



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 364 684**

② Número de solicitud: 201130566

⑤ Int. Cl.:
C12N 1/14 (2006.01)
A01G 1/04 (2006.01)
A01N 63/04 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

② Fecha de presentación: **11.04.2011**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **12.09.2011**

④ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
12.09.2011

⑦ Solicitante/s: **SYMBORG, S.L.**
Campus de Espinardo, 7
Edificio CEEIM
30100 Espinardo, Murcia, ES

⑦ Inventor/es: **Fernández Martín, Félix y**
Juárez Molina, Jesús

⑦ Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

⑤ Título: **Procedimiento de obtención de un agente micorrizógeno.**

⑤ Resumen:

Procedimiento de obtención de un agente micorrizógeno. La presente invención es un procedimiento de obtención de un agente micorrizógeno, que comprende inocular por recubrimiento una semilla de una planta huésped con al menos un hongo formador de micorrizas del género *Glomus*, cultivar dicha planta en ciclos de riego de entre 7 y 10 días de duración sobre un sustrato de reproducción que comprende arcillas esmécticas en un porcentaje mayor del 52% respecto del peso total de dicho sustrato, interrumpir dicho riego durante un periodo igual o mayor de 20 días, eliminar la parte aérea de la planta y extraer el sustrato y molturar dicho sustrato a una temperatura entre 25 y 30°C para obtener dicho agente micorrizógeno. El agente micorrizógeno es útil como emulsionante para el riego de una planta, seleccionada de entre el grupo compuesto por hortaliza, cítrico, frutal, olivo, cereal y platanera.

ES 2 364 684 A1

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de obtención de un agente micorrizógeno.

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a un procedimiento de obtención de un agente micorrizógeno. La presente invención se relaciona con la agricultura y la aplicación de hongos para mejorar la producción vegetal, la eficiencia en la toma de nutrientes, la tolerancia al déficit hídrico, la estructura del suelo y la protección contra algunas enfermedades de la raíz.

Antecedentes de la invención

En el estado de la técnica se han desarrollado distintos agentes micorrizógenos, en presentaciones de variada naturaleza, por ejemplo, en estado sólido, semisólido o líquido. En general los agentes micorrizógenos conocidos están compuestos por esporas de hongos y por propágulos infectivos de hongos. Estos agentes micorrizógenos presentan el inconveniente de que la capacidad germinativa de las esporas está afectada por largos períodos de dormancia, las esporas no tienen una germinación uniforme y la concentración de propágulos es baja y no se puede concentrar con la magnitud deseada.

La presente invención utiliza arcillas de tipo esmécticas tanto del tipo dioctaédrica como trioctaédricas con alta plasticidad cuando se humedece y consistente en un material granuloso muy fino, formado por partículas muy pequeñas cuyo tamaño es inferior a 4 micras, y su principal propiedad es la expansión en sistemas de poca disponibilidad de agua como lo puede ser un sustrato para reproducción de hongos micorrízicos. Por otra parte es muy importante la formación coloidal y disgregación en presencia de abundante agua a la hora de la aplicación en los sistemas de riego localizado. Estas arcillas confieren a los propágulos situaciones estresantes que aceleran los procesos de germinación de las esporas una vez inoculadas las mismas en condiciones de campo. Sin embargo, las arcillas empleadas en otros agentes micorrizógenos del estado de la técnica son arcillas de tipo caolinitas que no poseen elevada reactividad en términos tanto de sustitución de iones como de placas de intercambio, siendo este un factor limitante en la mayor expresión de propágulos micorrízicos.

Por otra parte, los agentes micorrizógenos fabricados hasta el momento tienen un límite natural de propágulos micorrizógenos, y ello se debe a que el procedimiento de obtención no conlleva la concentración de mayor cantidad de propágulos específicos.

El problema que plantea la técnica es la obtención de un agente micorrizógeno que comprenda esporas que no estén afectadas por largos períodos de dormancia y que comprendan una alta concentración de propágulos infectivos. La solución que propone la presente invención es un procedimiento de obtención de un agente micorrizógeno, en el que se cultiva una planta huésped en ciclos de riego de entre 7 y 10 días de duración sobre un sustrato de reproducción que comprende arcillas esmécticas.

Descripción de la invención

La presente invención es un procedimiento de obtención de un agente micorrizógeno, que comprende:

- a) inocular por recubrimiento una semilla de una planta huésped con al menos un hongo formador de micorrizas del género *Glomus*,
- b) cultivar dicha planta en ciclos de riego de entre 7 y 10 días de duración sobre un sustrato de reproducción que comprende arcillas esmécticas en un porcentaje mayor del 52% respecto del peso total de dicho sustrato,
- c) interrumpir dicho riego durante un periodo igual o mayor de 20 días,
- d) eliminar la parte aérea de la planta y extraer el sustrato,
- e) molturar dicho sustrato a una temperatura entre 25 y 30°C para obtener dicho agente micorrizógeno.

En la presente invención se entiende por “inocular por recubrimiento” a recubrir directamente las semillas de la planta huésped con cepa pura del hongo micorrizógeno seleccionado, utilizando entre un 5 y un 40% del peso de la semilla a sembrar.

En la presente invención se entiende por “planta huésped” a la planta colonizada por el hongo formador de micorrizas y que alberga a su vez el hongo en sus raíces, y que está seleccionada de entre el grupo compuesto por *Lolium* spp., *Sorghum* spp., *Brachiaria* spp., *Penisetum* spp. y *Paspalum* spp.

ES 2 364 684 A1

En la presente invención se entiende por “sustrato de reproducción” a un sustrato sobre el que crece la planta huésped inoculada con un hongo formador de micorrizas y que comprende arcillas esmécticas en un porcentaje mayor del 52% respecto del peso total de dicho sustrato.

5 En la presente invención se entiende por “ciclos de riego” al tiempo que transcurre entre riegos. Dichos riegos aportan entre el 40 y el 50% de agua al cultivo para este tipo de sustrato evitando que se llegue al punto de marchitez.

10 En la presente invención se entiende por “molturar” a moler en un molino criogénico por sistema de enfriamiento de Nitrógeno líquido a una temperatura de trabajo entre 25 y 30°C.

15 El hecho de desarrollar un sistema de micorrización sobre un sustrato con las características de la arcilla de tipo Esméctica, provoca que existan placas microscópicas que se liberan en presencia de cantidades ínfimas de agua, dando lugar a la entrada de propágulos micorrízicos que van a enriquecer el sustrato, ya que las placas que componen dicha arcilla contienen abundantes iones de Na que suelen ser intercambiados muy fácilmente por otras moléculas que aporta el hongo micorrízico.

20 El hongo desarrolla durante la fase de sequía una fuerte producción de micelio externo que a su vez va aparejado de una gran producción de esporas y durante la aplicación de agua y de sequía, estos propágulos van enriqueciendo la estructura a medida que crece el cultivo.

La propia esmectita alcanza una gran viscosidad que unida a las propiedades del agente floculante es capaz de mantenerse en dispersión más fácilmente que una arcilla de otro tipo.

25 Las ventajas técnicas del uso de arcillas esmécticas en el procedimiento de la invención otorgan actividad inventiva a la presente invención.

El cultivo se realiza en camas de reproducción que tienen una altura inferior a 30 cm, donde se deposita el sustrato de reproducción y las semillas de las plantas huésped.

30 Durante el ciclo de reproducción del agente micorrizógeno, se riega con ciclos de humedad y sequía de entre 7 y 10 días de duración, aportando entre el 40 y el 50% de agua al cultivo para este tipo de sustrato, lo que favorece la producción de propágulos infectivos.

35 El cultivo se prolonga durante un período de más de 90 días de duración. Cuando faltan 20 días para que termine el cultivo, se procede a retirar el riego y secar lentamente sin que se le adicione nada de agua, de manera que se acelere la producción de propágulos paulatinamente, a medida que la planta va perdiendo toda la humedad. Se tapan los canteros con plásticos impermeables para evitar que se mojen en caso de lluvia.

40 Una vez seco, se elimina la parte aérea de la planta huésped y se procede a extraer el sustrato sólido que contiene una mezcla de propágulos micorrízicos (raicillas colonizadas, micelio fúngico y esporas de resistencia). El agente micorrizógeno contiene valores elevados de micelio externo en un rango entre 7 y 300 mg por g sustrato y esporas entre 120 y 300 esporas por g sustrato.

45 El producto una vez molturado se envasa mezclándolo previamente con goma xantano, o goma arábiga o carboximetil celulosa en un rango desde 0,2 hasta 5% de acuerdo a su lugar de aplicación, para que el producto se mantenga en suspensión durante la aplicación en los tanques de fertilización. De forma que una realización preferible es un procedimiento de la invención donde se añade al menos un agente floculante a dicho agente micorrizógeno. Una realización más es un procedimiento de la invención donde dicho agente floculante está seleccionado de entre el grupo compuesto por goma xantano, goma arábiga y carboximetil celulosa. Y otra realización es que dicho agente floculante esté a una concentración entre 0,2 y 5% respecto del peso total.

50 Los hongos formadores de micorrizas que se utilizan en la presente invención han sido seleccionados buscando que se establezca una asociación con la planta huésped, y que esta asociación sea muy efectiva. Se ha seleccionado un grupo de especies pertenecientes al género *Glomus* y se reproducen de manera individual cada vez que se realiza alguna reproducción, según el tipo de suelo en que se vayan a utilizar posteriormente como agente micorrizógeno. De forma que una realización preferible es un procedimiento de la invención donde dicho hongo está seleccionado de entre el grupo compuesto por *Glomus clarum*, *Glomus spurcum*, *Glomus manihotis*, *Glomus mosseae*, *Glomus etunicatum*, *Glomus fasciculatum*, *Glomus intarradices*, *Glomus hoi* y *Glomus sp.*

60 La planta huésped se inocula directamente por recubrimiento de sus semillas con cepa pura del hongo micorrizógeno seleccionado, utilizando la cantidad de agente micorrizógeno entre un 5 y un 40% del peso de la semilla a sembrar. De forma que una realización más es un procedimiento de la invención donde dicha inoculación se realiza con una cantidad de dicho hongo entre un 5% y un 40% respecto del peso de la semilla.

65 Para condiciones de suelos ácidos (entre 3.5 y 5.5 pH) se utiliza *Glomus clarum*, *Glomus spurcum*, *Glomus manihotis*, *Glomus mosseae*, *Glomus etunicatum* y otras especies del género *Glomus*. Para condiciones de suelos neutros y alcalinos (rango de pH entre 5.6 y 8.9) se utiliza *Glomus fasciculatum*, *Glomus intarradices*, *Glomus hoi*, y otras especies del género *Glomus*.

ES 2 364 684 A1

La planta huésped se selecciona de acuerdo a las necesidades de la simbiosis, periodo del año, pluviometría, clima, sustrato y necesidades nutricionales. De forma que una realización preferible es un procedimiento de la invención donde dicha planta huésped está seleccionada de entre el grupo compuesto por *Lolium* spp., *Sorghum* spp., *Brachiaria* spp., *Penisetum* spp. y *Paspalum* spp.

5 El sustrato de reproducción comprende exclusivamente arcillas o una mezcla que comprende diversos materiales como son: arcillas esmécticas dioctaédrica o trioctaédricas entre 52 y 72,7%, materia orgánica (que puede estar introducida o contenida en forma de limo) entre 25 y 40%, arena sílice entre 2 y 5%, ácidos fúlvicos entre 0,2 y 2% y ácidos húmicos entre 0,1 y 1%, respecto del peso total del sustrato. De forma que una realización preferible es un
10 procedimiento de la invención donde dicho sustrato de reproducción comprende arcillas esmécticas entre 52 y 72,7%, materia orgánica entre 25 y 40%, arena sílice entre 2 y 5%, ácidos fúlvicos entre 0,2 y 2% y ácidos húmicos entre 0,1 y 1%, respecto del peso total del sustrato, donde la suma de todos los porcentajes no supera el 100%. Una realización más es un procedimiento de la invención donde dichas arcillas esmécticas están seleccionadas de entre el grupo compuesto por Montmorillonita, Beidellita y Nontronita. Y otra realización es un procedimiento de la invención donde
15 dicha materia orgánica es limo.

La molturación se realiza utilizando un molino criogénico por sistema de enfriamiento de Nitrógeno líquido que garantiza una temperatura de trabajo entre 25 y 30°C y un tamaño de partícula por debajo de las 100 µm, lo cual le permite posteriormente aplicarlo a través de los sistemas de riego sin que se quede material biológico en los filtros de las instalaciones, por lo general de 120 µm o superiores. De forma que una realización más es un procedimiento de la invención donde dicha molturación se realiza por enfriamiento con nitrógeno líquido. Y otra realización es un procedimiento de la invención donde dicho agente micorrizógeno presenta un tamaño de partícula inferior a 100 µm.

La molturación conlleva multiplicar la cantidad de fragmentos de hifas con una elevada capacidad de multiplicación que garantiza valores de hifas en un rango de infectividad determinado por el método de Porter entre $0,1 \times 10^3$ y $1,2 \times 10^5$, poblaciones de esporas de *Glomus* que contengan esporas en un rango de 100 a 60 µm y fragmentos de raicillas colonizadas, restos de hifas intracelulares con elevada capacidad colonizadora, obteniéndose un agente micorrizógeno con todas las potencialidades biológicas desarrolladas.

30 Otra realización de la invención es un agente micorrizógeno obtenido según el procedimiento de la invención.

El modo de aplicación del agente micorrizógeno depende del tipo de planta y cultivo. A modo de ejemplo, se indica el modo de aplicación en algunos casos concretos:

- 35 - En la producción de viveros de cítricos y frutales: aplicación localizada debajo de las semillas de 10 g de producto/bolsa.
- En los cultivos de hortalizas tanto en calle como en invernaderos: aplicar 3 kg/hectárea en el tanque de fertirri-
40 gación.
- En los cereales sembrados con máquinas: recubrir la semilla correspondiente a sembrar en una hectárea entre 3 y 5 kg.
- 45 - En las plantaciones de cítricos, frutales y olivares establecidas: se inoculan en el caso de riego localizado a través del tanque de fertiriego 5 kg/hectárea.
- En las plantaciones establecidas en secano: se aplica a razón de 100 g por árbol, de forma localizada en las zonas de goteo.
- 50 - En las plataneras: se aplica a razón de 100 g/plantón, al término de la cosecha.

De forma que una realización preferible es el uso del agente micorrizógeno obtenido según el procedimiento de la invención como emulsionante para el riego de una planta. Otra realización preferible es el uso de la invención para su aplicación por debajo o por recubrimiento de la semilla de una planta. Y otra realización preferible es el uso de la
55 invención para la aplicación sobre el suelo que rodea a una planta. Otra realización es el uso de la invención donde dicha planta está seleccionada de entre el grupo compuesto por hortaliza, cítrico, frutal, olivo, cereal y platanera.

El agente micorrizógeno es un producto listo para ser aplicado en campo a través de los sistema de riego localizado, garantizando que llegue a las plantas con todos los propágulos micorrízicos y en especial el micelio extramático que por su elevada capacidad regeneradora una vez aplicados en el sistema de riego, son capaces de promover la colonización micorrízica de forma rápida sin tener la dormancia de las esporas, lo cual le confiere una fuerte capacidad colonizadora, desarrollando una respuesta positiva en los cultivos.

65 El agente micorrizógeno presenta una viabilidad comprobada de 24 meses y puede ser aplicado a través de los sistemas de fertiriego, lográndose una distribución homogénea, comprobada por experimentos a distintas escalas. Este hecho ha garantizado una exitosa inoculación en todas las plantas bajo el sistema de riego, lo cual se traduce en un incremento significativo en los rendimientos.

Modos de realización preferente

Materiales y métodos comunes a todos los ejemplos

5 *Medidas de la colonización micorrízica*

Se analizó la intensidad micorrízica a partir del análisis de raicillas de plantas. Estas raicillas fueron lavadas y se utilizaron dos métodos de detección, uno basado en una tinción no vital, con azul de tripano y un método histoquímico con colorante vital a base de sales de tetrazolium que expresa la actividad succinato deshidrogenasa. Estos métodos permitieron comparar la cantidad de biomasa fúngica viva dentro del sistema micorrízico. En todos los casos las muestras fueron observadas en un microscópico estereoscópico y un microscopio compuesto, Olympus.

Medidas de intercambio gaseoso y eficiencia en el uso del agua

15 Se midieron los parámetros de intercambio gaseoso (fotosíntesis neta (Fn) y conductancia estomática (Gs)) en las plantas, utilizando el LICOR LI-6400 Portable Photosynthesis System. Todas las medidas se realizaron a mediodía solar y una semana después de la aplicación de los productos. La eficiencia en el uso del agua (EUA) se determinó por el cociente Fn/Gs.

20 Ejemplo 1

Efecto del riego sobre la calidad de los propágulos micorrízicos del agente micorrizógeno

Se determinó el efecto del estrés de sequía en el desarrollo de *Lolium perenne* y los propágulos micorrízicos durante el desarrollo del agente micorrizógeno. Las semillas de *Lolium perenne* se inocularon con el hongo *Glomus sp.* sobre un sustrato de reproducción esmectita (60%): limo (35%): arena (5%).

La evolución de los diferentes componentes de la simbiosis micorrízicas, durante el ciclo del desarrollo del inoculante, arrojó que el desarrollo micorrízico se ve favorecido por ciclos de riego entre 7 y 10 días aportando el 50% de agua al cultivo para este tipo de sustrato (50%), en vez de aportando el 100% (Tabla 1).

TABLA 1

Influencia de los ciclos de riego en la producción de inoculantes micorrízicos a los 15, 30, 60 y 120 días de cultivo de Lolium perenne inoculado con Glomus sp. Ciclos de riego: Riego al 100% cada 2 días, Riego al 50% entre 7 y 10 días.

Días de Sembrado	15		30		60		120	
	R 100	R50	R 100	R 50	R 100	R 50	R 100	R 50
ME mg/g suelo	25	24	15 b	32,1 a	46.3 b	162,6 a	70.2 b	300.2 a
Esporas/g suelo	125	129	30 b	24 a	66 b	114 a	100 b	300 a
Colonización fúngica	11,2	10,2	25,3 b	26,5 a	45,2 b	55,6 a	50,2	52,3

ME: Micelio externo. R50: Riego al 50%. R100: Riego al 100%. Letras iguales en la misma fila no presentan diferencias significativas para $p \geq 0.001$.

Ejemplo 2

55 *Respuesta fisiológica y nutricional del melón a diferentes dosis de agente micorrizógeno bajo diferentes condiciones de fertirrigación*

Se utilizaron plantas de melón creciendo en un invernadero con sistema de enfriamiento tipo cooling, ubicado en la finca experimental del Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS-CSIC), Murcia, España. Ciento veinte plantas jóvenes procedentes de vivero, fueron trasplantadas a macetas de 5 L de capacidad que contenían un sustrato compuesto de suelo procedente de un campo de cultivo próximo.

Se utilizó un diseño experimental del tipo completamente aleatorizado, con doce tratamientos y 10 observaciones por variante. Los tratamientos estudiados fueron los siguientes:

65 T1: Fertilización completa (100%) + Riego completo (100%)

T2: Fertilización completa (100%) + Riego completo (100%) + Micorrizas

ES 2 364 684 A1

- T3: Fertilización reducida (70%) + Riego completo (100%)
- T4: Fertilización reducida (70%) + Riego completo (100%) + Micorrizas
- 5 T5: Fertilización baja (50%) + Riego completo (100%)
- T6: Fertilización baja (50%) + Riego completo (100%) + Micorrizas
- T7: Fertilización completa (100%) + Riego reducido (70%)
- 10 T8: Fertilización completa (100%) + Riego reducido (70%) + Micorrizas
- T9: Fertilización reducida (70%) + Riego completo (70%)
- T10: Fertilización reducida (70%) + Riego completo (70%) + Micorrizas
- 15 T11: Fertilización baja (50%) + Riego completo (70%)
- T12: Fertilización baja (50%) + Riego completo (70%) + Micorrizas.

20 La aplicación de los nutrientes y del agente micorrizógeno se llevó a cabo a través del propio sistema de fertiriego, mediante un sistema de inyección específico que permitió realizar los distintos tratamientos de modo diferencial y simultáneo.

25 Las medidas de colonización micorrízica, el crecimiento vegetal, los valores de intercambio gaseoso y los valores de clorofila fueron medidos a los treinta y sesenta días después de la aplicación de los tratamientos.

30 Los resultados obtenidos han permitido comprobar que a los treinta días de ensayo, el porcentaje de colonización micorrízica en todos los tratamientos con agente micorrizógeno estaba en torno al 20-25%, frente a los valores próximos a 2% observados en los tratamientos control. Este porcentaje de colonización estuvo muy bien correlacionado con la cantidad de micelio observado a nivel radicular (Tabla 2).

35 A los treinta días de tratamiento también se pudo observar que tanto el peso fresco, como el peso seco por planta se vio significativamente incrementado por la presencia de micorrizas, independientemente del tratamiento de fertirrigación utilizado (Tabla 2).

TABLA 2

Peso fresco (g/planta), peso seco (g/planta), % colonización y micelio en plantas de melón sometidas a diferentes tratamientos de fertirrigación (100-70 Agua, 100-70-50 Fertilizantes) e inoculación de micorrizas (M). Registros tomados a los 30 días de aplicación de los tratamientos

Tratamientos	P fresco	P seco	% Colonización	Micelio
1 (100A100F)	347,00	37,93	2,75	0,006
2 (100A100F) M	397,2	48,62	20,5	0,293
3 (100A70F)	432,25	45,53	3,50	0,018
4 (100A70F) M	455	52,8	28,5	0,319
5 (100A 50F)	449,50	46,25	2,25	0,005
6 (100A 50F) M	388,4	47,28	22,5	0,256
7 (70 A 100F)	344,50	34,63	2	0,011
8 (70 A 100F) M	376,4	40,02	29,00	0,313
9 (70 A 70F)	346,75	34,10	4,25	0,021
10 (70 A 70 F) M	375,2	35,06	25,00	0,291
11 (70 A 50F)	388,00	39,83	2,25	0,005
12 (70 A 50F) M	392,4	34,58	19,00	0,188

ES 2 364 684 A1

La evolución de determinados parámetros de intercambio gaseoso como la Fotosíntesis Neta (Fn) y el nivel de conductancia estomática (Gs), también se vieron sensiblemente afectados por los efectos de los tratamientos, especialmente después de 60 días de aplicación de los mismos (Tabla 3). Los valores de fotosíntesis fueron siempre más elevados en las plantas micorrizadas, aún cuando estas estuviesen expuestas a condiciones de riego y fertilización reducidas. De hecho, el valor más elevado de fotosíntesis después de 60 días de aplicación de tratamiento fue el encontrado en el tratamiento bien regado, con un nivel bajo de fertilización, pero micorrizado (Tabla 3).

TABLA 3

Efectos de los tratamientos de fertirrigación y micorrizas sobre la fotosíntesis neta (Fn) ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) y la conductancia estomática (Gs) ($\mu\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) a los 30 y 60 días de aplicación de los tratamientos

Tratamientos	30 días		60 días	
	Fn	Gs	Fn	Gs
1 (100A100F)	13,7 ± 4,35	0.247 ± 0.106	7.86 ± 0.88	0.12 ± 0.12
2 (100A100F) M	24.69 ± 4.80	0.497 ± 0.241	8.39 ± 1.66	0.12 ± 0.04
3 (100A70F)	12.65 ± 2.4	0.272 ± 0.078	5.13 ± 1.07	0.07 ± 0.02
4 (100A70F) M	24.26 ± 4.67	0.491 ± 0.182	9.18 ± 0.13	0.13 ± 0.01
5 (100A 50F)	28.34 ± 2.62	0.503 ± 0.058	5.60 ± 2.52	0.10 ± 0.04
6 (100A 50F) M	10.79 ± 0.86	0.104 ± 0.010	10.83 ± 0.8	0.14 ± 0.04
7 (70 A100F)	9.13 ± 0.10	0.076 ± 0.001	5.64 ± 2.23	0.15 ± 0.03
8 (70 A100F) M	9.10 ± 0.49	0.071 ± 0.004	6.73 ± 1.42	0.12 ± 0.04
9 (70 A70F)	8.52 ± 2.82	0.079 ± 0.014	4.60 ± 0.01	0.02 ± 0.01
10 (70 A70 F) M	9.65 ± 4.56	0.115 ± 0.106	5.24 ± 0.19	0.06 ± 0.01
11 (70 A50F)	6.73 ± 0.08	0.038 ± 0.001	6.67 ± 2.95	0.16 ± 0.07
12 (70 A50F) M	9.73 ± 0.79	0.097 ± 0.031	9.61 ± 1.83	0.11 ± 0.04

Esta evolución de la fotosíntesis tuvo que ver con la concentración de clorofilas medidas en los diferentes tratamientos tras 30 y 60 días de ensayo, en donde se aprecia también claramente el aumento del parámetro SPAD, que expresa la concentración de clorofila medida a través de espectroscopia y se expresa en unidades de SPAD. (Tabla 4).

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 364 684 A1

TABLA 4

	Tratamientos	30 días	60 días	Tratamientos	30 días	60 días
		SPAD	SPAD		SPAD	SPAD
5	1 (100A100F)	50,48	31,8	7 (70 A100F)	48,64	36,59
10	2 (100A100F)	52,67	40,14	8 (70 A100F) M	51,26	45
	M					
	3 (100A70F)	41,4	30,56	9 (70 A70F)	43,96	36,24
15	4 (100A70F)	47,7	49,06	10 (70 A70 F) M	45,7	41,77
	M					
	5 (100A 50F)	38,52	33,15	11 (70 A50F)	39,35	34,4
20	6 (100A 50F)	42,7533	40,86	12 (70 A50F) M	44,1267	55,6
	M					

25 Ejemplo 2

Ensayos de campo con lechuga, tomate de invernadero, tomate de industria y pimiento de invernadero

30 El ensayo en campo con lechuga fue ejecutado en la localidad de Roche, Campo de Cartagena, con una dosis de agente micorrizógeno por ha de 3 kg, un abonado del 100% y el riego según las necesidades del cultivo.

35 Con la aplicación del agente micorrizógeno se logró un mayor calibre (9-10) con respecto al control bajo el protocolo comercial, (11-12), así como mayores pesos y diámetro ecuatorial. La evolución de la micorrización fue positiva, incrementándose a través del tiempo hasta alcanzar valores de 29.5%, en contraste con la nativa que apenas alcanzó más allá del 2% (Tablas 5 y 6).

TABLA 5

Desarrollo vegetal de la lechuga

Tratamiento	Peso de los cogollos (g)	Diámetro ecuatorial (cm)	Calibre
45 Testigo	583.30	12.76a	11-12
50 Agente micorrizógeno	747.70	14.28b	9-10

TABLA 6

Evolución de la colonización micorrízica

Tratamientos	M1 (30 d)	M2 (50 d)	M3 70 d
60 Control	0 a	1.68 a	1.19 a
65 Agente micorrizógeno	3.26 b	16.78 b	29.50 b

Letras iguales en la misma columna no presentan diferencias significativas para $p \geq 0.001$.

ES 2 364 684 A1

En un segundo ensayo con lechuga, se evaluó la efectividad de la aplicación del agente micorrizógeno frente a diferentes dosis de riego. De forma general la aplicación del agente micorrizógeno generó mayores valores absolutos que sus homólogos sin tratar, lo cual pone de manifiesto una mayor efectividad en su funcionamiento tanto fisiológico como de producción de biomasa con mayor productividad (Tabla 7).

Quizás el dato más relevante fue la falta de diferencias entre el tratamiento micorrizado con solo el 70% del aporte hídrico con el tratamiento control con el 100% del riego, lo cual significa un ahorro sustancial del elemento agua en presencia de un producto eficiente.

TABLA 7

Efecto de dosis de riego (100, 70 y 30% de las necesidades hídricas diarias) en el cultivo de la lechuga

Tratamientos		Fotosíntesis	Eficiencia del uso del agua	Peso del Cogollo (g)	Colonización Micorrízica (%)
Agente micorrizógeno	100	10.16 a	131.23 a	365.56 e	69.50 f
	70	2.32 bc	57.72 b	236.08 cd	48.50 de
	30	-0.20 e	-23.68 d	146.95 ab	24.00 b
Control	100	3.52 bc	75.57 bc	282.34 d	2.00 a
	70	0.22 d	-31.64 d	176.07 bc	4.25 a
	30	-0.48 e	-124.01 e	106.57 a	4.00 a

Letras iguales en la misma columna no presentan diferencias significativas para $p \geq 0.001$.

Los resultados alcanzados en el tomate de invernadero y de industria fueron muy similares a los obtenidos en lechugas. En ambos casos, se produjo un incremento en la producción, número de frutos y biomasa seca, así como elevados porcentajes de micorrización (Tablas 8 y 9).

En el caso del tomate de industria, no solo se obtuvo un mayor rendimiento, sino que las plantas tratadas con agente micorrizógeno produjeron mayores ° Brix y una mayor concentración de clorofila, expresado a través del SPAD, derivado de la fuerte asociación que se establece entre el hongo y la planta resultando una mayor tasa fotosintética a favor de la simbiosis micorrízica (Tabla 9).

TABLA 8

Efecto de la aplicación de agente micorrizógeno sobre el desarrollo de plantas de tomate en Invernadero

	No Racimos	No Frutos	Peso fruto (g)	Biomasa fresca (g)	Colonización Micorrízica (%)
Control	13	53	2646,1	1253,6	5,3
Agente micorrizógeno	15	72	4419,4	1569,5	28,5

ES 2 364 684 A1

TABLA 9

Efecto de la aplicación de agente micorrizógeno sobre la producción de biomasa y el rendimiento, Brix y clorofila (SPAD) de plantas de tomate de industria

Tratamientos	Parcelas	Biomasa Fresca Foliar (g)	Biomasa Fresca Raiz (g)	Rendimiento (Kg. Planta ⁻¹)	Brix	SPAD
Testigo	P1	941,7	90,3	3267,4	4	35,7
	P2	906,4	72,1	4451	3,9	35,99
		924,05	81,2	3859,2	3,95	35,845
Agente micorrizógeno	P1	1536,7	132	5566,2	4,1	45,03
	P2	1328	153	5617,3	4,2	48,23
		1432,35	142,5	5591,75	4,15	46,63

Finalmente se estudió el efecto de la aplicación de agente micorrizógeno sobre el desarrollo del pimiento en invernadero. Las plantas inoculadas no solo produjeron mayores kg de pimiento por metro cuadrado, sino que se logró un mayor porcentaje de calibres extra y primera, favoreciendo la rentabilidad del cultivo (Tabla 10).

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 364 684 A1

TABLA 10

Categoría		Kg	Frutos
Testigo	Extra	38,20	162
	Primera	70,27	314
	Segunda	69,17	377
	Tercera	29,68	197
	Cuarta	0,00	0
	Quinta	6,41	56
	Sexta	26,66	248
	Totales	240,39	1.354
Kg. por m ²		9,34	
Categoría		Kg	Frutos
Agente micorrizógeno	Extra	39,16	159
	Primera	90,66	400
	Segunda	69,41	378
	Tercera	33,99	225
	Cuarta	0,00	0
	Quinta	8,94	77
	Sexta	29,11	267
	Totales	271,27	1.506
Kg. por m ²		10,54	

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de obtención de un agente micorrizógeno, que comprende:

- a) inocular por recubrimiento una semilla de una planta huésped con al menos un hongo formador de micorrizas del género *Glomus*,
- b) cultivar dicha planta en ciclos de riego de entre 7 y 10 días de duración sobre un sustrato de reproducción que comprende arcillas esmécticas en un porcentaje mayor del 52% respecto del peso total de dicho sustrato,
- c) interrumpir dicho riego durante un periodo igual o mayor de 20 días,
- d) eliminar la parte aérea de la planta y extraer el sustrato,
- e) molturar dicho sustrato a una temperatura entre 25 y 30°C para obtener dicho agente micorrizógeno.

2. Procedimiento según reivindicación 1, **caracterizado** por que se añade al menos un agente floculante a dicho agente micorrizógeno.

3. Procedimiento según reivindicación 2, **caracterizado** por que dicho agente floculante está seleccionado de entre el grupo compuesto por goma xantano, goma arábica y carboximetil celulosa.

4. Procedimiento según reivindicación 3, **caracterizado** por que dicho agente floculante está a una concentración entre 0,2 y 5% respecto del peso total.

5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado** por que dicho hongo está seleccionado de entre el grupo compuesto por *Glomus clarum*, *Glomus spurcum*, *Glomus manihotis*, *Glomus mosseae*, *Glomus etunicatum*, *Glomus fasciculatum*, *Glomus intarradices*, *Glomus hoi* y *Glomus* sp.

6. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizado** por que dicha inoculación se realiza con una cantidad de dicho hongo entre un 5% y un 40% respecto del peso de la semilla.

7. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizado** por que dicha planta huésped está seleccionada de entre el grupo compuesto por *Lolium* spp., *Sorghum* spp., *Brachiaria* spp., *Penisetum* spp. y *Paspalum* spp.

8. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizado** por que dicho sustrato de reproducción comprende arcillas esmécticas entre 52 y 72,7%, materia orgánica entre 25 y 40%, arena sílice entre 2 y 5%, ácidos fúlvicos entre 0,2 y 2% y ácidos húmicos entre 0,1 y 1%, respecto del peso total del sustrato, donde la suma de todos los porcentajes no supera el 100%.

9. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, **caracterizado** por que dichas arcillas esmécticas están seleccionadas de entre el grupo compuesto por Montmorillonita, Beidellita y Nontronita.

10. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, **caracterizado** por que dicha materia orgánica es limo.

11. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, **caracterizado** por que dicha molturación se realiza por enfriamiento con nitrógeno líquido.

12. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, **caracterizado** por que dicho agente micorrizógeno presenta un tamaño de partícula inferior a 100 μm .

13. Agente micorrizógeno obtenido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.

14. Uso del agente micorrizógeno según reivindicación 13 como emulsionante para el riego de una planta.

15. Uso del agente micorrizógeno según reivindicación 13 para su aplicación por debajo o por recubrimiento de la semilla de una planta.

16. Uso del agente micorrizógeno según reivindicación 13 para la aplicación sobre el suelo que rodea a una planta.

17. Uso del agente micorrizógeno según cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16, **caracterizado** por que dicha planta está seleccionada de entre el grupo compuesto por hortaliza, cítrico, frutal, olivo, cereal y platanera.



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②¹ N.º solicitud: 201130566

②² Fecha de presentación de la solicitud: 11.04.2011

③² Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤¹ Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	EP 1840110 A1 (INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS AGRÍCOLAS (INCA)) 03.10.2007, todo el documento.	1-17
A	EP 0314439 A2 (NATIVE PLANTS INCORPORATED) 03.05.1989, todo el documento.	1-17
A	US 5178642 (CAROL A. JANERETTE) 12.01.1993, todo el documento.	1-17
A	US 4294037 (NATIONAL RESEARCH DEVELOPMENT CORPORATION) 13.10.1981, todo el documento.	1-17
A	WO 2009090220 A1 (UNIVERSITE CATHOLIQUE DE LOUVAIN) 23.07.2009, todo el documento.	1-17

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones n.º:

Fecha de realización del informe
26.08.2011

Examinador
M. García Coca

Página
1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C12N1/14 (2006.01)

A01G1/04 (2006.01)

A01N63/04 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12N, A01G, A01N

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 26.08.2011

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-17	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-17	SI
	Reivindicaciones	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	EP 1840110 A1 (INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS AGRÍCOLAS (INCA))	03.10.2007
D02	EP 0314439 A2 (NATIVE PLANTS INCORPORATED)	03.05.1989
D03	US 5178642 (CAROL A. JANERETTE)	12.01.1993
D04	US 4294037 (NATIONAL RESEARCH DEVELOPMENT CORPORATION)	13.10.1981
D05	WO 2009090220 A1 (UNIVERSITE CATHOLIQUE DE LOUVAIN)	23.07.2009

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

El objeto de la invención tal y como se recoge en las reivindicaciones 1-17, es un procedimiento para la obtención de un agente micorrizógeno, basado en inocular por recubrimiento una semilla de una planta huésped con un hongo del género *Glomus*, cultivar dicha planta en un sustrato con arcillas esméticas en ciclos de riego, eliminar la parte aérea de la planta, extraer el sustrato y molturarlo para obtener dicho agente micorrizógeno (reiv. 1-12). Es también objeto de la invención el propio agente micorrizógeno (reiv. 13) y sus usos (reiv. 14-17).

Novedad y Actividad Inventiva (art. 6.1 y 8.1 Ley 11/1986 de Patentes)

El documento D01 divulga un proceso para la obtención de un inóculo líquido de hongos micorrizógenos. El proceso consiste en sembrar la planta huésped en un sustrato reproductivo e inocular las semillas con el hongo por debajo de las mismas. Al finalizar el ciclo de la planta la parte aérea se elimina, se extrae el sustrato y por métodos de decantación se extraen los propágulos del hongo, se centrifuga y posteriormente los distintos componentes del agente micorrizógeno se separan y se les añade una solución acuosa, obteniendo de esta forma el inóculo líquido (ver columna 3 línea 39 - columna 4 línea 45).

El documento D02 divulga un procedimiento para la obtención de inóculos de agentes micorrizógenos. Los propágulos (por ejemplo fragmentos de raíces de hongos micorrizógenos) se producen mediante su asociación con las raíces de las plantas huésped y son posteriormente recogidos de los sustratos de cultivo. Una vez aislados, se cortan en fragmentos junto con un emulsionante o floculante para obtener, de esta forma el inóculo (ver página 3 línea 51 - página 4 línea 3).

El documento D03 divulga un método para la producción de agentes micorrizógenos, basado en crecer el micelio del hongo seleccionado, en cultivo o en un medio sólido (de agar), y todo ello se añade, libre de contaminación, a unos recipientes con perlita y una solución nutritiva para el cultivo de los micelios *in vitro*. Tras unos 3 meses de incubación, se obtiene el producto listo para ser usado (ver columna 2 líneas 18-48).

El documento D04 divulga un proceso para la producción de hongos micorrizógenos en raíces de plantas en cultivo sin sustrato, estando las raíces de dichas plantas bañadas con una solución nutritiva. Posteriormente las raíces son cortadas en pequeños fragmentos para obtener el inóculo y poder ser utilizado para aplicarlo en distintas plantas.

El documento D05 divulga un procedimiento para la producción de hongos micorrizógenos *in vitro*, basado en el crecimiento del hongo en simbiosis con una planta pre-micorrizada y libre de contaminación microbiana, en una solución nutritiva. Tras 2 o 3 meses se recoge el hongo y se separa de la planta y se corta en fragmentos mediante un homogenizador, donde cada fragmento representa un propágulo. Por otro lado se recogen las semillas, que se pueden combinar con los propágulos para posteriormente inocular distintas plantas (ver página 2 línea 12 - página 5 línea 22).

Ninguno de los documentos del estado de la técnica anterior a la solicitud, tomados solos o en combinación revelan la invención definida en las reivindicaciones 1-17. Además, en los documentos citados no hay sugerencias que dirijan al experto en la materia hacia la invención definida en dichas reivindicaciones. Así, la invención contenida en las reivindicaciones 1-17 es con referencia a los documentos D01-D05 nueva y se considera que implica actividad inventiva (art. 6.1 y 8.1 Ley 11/1986 de Patentes).