aplicada 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 aspersión usado fue de 18 × 18 m.

El diseño experimental fue de bloques al azar con tres repeticiones. Las parcelas experimentales tenían 20 m de longitud × 20 m de anchura.

5 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 suspensión espesa a razón de 10 T/ha.

20

La tierra usada se clasificó como cambisol (IUSS Working Group. WRB. World reference base for soil resources 2006. World Soil Resources Reports. Roma: FAO, 2006). Para la caracterización química del terreno, se usaron los siguientes

25 procedimientos analíticos:

- pH: proporción suelo-solución 1:2,5.
- Materia orgánica (M0): Walkley y Black.
- P₂O₅: Oniani.

- Cationes intercambiables: extracción con NH_4AC a 1 mol/L con un pH de 7 y titulación complexométrica (Ca y Mg) y fotometría de llama (Na y K).
- 5 Estos procedimientos son descritos en el manual de técnicas analíticas para el análisis del suelo, foliar, de abonos orgánicos y de fertilizantes químicos (Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas. Manual de técnicas analíticas para análisis de suelo, foliar, abonos orgánicos y fertilizantes
- 10 químicos: La Habana, 1989).

Los resultados de las características químicas del suelo (Tabla 6) muestran una fertilidad entre media y alta, destacándose un contenido medio de materia orgánica, lo que

15 responde a lo descrito para este tipo de terreno (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, nº 2, pp. 41-

20 50).

Tabla 6: Características químicas del suelo.

Tabla 6	
Materia orgánica (%)	2,51
pH	8,02
P_2O_5	258,60
K (cmol/kg de tierra)	1,40
Ca (cmol/kg de tierra)	15,44
Mg (cmol/kg de tierra)	2,90
Na (cmol/kg de tierra)	0,30

La cepa fúngica de la invención de *Dominikia sp.* se aisló de suelo salino. Este hongo es tolerante a altas concentraciones de sal.

5 Las variables analizadas fueron: 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
10 infection. Transfer. Britanic: Mycology Society, 1970, vol. 55, pp. 158-161) y porcentaje de la densidad visual (DV) a través del procedimiento de interceptaciones (Giovannetti, M. y Mosse, B. An evaluation of techniques to measure vesicular-arbuscular infection in roots. New Phytology,
15 1980, vol. 84, pp. 489-500). El contenido de nutrientes foliares (% de N, P y K) se determinó mediante 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
20 y fertilizantes químicos: La Habana, 1989).

El rendimiento fue evaluado como sigue: se evaluó el número de granos por espiga; el número de espigas por metro cuadrado; la masa por cada 1000 granos y las producciones
25 agrícolas (T/ha).

El procesamiento estadístico de los resultados experimentales se realizó mediante el análisis de ANOVA unidireccional y se usó la prueba de Duncan (Duncan, D. B.
30 Multiple range and multiple F tests. Biometrics, 1955, vol. 11, nº 1) cuando hubo diferencias entre medias de

tratamiento. En todos los casos se utilizó el procesador estadístico SPSS 11.5.

Resultados y exposición

5

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 aplicaba la composición de la invención, alcanzando no solo un mayor porcentaje de colonización micorrícica, sino también una mayor intensidad de colonización, reflejado en una mayor densidad visual.

10

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

15

Tabla 7				
	Colonización (%) a los 45 días	Coloniza ción (%) a los 120 días	DV (%) a los 45 día s	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***	0,0 1*	0,006*
F	7,2	8,2	8,1	9,4

* Las letras diferentes en la misma columna son
significativamente diferentes a $p < 0,05$.

Este ensayo demostró que el inoculante más efectivo era la
5 composición de la invención, que reflejaba valores mayores
que otros tratamientos.

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

Se midieron los contenidos minerales foliares (Tabla 8). Los
15 resultados no mostraron ninguna diferencia significativa
entre ambos tratamientos: la composición de la invención y
el producto estándar. Sin embargo, había una tendencia hacia
un mayor suministro nutricional, especialmente en el caso
del contenido de nitrógeno en presencia de *Dominikia sp.*
20 (composición de la invención).

Tabla 8: Nitrógeno, fósforo y potasio foliares a los 120 días
en 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

25 * Las letras diferentes en la misma columna son
significativamente diferentes a $p < 0,05$.

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

El contenido de fósforo foliar no mostró diferencias significativas en cualquiera de los tratamientos, lo que 10 puede ser debido al contenido de este elemento en el terreno usado (Tabla 8). El fósforo es absorbido por las plantas a través de su sistema radicular; en este caso particular por la interacción tripartita planta-micorrizas arbusculares (simbiosis micorrícica) y suelo. El contenido de fósforo 15 foliar fue mayor que el índice crítico de este nutriente en el *Triticum 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 tuvo una tendencia más alta en el tratamiento tratado con la 20 composición de la invención.

Resultados similares en el trigo y el maíz demuestran el efecto de la fertilización mineral en el porcentaje de longitud de las raíces colonizadas en las que se aplicaron 25 dosis bajas de fósforo. Esto apoya la importancia y la utilidad de la composición de la invención para que las plantas de maíz y de 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 30 que ha de aplicarse.

El contenido de potasio foliar fue similar para los diferentes tratamientos objeto de estudio, mostrando niveles satisfactorios para este cultivo, lo que coincide con las afirmaciones para cereales sobre este macroelemento (López-
5 Bellido, L. Cultivos herbáceos. Cereales. Ed. Mundi-Prensa, 1991, pp. 151-158). Además, se encuentran concentraciones elevadas de este elemento tanto en plantas micorrícicas como en las que no lo son (Bolleta, A. y Krugger, H. Fertilización e inoculación con hongos micorrízicos arbusculares en trigo.
10 Buenos Aires: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. 2004, Saleque, M. A.; Timsina, J.; Panaullah, 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
15 Nutrition, 2006, vol. 29, nº 1, pp. 157-172), lo que puede ser debido al hecho de que este elemento se mueve con mayor facilidad en la solución del suelo.

La siguiente tabla resume los resultados obtenidos (Tabla
20 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
25 componentes en el cultivo.

Tabla 9			
Tratamientos	Producción (kg/ha)	Humedad del grano (%)	Incremento (%)
Composición de la invención	14700,2 a	22	9,18
Producto estándar	13500,3 b	20	-----

Tabla 9			
Tratamientos	Producción (kg/ha)	Humedad del grano (%)	Incremento (%)
P	0,042**		
F	29,40		

* Las letras diferentes en la misma columna son
significativamente diferentes a $p < 0,05$.

Las plantas tratadas con la composición de la invención
alcanzaron los valores más altos en comparación con el
producto estándar, lo que podría ser explicado por una mayor
efectividad del inoculante sólido para establecer una
simbiosis con la planta y, así, una mejor asimilación de
altas dosis de nitrógeno.

Por último, y en conclusión, es bueno observar que el cultivo
de maíz asociado con la composición de la invención permitió
lograr una respuesta productiva positiva desde el punto de
vista del rendimiento, alcanzando un aumento de la producción
del 9,18% con respecto a la fertilización mineral. Además,
los indicadores nutricionales mostraron una tendencia mayor
y que el uso del hongo micorrízico arbuscular de la invención
no solo mejoraba la actividad biológica del terreno, sino
que promovía un aumento significativo de la producción en
función de una gestión más sostenible.

Ejemplo 6. Efectividad del recubrimiento de semillas de maíz
con Dominikia sp. y una sustancia adhesiva sobre la actividad
micorrízica

Objetivo: Aprender sobre la eficacia del recubrimiento del maíz con *Dominikia sp.* y una sustancia adhesiva sobre la actividad micorrícica.

- 5 Para lograr este objetivo, se sembraron tres maceteros (cada uno considerado una repetición) con semillas de maíz recubiertas con *Dominikia sp.*, depositada con el número de acceso MUCL 57072, y una sustancia adhesiva.
- 10 Las semillas se plantaron el 8/3/2016 y se llevaron a cabo ensayos de colonización micorrícica en la raíz usando la técnica de tinción de Phillips y Hayman, 1970, los días 21 y 35 después de la siembra.
- 15 Tabla 10. Porcentaje de colonización micorrícica (% CM) de las raicillas de semillas de maíz recubiertas con la combinación de *Dominikia sp.* y una sustancia adhesiva los días 21 y 35 tras la siembra (dts), respectivamente.

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

20

La Tabla 10 muestra que, en cada una de las muestras analizadas, hubo un porcentaje positivo de colonización micorrícica, que aumentaba a medida que las plantas crecían. En esta fase, solo se detectaron puntos de colonización

25 incipiente en el maíz, formados por la red de micelio extramatricial que acababa de empezar a formarse.

Conclusiones

El recubrimiento de la semilla de maíz con la concentración de inoculante que contenía *Dominikia sp.* y una sustancia adhesiva fue efectiva porque generó estructuras micorrícicas en la raíz como micelio extramatricial en las primeras fases de la planta. Se veían las esporas de la especie germinada y formaban una red interna de germinación y colonización. También se muestra que los valores de colonización dependen de los tiempos de crecimiento del maíz.

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 sp.*, depositada con el número de acceso MUCL 57072, en forma microgranulada en el trigo y la cebada.

Tabla 11					
Cultivo	Variedad	Riego	Tratado (kg·ha ⁻¹)	No tratado (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

Tabla 11					
Cultivo	Variedad	Riego	Tratado (kg·ha ⁻¹)	No tratado (kg·ha ⁻¹)	Mejora (%)
Trigo	Badrá	Cultivo de regadío	4981	5463	9,7
Trigo	Chambo	Cultivo de secano	3350	3700	10,4
Trigo	durum	Cultivo de secano	4300	4900	14
Trigo	durum	Cultivo de secano	4570	5110	11,8
Trigo	durum	Cultivo de regadío	6345	7135	12

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

5

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 sp.*, depositada con el número de acceso MUCL 57072, en forma microgranulada en el maíz.

10

Tabla 12					
	Variedad-ciclo	Riego	No tratado (materia seca)	Tratado (materia seca)	MEJORA (kg/ha)
Zona 1	Lg 30369 - 365	De regadío	7,87	8,25	809,091

Tabla 12						
	Variedad-	Riego	No tratado	Tratado	MEJORA	
	ciclo		(materia	(materia	(kg/ha	
			seca)	seca)	)	
Zona	Lg 30369 -	De	4,24	5,27	2408,6	
2	365	regadío			55	
Zona	Lg 30369 -	De	4,85	5,26	963,08	
3	335	regadío			0	
Zona	Lg 30369 -	De	6,84	7,89	2085,2	
4	365	regadío			87	
Zona	Maïsadour -	De	7,40	8,09	1379,6	
5	350	regadío			49	

Ejemplo 9. Actividad micorrícica de Dominikia sp. en el cultivo de arroz (Oriza sativa) en terreno inundado

5 Se realizó un experimento para definir la actividad micorrícica de la composición de la invención que contiene Dominikia sp., depositada con el número de acceso MUCL 57072, en forma concentrada, en condiciones de suelo salino inundado. La composición usada tenía una concentración entre

10 1-4 × 10⁶ propágulos/g de sustrato. A la inversa, dependiendo de la realización, la concentración de la composición puede estar entre 1-2 × 10⁴, preferiblemente entre 1,2-1,8 × 10⁴ propágulos/g de sustrato.

15 Materiales y procedimientos

El experimento se realizó en la granja experimental “Tres caminos”, propiedad de CEBAS-CSIC, en la zona de Matanza, municipio de Santomera (Murcia). Las plantas se cultivaron

20 en un invernadero experimental tipo túnel monocapa con una

superficie aproximada de 60 m², cubierto con policarbonato y ventana superior protegida con malla antitriptica. Estaba equipado con un sistema de enfriamiento y un sistema de pantalla aluminizada como protección contra el sol. El ensayo
5 se realizó con plantas de arroz (*Oriza sativa*), variedad J 104, sometidas a dos tratamientos con el inoculante micorrícico y el correspondiente control sin tratamiento micorrícico. El tratamiento micorrícico fue la composición de la invención, que contenía *Dominikia* sp., depositada con
10 el número de acceso MUCL 57072, en forma concentrada a una dosis de 1 kg/ha recubriendo la semilla de arroz.

Cuando se tuvo la certeza de la inoculación en brotes individuales, 15 días después de la germinación, las plantas
15 fueron trasplantadas, con una concentración de 10 plantas por canal de hormigón, de 2 m² de superficie, usando tierra hidromórfica Gley nodular salinizada, según la clasificación de suelos de la UNESCO (Hernández, A; Pérez, J.M; Bosch, D; Rivero, L: Nueva versión de clasificación genética de los
20 suelos de Cuba. Soil Institute. AGRINFOR, La Habana, 1999, 64 pp.) como sustrato en ambos contenedores. La Tabla 13 muestra las características principales. En todos los tratamientos, se efectuó la labor de cultivo y se añadió una capa de agua después de 18 días de la siembra de las semillas.
25 Tabla 13. Propiedades químicas y número de esporas·50 g de suelo⁻¹ de tierra hidromórfica Gley nodular salinizada usada en el experimento.

Tabla 13								
M.O (%)	pH	P (cmol·kg ⁻¹)	Ca	Mg	K	Na	C.E (μS·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

5 En el presente ejemplo, la composición inoculante micorrícica de la invención en forma concentrada contiene el hongo formador de micorrizas arbusculares *Dominikia sp.*, depositado con el número de acceso MUCL 57072. La composición usada tenía una concentración entre 1-4 × 10⁶ propágulos/g

10 de sustrato.

Determinaciones realizadas

Se determinó la dinámica de crecimiento para los 90 días tras el trasplante (dt), midiéndose la altura de la planta y la

15 profundidad del sistema radicular, y también la producción de la cosecha y algunos de sus componentes.

La acción micorrícica se determinó durante el desarrollo del cultivo llevando a cabo mediciones de colonización porcentual

20 (%), densidad visual (%), micelio extramatricial arbuscular y endófitos arbusculares usando un microscopio estereoscópico (Zeiss, Alemania -5-) y un microscopio compuesto Axiostar (Zeiss, Alemania). Se calculó la

25 proporción entre el micelio externo y el endófito arbusculares (MEA:EA).

La evaluación micorrícica de las muestras se llevó a cabo usando la técnica de tinción de la raíz (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 interceptaciones (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 y de la actividad de los endófitos arbusculares y las micorrizas se realizó según protocolos propuestos (Trouvelot, A., Kough, J. y Gianinazzi Pearson, V. (1986). Mesure du taux de mycorhization VA d'un système radiculaire. 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 tierra¹.

Análisis estadístico

El procesamiento estadístico de los resultados se llevó a cabo por simple análisis de la varianza de clasificación y

se usó la prueba de Tukey cuando había diferencias significativas entre medias, usando el programa Statgraphics® Plus, 4.1. Para trazar los gráficos (es decir, las Figuras 1, 2 y 3), se usó el programa SigmaPlot 4.

5 Los valores porcentuales de colonización micorrícica se transformaron usando la expresión $2\arcsen\sqrt{x}$.

Resultados y exposición

10 La Tabla 13, presentada anteriormente, muestra algunas de las propiedades químicas de la tierra usada en el experimento. La tierra tenía un pH ligeramente alcalino, niveles medios de materia orgánica, P y valores de Ca^{2+} del orden de $10 \text{ cmol}\cdot\text{kg}^{-1}$. En cuanto a las características
15 salinas, había altos contenidos de Na y conductividad eléctrica elevada, lo que indicaba características intensamente salinas, aunque la fertilidad era aceptable para el desarrollo de un cultivo de arroz.

20 El número de esporas encontrado en este sustrato fue muy bajo, una característica de suelos agrícolas de utilización intensa en los que se reduce la diversidad y la intensidad de los hongos micorrícicos arbusculares (AMF), debido a la labranza intensiva, la sobreexplotación y los procesos
25 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).

30 El análisis de la dinámica de crecimiento de las plantas de arroz en estas condiciones demostró un comportamiento

distinto con los tratamientos en las variables estudiadas. La altura de las plantas aumentó continuamente, acelerando su crecimiento después del día 27 (Tabla 14).

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

Tabla 14												
DTT	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
Desv. típ.	0,2 ***	0,1 2** *	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	6,1 8	6,4 8	6,8 2	7,9 a	7,0 8	13,9 a	16,9 a
C	0	0,6	2,1 a	2,1	4,7	6,2 9	6,3 2	6,4	6,4 b	7,2 3	10,4 b	13,1 b
Desv. típ.	0,0 ns	0,3 ns	0,2 ***	0,6 n.s	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

Tabla 14												
DTT	1	7	10	13	18	20	23	27	32	39	60	90
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
Desv.	0,3	0,2	0,1	0,4	0,6	0,1	0,2	0,1	0,2	0,3	0,2	0,4
típ.	***	**	3** *	***	***	***	***	***	***	***	***	***

Clave: PSR: Profundidad del sistema radicular, DTT: Días tras el tratamiento, Desv. típ.: Desviación típica.

5 Las mismas letras en la misma columna no difieren significativamente a $p \leq 0,05$.

Ambos tratamientos muestran diferencias significativas durante el aumento de altura. Los valores mayores se
10 obtuvieron en el tratamiento de control hasta los 18 días, después de los cuales hubo un cambio en el comportamiento, y se obtuvieron los mayores valores para la altura de la planta en el tratamiento con inoculante con el eficiente hongo micorrízico arbuscular.

15

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 continuamente, acelerando su crecimiento después del
20 día 27.

Ambos tratamientos muestran diferencias significativas durante el aumento de altura. Los valores mayores se obtuvieron en el tratamiento de control hasta los 18 días,
25 después de los cuales hubo un cambio en el comportamiento, y

se obtuvieron los mayores valores para la altura de la planta en el tratamiento de inoculación con el eficiente hongo micorrícico arbuscular.

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

10

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

20

El desarrollo estuvo muy marcado en el caso del tratamiento inoculado con AMF, alcanzando valores altos si se tiene en cuenta que el experimento se realizó en condiciones de inundación o con una capa de agua después de 20 días. Al
25 final del cultivo, la colonización de las raíces alcanzó un valor del 44%, lo que se considera alto en comparación con otros estudios de micorrizas en arroz, en los que los máximos de colonización no superan el 25% con la inoculación en una base sólida (Fernández, F.; Ortiz, R.; Martínez, M.A.;
30 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 mediante el porcentaje de densidad visual, que no es nada más que la intensidad con la que el micelio coloniza el interior de la raíz.

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

En el caso de la población de esporas, se detectaron valores en el suelo en los primeros días, derivados de la inoculación (hasta 15 días en los tallos), que desaparecieron luego gradualmente con el tiempo, producto de la germinación en condiciones favorables de humedad y temperatura elevada 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 el desarrollo de la simbiosis con la planta. En este caso, la población siguió creciendo hasta valores cercanos a 12 esporas. g^{-1} de tierra.

El análisis del micelio externo arbuscular y las variables de los endófitos arbusculares (Fig. 2) es muy interesante,

ya que muestra cómo se producen los comportamientos internos y externos del simbiote micorrícico a medida que se desarrolla la simbiosis en los ciclos anuales de cultivo.

5 En este caso, se observaron altos valores del micelio externo durante las primeras etapas del desarrollo de la simbiosis, causadas por el crecimiento fúngico a expensas del de la planta, expresado después de algunos años (Bethlenfalvay, G.J., Brown, M.S., Franson, R.L., Mihara, K.L., 1989. The
10 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 manifiesto proceso parasitario, derivado del crecimiento
15 exuberante del micelio en las primeras etapas de la colonización micorrícica en plantas (horas) con una baja fase fotosintética y un alto coste metabólico. El desarrollo de endófitos arbusculares sigue la tendencia opuesta. Hubo valores muy bajos durante los primeros días, no logrando un
20 crecimiento significativo hasta después de 25 días de crecimiento, una fase considerada transitoria en la simbiosis micorrícica arbuscular.

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

La Figura muestra la relación establecida entre los
30 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 pasa por diferentes etapas de desarrollo (Hirrel, M.C., 1981. The effect of sodium and chloride salts on the germination of *Gigaspora margarita*. Mycology 43, 610–617).

Una etapa inicial, en la que hay valores altos de micelio externo en correspondencia con valores muy bajos de endófitos, lo que propicia un manifiesto 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 micorrizado ineficientemente, lo que no causa cambios sustanciales en el desarrollo de la planta (Tabla 2).

Una fase intermedia o de transición, en la que ambas partes comienzan a equilibrarse, y una fase de intercambio mutualista, cuando los componentes se equilibran con un valor de 1 e incluso menor, de modo que hay un aumento notable dentro de la raíz que asegura el intercambio adecuado de nutrientes en el ámbito de los arbuscúlos dentro de las células.

Para este cultivo en particular, puede haber dos fases bien definidas: una de transición inicial, hasta 20-25 días y una fase mutualista después de este tiempo. Paralelo a esto, un análisis de la altura de la planta muestra un gran aumento en el crecimiento de la planta en relación con el control no inoculado después de los 27 días desde la siembra, lo que

coincide con la fase mutualista de la simbiosis micorrícica en estas condiciones de salinidad.

Este efecto puede mostrarse posteriormente en el análisis
5 del rendimiento y de sus componentes (Tabla 15).

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 sp.*
10 (*D.t*) y plantas no tratadas de control (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
Desv. típ.	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:
15 rendimiento (g.planta⁻¹), Desv. típ.: Desviación típica. Las mismas letras en la misma columna no son significativamente diferentes a $p \leq 0,05$.

Hubo un aumento en todos los componentes del rendimiento
20 medido en plantas tratadas con *Dominikia sp.* en comparación con plantas no inoculadas de control. Esto fue particularmente interesante en las condiciones de salinidad del trabajo.

25 A modo de conclusión, el uso de esta cepa de hongo micorrícico fue efectivo para estas condiciones del suelo. Esto es muy

interesante como alternativa viable y sostenible para las condiciones adversas causadas por el estrés salino.

REIVINDICACIONES

1. Una cepa de *Dominikia sp.*, depositada con el número de acceso MUCL 57072.

5

2. Una composición que comprende una cepa de *Dominikia sp.*, depositada con el número de acceso MUCL 57072, estando la concentración de la *Dominikia sp.* en dicha composición entre un 4,0% y un 1,0% en peso.

10

3. La composición según la reivindicación 2, estando la concentración de la *Dominikia sp.* en dicha composición entre un 3,0% y un 2,0% en peso, preferiblemente entre un 2,5% y un 2,3% en peso.

15

4. La composición según la reivindicación 2, siendo dicha composición una composición sólida.

5. La composición según la reivindicación 4, estando dicha
20 composición en forma de polvo, concentrado emulsionable, gránulos o microgránulos.

6. La composición según la reivindicación 5, estando dicha composición en forma de microgránulos.

25

7. La composición según la reivindicación 6 en la que dichos microgránulos tienen un tamaño que oscila de 500 μm a 2000 μm , preferiblemente de 800 μm a 1500 μm , más preferiblemente de 900 μm a 1200 μm .

30

8. La composición según cualquier reivindicación 2 a 7 que, además, comprende al menos un fungicida y/o al menos un

biofungicida y/o al menos un insecticida y/o al menos un bioinsecticida y/o al menos un nematocida y/o al menos un bioestimulante.

5 **9.** Un proceso para la preparación de una composición que comprende una cepa de *Dominikia sp.*, depositada con el número de acceso MUCL 57072 que comprende las siguientes etapas:

- a. proporcionar un sustrato;
- 10 b. dotar a dicho sustrato de las semillas de una planta anfitriona y de la cepa de *Dominikia sp.*, depositada con el número de acceso MUCL 57072;
- c. cultivar y regar dicha planta anfitriona para mantener dicho sustrato con un nivel de humedad de al menos un
15 75% de la capacidad del terreno;
- d. interrumpir dicho riego durante un periodo de al menos 7 días;
- e. eliminar la parte aérea de dicha planta anfitriona y el sustrato;
- 20 f. secar el sustrato retirado;
- g. moler el sustrato secado para obtener gránulos que tengan un tamaño de partícula por debajo de 100 µm.

10. El proceso según la reivindicación 9 en el que dicha
25 cepa de *Dominikia sp.* de la etapa b. Es un inóculo que comprende propágulos de la cepa de *Dominikia sp.*

11. El proceso según la reivindicación 9 o 10 que, además, comprende una etapa h1. de microgranulación.

30

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.

5 **13.** El proceso según la reivindicación 12 en el que dicha etapa h2. de preparación de un inoculante biológico concentrado para el recubrimiento de semillas de cereales se lleva a cabo tamizando el producto molido obtenido en la etapa g. para seleccionar los gránulos que tengan un tamaño de partícula superior a un valor predeterminado.

10

14. El proceso según la reivindicación 12 que, además, comprende una etapa i. de recubrimiento de semillas.

15 **15.** El proceso según la reivindicación 14 en el que dicha etapa i. de recubrimiento de semillas comprende las etapas:

- i1. cubrir las semillas con una sustancia adhesiva;
- i2. añadir dicho inoculante biológico concentrado;
- i3. opcionalmente, proporcionar uno o más tratamientos
20 compatibles seleccionados entre:
 - i3.1.tratamientos con fungicidas, insecticidas y/o herbicidas, compatibles con hongos formadores de micorrizas,
 - i3.2.tratamiento con microorganismos beneficiosos,
 - 25 i3.3.tratamiento con macro y/o micronutrientes,
 - i3.4.tratamiento con estimulantes,
 - i3.5.tratamiento con pigmentos colorantes compatibles con hongos micorrícicos;
- i4. secar las semillas.

30

- 16.** El uso de una composición que comprende una cepa de *Dominikia sp.*, depositada con el número de acceso MUCL 57072, como bioestimulante en plantas.
- 5 **17.** El uso de una composición que comprende una cepa de *Dominikia sp.*, depositada con el número de acceso MUCL 57072, como bionematicida en plantas.
- 18.** El uso según la reivindicación 16 o 17 en el que dichas
10 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.
- 15 **20.** Semillas de cereales recubiertas con una composición según la reivindicación 2.

RESUMEN

El objeto de la invención es la cepa del hongo *Dominikia sp.*, depositada con el número de acceso MUCL 57072, que puede ser
5 incluida en composiciones, siendo dicha composición adecuada para ser usada como bioestimulante bionematicida en plantas, preferiblemente en cereales. También es objeto de la invención un proceso para la obtención de dichas composiciones.

10

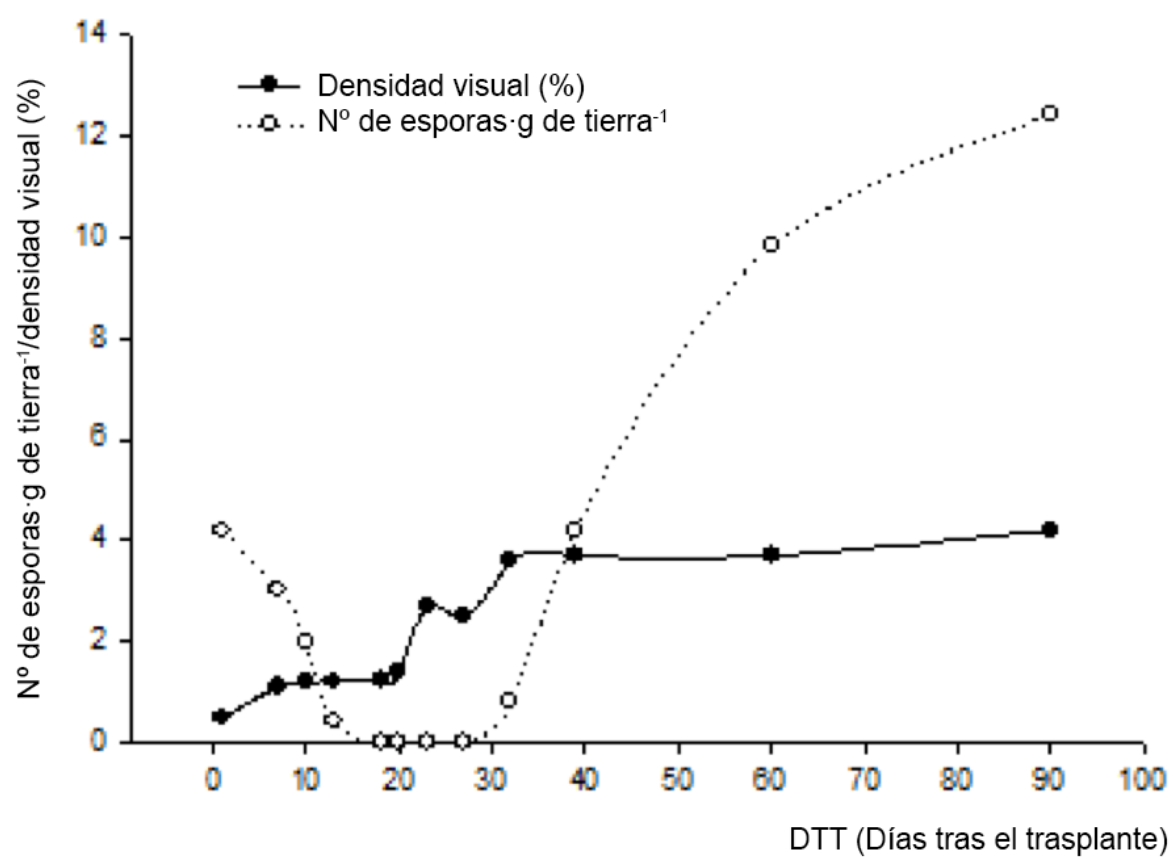


Figura 1

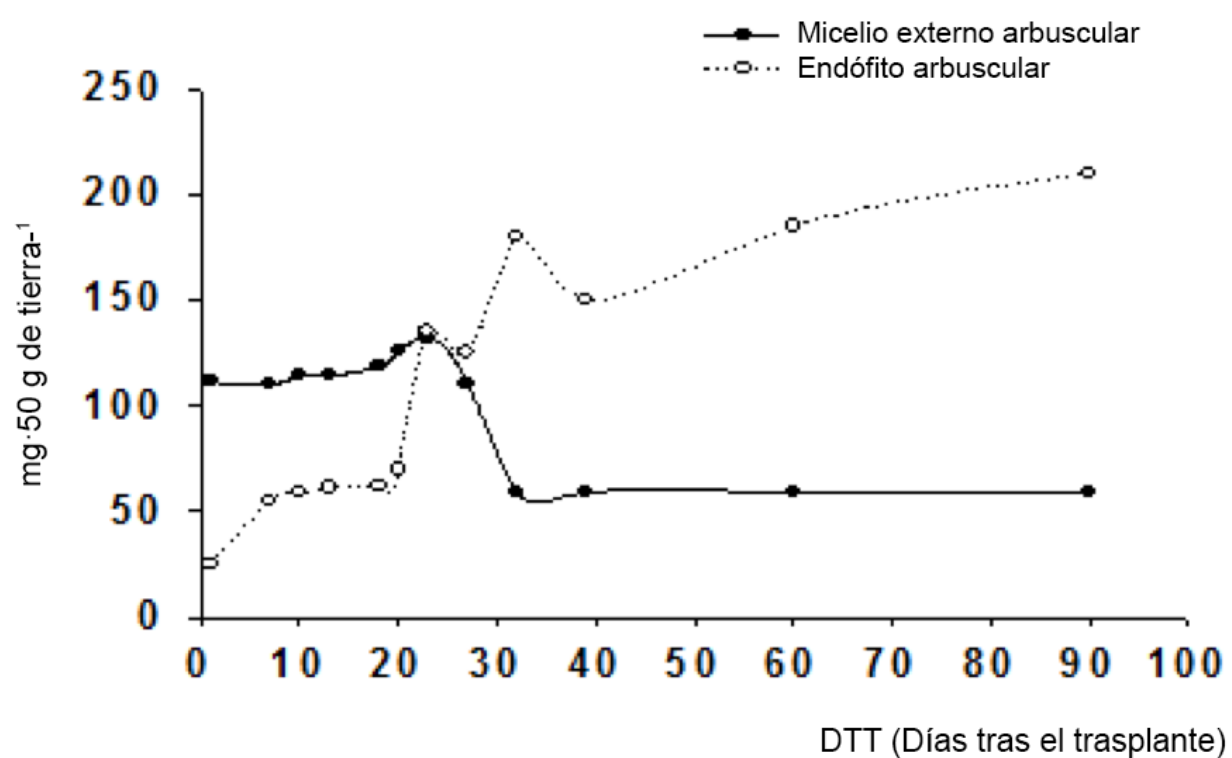


Figura 2

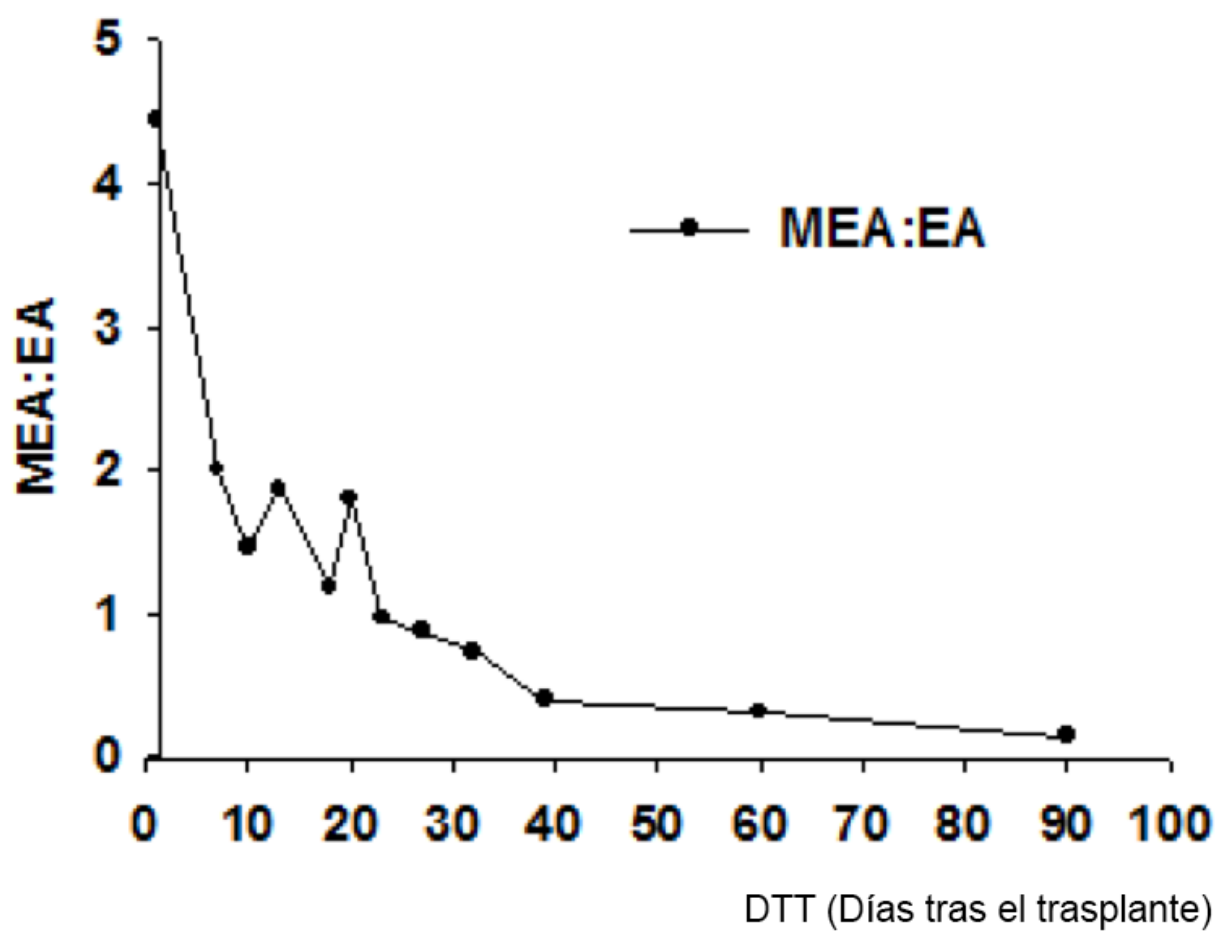


Figura 3