

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 376 363**

51 Int. Cl.:

**C05F 3/00** (2006.01)

**C05F 11/08** (2006.01)

**A01G 1/04** (2006.01)

**A01N 63/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07731464 .9**

96 Fecha de presentación: **16.05.2007**

97 Número de publicación de la solicitud: **2043968**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **08.04.2009**

54 Título: **NUEVAS COMPOSICIONES DE INÓCULOS FÚNGICOS, SU PROCEDIMIENTO DE PREPARACIÓN Y SU APLICACIÓN PARA LA MEJORA DEL CRECIMIENTO DE LOS CULTIVOS.**

30 Prioridad:  
**25.07.2006 FR 0606794**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**13.03.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**13.03.2012**

73 Titular/es:  
**INSTITUT DE RECHERCHE POUR LE DÉVELOPPEMENT (IRD)  
213, RUE LA FAYETTE  
75480 PARIS CEDEX 10, FR**

72 Inventor/es:  
**DUPONNOIS, Robin**

74 Agente/Representante:  
**Curell Aguilá, Mireia**

**ES 2 376 363 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Nuevas composiciones de inóculos fúngicos, su procedimiento de preparación y su aplicación para la mejora del crecimiento de los cultivos.

5 La presente invención se refiere a nuevas composiciones de inóculos fúngicos, a su procedimiento de preparación y a su aplicación para la mejora del crecimiento de los cultivos.

La micorrización es una asociación de beneficio mutuo entre un vegetal y un hongo micorrízico.

10 La importancia de los hongos micorrízicos en las plantaciones forestales se ha demostrado por primera vez en 1910 en unos ensayos de introducción de pinos exóticos en Kenia. Mientras que estas plantaciones se saldaban generalmente en fracasos espectaculares (plantaciones cloróticas, mortalidad muy elevada), bajo los consejos de la "Royal Botanic Gardens", se importó suelo de viejas plantaciones de pinos desde África del sur con el fin de ser  
15 utilizado como sustrato de cultivo en vivero.

En efecto, este suelo contenía unas micorrizas que son unos órganos mixtos situados sobre las raíces de los vegetales, formados por la yuxtaposición de dos tipos de organismos: la planta superior y los filamentos micélicos subterráneos del hongo. Los hongos extraerán del suelo los elementos minerales, y más particularmente los menos móviles tales como el zinc, el cobre y el fósforo que procurarán a la planta, indispensables para el desarrollo de ésta. En cambio, la planta proporciona al hongo azúcares y sustancias de crecimiento que aseguran su supervivencia. Las micorrizas desempeñan un papel importante en la asimilación de ciertas formas de nitrógeno así como en la absorción del agua del suelo.

25 Esta técnica que utiliza un suelo rico en propágulos fúngicos micorrízicos fue rápidamente dada a conocer con éxito en otros países de África tales como Tanzania, Uganda, Malawi, etc.

Desde entonces, se han desarrollado varias técnicas de micorrización y la que utiliza unos hongos micorrízicos solos se basa a partir de ahora en las etapas siguientes: (i) Aislar y purificar cepas fúngicas, (ii) seleccionar cepas en condiciones controladas de cepas fúngicas de altas prestaciones para un parámetro dado (por ejemplo: efecto de la cepa sobre el crecimiento de la planta hospedante) y (iii) multiplicar la cepa en condiciones axénicas y producir inóculos fúngicos.

35 Se distinguen dos tipos de hongos micorrízicos, los hongos ectomicorrízicos que se refieren esencialmente a las esencias forestales y los hongos endomicorrízicos que se refieren a las especies vegetales herbáceas.

En lo que se refiere a los hongos ectomicorrízicos, se han ensayado dos formulaciones de sustancias inoculadas y han mostrado unos efectos espectaculares en vivero: (i) el inóculo de tipo turba-vermiculita y (ii) el inóculo de tipo bolas de alginato de calcio.

40 Se ha desarrollado asimismo otra técnica que utiliza bacterias micorrízicas, en particular en la patente US nº 5.935.839. Esta patente describe unas composiciones de inóculo que comprenden unas cepas de bacterias micorrízicas (*Arthrobacter sp*, *Pseudomonas fluorescent*) para favorecer el crecimiento de los coníferos.

45 Se conoce asimismo una tercera técnica que utiliza una asociación de hongos micorrízicos. Así, la patente FR 2 678 281 describe la utilización de un inóculo fúngico de tipo turba-vermiculita que comprende un hongo ectomicorrízico (*L. lacacata* 10% (v:v)) en asociación con una bacteria (*Bacillus*, *Pseudomonas fluorescent*).

50 La patente US nº 6.133.196 describe la utilización de un inóculo fúngico de tipo turba-vermiculita-perlita que comprende un hongo ectomicorrízico (*Heleboma arenosa* o *Laccaria bicolor*) en asociación con una bacteria (*Streptomyces*, *Pseudomonas diminuta*).

Se ha descrito asimismo una última técnica que comprende una asociación de hongo micorrízico con otros componentes y es objeto por ejemplo de la patente FR 2 865 897 que se refiere a la producción de inóculos fúngicos que comprenden un hongo endomicorrízico en asociación con un agente estimulante (sorgolactona, dimetilsorgolactona, alectrol, estrigol y orbancol). La patente EP 0 209 627 se refiere a un procedimiento de preparación de hongos endomicorrízicos en asociación con unos cultivos de órganos de raíces sobre un soporte poroso constituido por vermiculita sola o en asociación con turba.

60 Por último, una publicación de Duponnois R. *et al.* (FEMS Microbiology Ecology, 2006, 56:292-303) describe la utilización de hongos ectomicorrízicos en asociación con polvo de termiteros para la mejora del crecimiento de las plantaciones forestales. La composición descrita comprende un hongo ectomicorrízico. Esta composición se utiliza en la dosis importante de 1.000 ml por grano o planta.

65 Otra publicación de Duponnois R. *et al.* (Geoderma, 2005, 124:349-361) describe la utilización de polvo de termiteros como agente estimulante de la micorrización de cultivos. Como las termitas utilizan unos fungus para

digerir los residuos que acumulan, este documento describe la utilización de una composición que comprende un inóculo fúngico y polvo de termitero como agente estimulante de la micorrización.

5 Sin embargo, todas estas técnicas adolecen de varios inconvenientes, de los cuales el principal es la producción en gran cantidad del inóculo que necesita un material relativamente sofisticado, que tiene un coste, por ejemplo para operaciones de reforestación, incompatibles con los presupuestos concedidos generalmente para este tipo de operación y más particularmente en los países del sur. Además, el inóculo fúngico de tipo turba-vermiculita o bola de alginato se produce generalmente en tarros de vidrio o en bolsas de plástico, que ocupan un volumen importante y cuyo transporte se debe efectuar respetando la cadena de frío.

10 Uno de los objetivos de la invención es proporcionar una composición de inóculo fúngico que se puede utilizar como estimulante de la micorrización de cultivos que tiene una formulación tal que se pueda utilizar a dosis claramente inferiores a las utilizadas clásicamente.

15 Otro objetivo de la presente invención es proporcionar unas composiciones de inóculo fúngico adaptables a los dos tipos de simbiosis micorrízica (ectomicorrízica y endomicorrízica), lo cual permite la producción de plantas micorrizadas de una amplia gama de especies vegetales, que va desde los árboles frutales hasta las plantas forestales, al contrario del estado de la técnica, en el que las técnicas utilizadas son válidas sólo para un tipo de micorrización.

20 Uno de los otros objetivos de la presente invención es proporcionar unas composiciones de inóculo fúngico en las que la asociación de dos hongos ectomicorrízicos y endomicorrízicos permite estimular el crecimiento de las esencias leñosas de crecimiento rápido de los géneros *Casuarina*, *Allocasuarina*, *Eucalyptus* y *Acacia* de origen australiano.

25 Otro objetivo de la invención es proporcionar un procedimiento de estimulación de la micorrización tal que permita evitar las pérdidas de propágulos fúngicos registrados habitualmente en las técnicas clásicas de micorrización.

30 La presente invención se refiere a la utilización de por lo menos un inóculo fúngico y de polvo de termiteros, como agente estimulante de la micorrización de cultivos en particular forestales, de cereales, forrajeros, de hortalizas; frutícola u horticola, siendo dicho inóculo utilizado a una dosis por elemento unitario de cultivo, en particular semilla o planta, de aproximadamente por lo menos diez veces inferior a la dosis utilizada en ausencia de polvo de termiteros.

35 En la presente invención, se ha descubierto que la asociación de polvo de termiteros con un inóculo fúngico permite reducir considerablemente las dosis de inóculo utilizadas para la micorrización y favorecer así la reforestación, en particular de zonas tropicales y mediterráneas en las que la práctica de la micorrización controlada se justifica totalmente (suelos con carencias y erosionados, desertificación avanzada, conservación de la biodiversidad amenazada por las actividades antropogénicas, etc.), disminuyendo considerablemente su coste.

40 Debido a la dosis utilizada, una primera ventaja de la presente invención es favorecer la reforestación, en particular de las zonas tropicales y mediterráneas en las que la práctica de la micorrización controlada se justifica totalmente (suelos con carencias y erosionados, desertificación avanzada, conservación de la biodiversidad amenazada por las actividades antropogénicas, etc.), disminuyendo considerablemente su coste. Además, la baja cantidad de polvo de termitero utilizada (1% a 10% v:v) en la presente invención evita el riesgo de despoblamiento de regiones enteras de sus nidos de termitas.

45 La expresión "elemento unitario de cultivo" designa en la presente memoria una semilla, una simiente, un grano, una fruta, una pepita, un hueso o una planta sin estar limitado a los mismos, que permite obtener un cultivo forestal, de cereales, forrajero, de hortalizas, frutícola u horticola.

50 La dosis habitualmente utilizada en el estado de la técnica es de 100 ml a 1.000 ml de inóculo de tipo turba-vermiculita o alginato de calcio en asociación o no con otro componente, por semilla. Por consiguiente, la dosis utilizada en este caso es por lo menos inferior a 10 ml de inóculo y de polvo de termiteros, por semilla.

55 En un modo de realización preferido de la presente invención, el polvo de termiteros utilizado procede de termitas del género *Macrotermes* y preferentemente del género *Macrotermes subhyalinus*.

60 Según un modo de realización ventajoso de la presente invención, el inóculo fúngico comprende por lo menos un hongo endomicorrízico, del género *Glomus*, seleccionado en particular de entre *Glomus mosseae*, *Glomus fasciculatus*, *Glomus aggregatum*, *Glomus intraradices* y preferentemente *Glomus intraradices*.

65 Se entiende por hongo endomicorrízico, un hongo cuyo micelio penetra en las células de las raíces y desarrolla unos arbusculos o vesículas, cuando está asociado a unas raíces de plantas. No forma un manto fúngico alrededor de la raíz. (Smith, S.E. & Read, D.J. (1997). Mycorrhizal symbiosis. 2ª edición, UK, Academic Press.)

Según otro modo de realización ventajoso de la presente invención, el inóculo fúngico comprende por lo menos un

hongo ectomicorrízico del género *Pisolithus*, seleccionado en particular de entre *Pisolithus albus*, *Pisolithus tinctorius*, o del género *Scleroderma*, seleccionado en particular de entre *Scleroderma dictyosporum*, *Scleroderma verrucosum* y preferentemente *Scleroderma dictyosporum*.

5 Se entiende por hongo ectomicorrízico, un hongo cuyo micelio se desarrolla entre las células de la corteza de raíces, pero no penetra en las células vivas, formando así "la red intercelular de Hartig". Forma un manto fúngico alrededor de la raíz. (Smith, S.E. & Read, D.J. (1997). Mycorrhizal symbiosis. 2ª edición, UK, Academic Press).

10 Según otro modo de realización ventajoso de la presente invención, el inóculo fúngico comprende un hongo endomicorrízico del género *Glomus*, seleccionado en particular de entre *Glomus mosseae*, *Glomus fasciculatus*, *Glomus aggregatum*, *Glomus intraradices* y preferentemente *Glomus intraradices*, y un hongo ectomicorrízico del género *Pisolithus*, seleccionado en particular de entre *Pisolithus albus*, *Pisolithus tinctorius*, o del género *Scleroderma*, seleccionado en particular de entre *Scleroderma dictyosporum*, *Scleroderma verrucosum* y preferentemente *Scleroderma dictyosporum*.

15 Esta asociación de hongo ectomicorrízico y endomicorrízico es más particularmente ventajosa para las esencias leñosas de crecimiento rápido de los géneros *Casuarina*, *Allocasuarina*, *Eucalyptus* y *Acacia* de origen australiano.

20 Estas especies forestales se utilizan frecuentemente en los programas de reforestación en medio tropical húmedo y seco, y la asociación de los dos tipos de hongos micorrízicos permite obtener unas ganancias de crecimiento con respecto a las registradas cuando se inocula un solo tipo de hongo (véase la figura 1).

25 Según un modo de realización preferido de la invención, el inóculo fúngico se prepara mediante crecimiento sobre un soporte, de un hongo endomicorrízico o de un hongo ectomicorrízico, teniendo lugar el crecimiento del hongo endomicorrízico sobre un soporte, en particular de tipo arena, en particular en presencia de una planta micotrófica, teniendo lugar el crecimiento del hongo ectomicorrízico sobre un soporte de tipo turba-vermiculita o de bolas de alginato de calcio.

30 Tratándose del hongo endomicorrízico, éste se presenta por ejemplo en forma de raíces secas micorrizadas, cortadas en trozos de 1 mm (que comprenden aproximadamente 25 vesículas por mm de raíces) y mezcladas con arena (esterilizada a 140°C, durante 40 min.) a una dosis de 2 g de raíces micorrizadas de dicho hongo endomicorrízico.

35 La planta micotrófica gracias al desarrollo de sus raíces multiplicará el hongo endomicorrízico.

A título de ejemplos de plantas micotróficas, se puede citar el mijo, el sorgo y el maíz.

El tiempo de crecimiento con la ayuda de la planta micotrófica es del orden de 4 meses.

40 Tratándose del hongo ectomicorrízico, el soporte utilizado es de tipo turba-vermiculita y la cepa fúngica (un implante fúngico extraído a partir de un cultivo "madre" a una dosis de aproximadamente 10 mg de peso seco de biomasa por implante) se desarrolla y coloniza en condiciones estériles una mezcla de turba y de vermiculita (1:4;v:v) y humidificada por una disolución nutritiva.

45 Según un modo de realización ventajoso, después de tres meses de cultivo en tarros a 25°C, el inóculo fúngico se mezcla con el sustrato de cultivo a razón de 1 volumen de inóculo por 9 volúmenes de suelo de cultivo.

50 Esta mezcla se reparte después en fundas en las que se planta la esencia forestal seleccionada. Si la producción se efectúa en tablas de vivero, el inóculo puede ser aportado a razón de 2 litros por m<sup>2</sup> de suelo en el que se sembrarán las semillas de la esencia seleccionada.

55 En el caso del soporte de bolas de alginato, según un modo de realización ventajoso, el micelio se multiplica en un medio nutritivo líquido en fermentador y después se tritura y se mezcla con una disolución de alginato de Na. Esta suspensión de fragmentos de micelio se vierte a continuación gota a gota en una disolución de cloruro de calcio. El alginato polimeriza en presencia de calcio dando así unas bolas de alginato de calcio de diámetro seleccionado que contienen los propágulos fúngicos. Estas bolas se inoculan a continuación en el suelo de las tablas de vivero a razón de 1 litro de inóculo por m<sup>2</sup>.

60 Según otro modo de realización ventajoso de la invención, el inóculo fúngico y el polvo de termiteros están asociados a un sustrato, seleccionado en particular de entre la arena, el abono compuesto que procede de residuos de cultivo y preferentemente de mantillo, o una mezcla de arena y de abono compuesto.

65 El inóculo fúngico utilizado en este caso y en el momento de su utilización es el inóculo fúngico después de crecimiento, por ejemplo durante 4 meses para el hongo endomicorrízico y tres meses por ejemplo en los tarros para el hongo ectomicorrízico.

El término abono compuesto designa en la presente memoria un producto obtenido mediante conversión y valorización controlada de las materias orgánicas (subproductos de la biomasa, desechos orgánicos de origen biológico) en un producto estabilizado, higiénico y rico en compuestos húmedos.

5 Según un modo de realización preferido de la invención, la relación inóculo : polvo de termiteros está comprendido entre 0,1% (v:v) y 10% (v:v), preferentemente entre 0,1% (v:v) y 0,5% (v:v) y más preferentemente entre 0,1% (v:v) y 1% (v:v).

10 La pequeña cantidad de polvo de termiteros utilizada (0,1% a 10% v:v) en la presente invención evita el riesgo de desdoblamiento de regiones enteras de sus nidos de termitas.

15 Según otro modo de realización ventajoso de la invención, la relación inóculo fúngico : sustrato del inóculo está comprendida entre 1% (v:v) y 10% (v:v), preferentemente entre 1% (v:v) y 5% (v:v) y preferentemente tiene el valor de 1% (v:v).

La baja cantidad de polvo de termitero utilizada (0,1% a 10% v:v) en la presente invención evita el riesgo de desdoblamiento de regiones enteras de sus nidos de termitas.

20 Según otro modo de realización ventajoso de la invención, la relación inóculo fúngico : sustrato del inóculo está comprendida entre 1% (v:v) y 10% (v:v) y preferentemente entre 1% (v:v) y 5% (v:v) y más preferentemente tiene el valor de 1% (v:v).

25 Según aún otro modo de realización del procedimiento anterior, el hongo endomicorrízico se utiliza en unos espacios destinados a los cultivos, en particular de cereales, forrajeros, de hortalizas, frutícolas u hortícolas, y preferentemente de hortalizas, frutícolas u hortícolas.

Los cultivos de cereales comprenden en particular la cebada, la avena y el trigo, no siendo esta lista limitativa.

30 Por cultivo forrajero se deben entender las leguminosas tales como el trébol, la lucerna y el loto corniculado, y gramíneas, tal como el fleo de los prados, el dactilo, no siendo esta lista limitativa.

Los cultivos hortícolas comprenden en particular los tomates, las berenjenas, las patatas, las zanahorias, la lechuga, el pepino, el melón, la col, la coliflor, etc.

35 Los cultivos frutícolas comprenden en particular manzanas, peras, melocotones, uva, cereza, ciruela, cítricos, no siendo limitativa esta lista.

Los cultivos hortícolas comprenden en particular las flores, las plantas ornamentales, no siendo esta lista limitativa.

40 El término "espacios destinados a los cultivos" designa en la presente memoria cualquier tipo de contenedor que comprende unos elementos apropiados para el cultivo tales como macetas, bandejas, tarros, placas alveoladas, sin estar limitado a los mismos, así como cualquier tipo de terreno, parcela de tierra, campo, invernadero, etc.

45 En un modo de realización preferido del procedimiento descrito anteriormente, el hongo ectomicorrízico se utiliza en unos espacios destinados a los cultivos forestales.

El término espacios destinados a los cultivos tiene en este caso el mismo significado que anteriormente.

50 Los cultivos forestales comprenden en particular lqs mirtáceas, las pináceas, las abietáceas, las fagáceas, las tiliáceas, las ulmáceas, las salicáceas; no siendo limitativa esta lista.

55 Según otro modo de realización ventajoso de la invención, un hongo endomicorrízico y un hongo ectomicorrízico se utilizan en unos espacios destinados a los cultivos forestales, en particular las esencias leñosas de los géneros *Casuarina*, *Allocasuarina*, *Eucalyptus* y *Acacia* de origen australiano.

60 Los dos hongos se utilizan de la misma manera que la descrita anteriormente para cada hongo, es decir, el hongo endomicorrízico mezclado con un soporte, en particular de tipo arena, y el hongo ectomicorrízico se pone en crecimiento sobre un soporte de tipo turba-vermiculita o de bolas de alginato de calcio, por ejemplo durante tres meses.

La invención se refiere asimismo a una composición que comprende:

65 a. un inóculo fúngico que comprende por lo menos un hongo endomicorrízico del género *Glomus*, seleccionado en particular de entre *Glomus mosseae*, *Glomus fasciculatus*, *Glomus aggregatum*, *Glomus intraradices* y preferentemente *Glomus intraradices*,

- b. polvo de termiteros, estando el tamaño de las partículas de dicho polvo de termiteros comprendido entre 1  $\mu\text{m}$  y 1.000  $\mu\text{m}$ , y preferentemente entre 1  $\mu\text{m}$  y 500  $\mu\text{m}$ .

Este tamiz permite eliminar sólo las partículas bastas de la estructura de los termiteros (tipo piedras).

5 Estas partículas se recogen y se trituran nuevamente. En general, más del 95% (en volumen) del termitero puede ser triturado y reducido a polvo.

10 Si el polvo no está triturado, las partículas son demasiado bastas y las estructuras de termiteros no pueden ser repartidas de manera homogénea en el sustrato, estando la relación de inóculo fúngico : polvo de termiteros comprendida entre 0,1% (v:v) y 10% (v:v), preferentemente entre 0,1% (v:v) y 5% (v:v) y más preferentemente entre 0,1% (v:v) y 1% (v:v).

15 La composición descrita anteriormente permite estimular la micorrización, en particular de los cultivos de cereales, forrajeros, de hortalizas, frutícolas u hortícolas.

Según un modo de realización preferido de la invención, el inóculo fúngico anterior comprende:

- 20 i. por lo menos un hongo endomicorrízico  
ii. un soporte de tipo arena  
iii. una planta micotrófica

25 El inóculo fúngico procede por ejemplo del crecimiento de una dosis de 2 g de raíces micorrizadas de hongo endomicorrízico.

Esta dosis es asimismo la utilizada en la invención.

Según otro modo de realización de la invención, dicha composición comprende:

- 30 a. un inóculo fúngico que comprende por lo menos un hongo endomicorrízico  
b. polvo de termiteros,  
35 c. un sustrato seleccionado de entre el abono compuesto, que procede de residuos de cultivo, y preferentemente de mantillo, arena, o una mezcla de arena y de abono compuesto,

40 estando la relación de polvo de termiteros : sustrato comprendida entre 1% (v:v) y 10% (v:v), y preferentemente entre 1% (v:v) y 5% (v:v) y más preferentemente tiene el valor de 1% (v:v) y estando la relación de inóculo fúngico : sustrato comprendida entre 1% (v:v) y 10% (v:v), preferentemente entre 1% (v:v) y 5% (v:v) y más preferentemente tiene el valor de 1% (v:v).

El término abono compuesto utilizado en este caso tiene el mismo significado que anteriormente.

La invención se refiere asimismo a una composición que comprende:

- 45 a. un inóculo fúngico, que comprende por lo menos un hongo ectomicorrízico, del género *Pisolithus*, seleccionado en particular de entre *Pisolithus albus*, *Pisolithus tinctorius*, o del género *Scleroderma*, seleccionado en particular de entre *Scleroderma dictyosporum*, *Scleroderma verrucosum* y preferentemente *Scleroderma dictyosporum*,  
50 b. polvo de termiteros, estando el tamaño de las partículas de dicho polvo comprendido entre 1  $\mu\text{m}$  y 1.000  $\mu\text{m}$ , preferentemente entre 1  $\mu\text{m}$  y 500  $\mu\text{m}$ ,  
c. un sustrato seleccionado de entre la arena, el abono compuesto que procede de residuos de cultivo, y preferentemente de mantillo, o una mezcla de arena y de abono compuesto,

55 estando la relación de inóculo fúngico : polvo de termiteros comprendida entre 0,1% (v:v) y 10% (v:v), preferentemente entre 0,1% (v:v) y 5% (v:v) y más preferentemente entre 0,1% (v:v) y 1% (v:v), y

60 estando la relación de inóculo fúngico : sustrato comprendida entre 1% (v:v) y 10% (v:v), preferentemente 1% (v:v) y 5% (v:v) y más preferentemente tiene el valor de 1% (v:v), y

estando la relación de polvo de termiteros : sustrato comprendida entre 1% (v:v) y 10% (v:v), preferentemente 1% (v:v) y 5% (v:v) y más preferentemente tiene el valor de 1% (v:v).

65 con la condición de que por lo menos una de las dos relaciones, inóculo fúngico : sustrato o polvo de termiteros : sustrato, sea inferior a 10% (v:v) y preferentemente que por lo menos una de dichas dos relaciones esté

comprendidas entre 1% (v:v) y 5% (v:v).

La composición descrita anteriormente permite estimular la micorrización de los cultivos, en particular forestales.

5 Según otro modo de realización de la invención, el inóculo fúngico de la composición anterior comprende:

- i. por lo menos un hongo ectomicorrízico
- ii. un soporte de tipo turba-vermiculita (1:4, v:v) o bolas de alginato de calcio.

10 El inóculo fúngico procede por ejemplo del crecimiento de una dosis de 10 mg de peso seco de biomasa de hongo ectomicorrízico.

La invención se refiere asimismo a una composición que comprende:

15 a. un inóculo fúngico que comprende un hongo endomicorrízico del género *Glomus*, seleccionado en particular de entre *Glomus mosseae*, *Glomus fasciculatus*, *Glomus aggregatum*, *Glomus intraradices* y preferentemente *Glomus intraradices*, y un hongo ectomicorrízico, del género *Pisolithus*, seleccionado en particular entre *Pisolithus albus*, *Pisolithus tinctorius*, o del género *Scleroderma*, seleccionado en particular de entre *Scleroderma dictyosporum*, *Scleroderma verrucosum* y preferentemente *Scleroderma dictyosporum*,

20 b. polvo de termiteros, estando el tamaño de las partículas de dicho polvo de termiteros comprendido entre 1 µm y 1000 µm, y preferentemente entre 1 µm y 500 µm, estando la relación de inóculo fúngico : polvo comprendida entre 0,1% (v:v) y 10% (v:v), preferentemente entre 0,1% (v:v) y 5% (v:v) y más preferentemente entre 0,1% (v:v) y 1% (v:v).

25 La composición descrita anteriormente permite estimular la micorrización de los cultivos forestales, en particular las esencias leñosas de los géneros *Casuarina*, *Allocasuarina*, *Eucalyptus* y *Acacia* de origen australiano.

30 Según un modo de realización preferido de la invención, el inóculo fúngico de la composición anterior comprende:

- i. por lo menos un hongo endomicorrízico y un hongo ectomicorrízico,
- ii. un soporte de tipo arena en presencia de una planta micotrófica para el hongo endomicorrízico y un soporte de tipo turba-vermiculita (1:4, v:v) o bolas de alginato de calcio para el hongo ectomicorrízico.

35 El inóculo fúngico procede por ejemplo del crecimiento de una dosis de 2 g de raíces micorrizadas de hongo endomicorrízico y por ejemplo del crecimiento de una dosis de 10 mg de peso seco de biomasa de hongo ectomicorrízico.

40 Según un modo de realización preferido de la invención, la composición comprende:

- a. un inóculo fúngico,
- b. polvo de termiteros,
- c. un sustrato seleccionado entre el abono compuesto que procede de residuos de cultivo, y preferentemente de mantillo, arena, o una mezcla de arena y de abono compuesto,

45 estando la relación de polvos de termiteros : sustrato comprendida entre 1% (v:v) y 10% (v:v), preferentemente 1% (v:v) y 5% (v:v) y más preferentemente tiene el valor de 1% (v:v), y estando la relación de inóculo fúngico : sustrato comprendida entre 1% (v:v) y 10% (v:v), preferentemente 1% (v:v) y 5% (v:v) y más preferentemente tiene el valor de 1% (v:v).

50 Según un modo de realización preferido, en todas las composiciones descritas anteriormente, el polvo de termiteros procede de termitas del género *Macrotermes* y preferentemente del género *Macrotermes subhyalinus*.

55 La invención se refiere asimismo a un procedimiento de estimulación de la micorrización en unos espacios destinados a los cultivos, en los que se ha introducido una mezcla de inóculo fúngico y de polvo de termiteros, eventualmente triturada, siendo el inóculo fúngico preparado mediante crecimiento de por lo menos un hongo endomicorrízico con un soporte o mediante crecimiento de por lo menos un hongo ectomicorrízico sobre un soporte y siendo dicho inóculo utilizado a una dosis por elemento unitario de cultivo, en particular semilla o planta, de aproximadamente por lo menos diez veces inferior a la dosis utilizada en ausencia de polvo de termiteros.

60 La expresión "elemento unitario de cultivo" designa en la presente memoria una semilla, simiente, grano, fruta, pepita, hueso o una planta sin estar limitado a los mismos, que permite obtener un cultivo forestal, de cereales, forrajero, de hortalizas, frutícola u hortícola.

65

Según un modo de realización preferido del procedimiento anterior, la dosis de inóculo fúngico por elemento unitario de cultivo está comprendida entre 0,01 y 1 ml y preferentemente entre 0,01 y 0,1 ml.

5 Según otro modo de realización preferido de la invención, el inóculo utilizado en el procedimiento anterior es un inóculo fúngico específico de la endomicorrización que comprende por lo menos un hongo endomicorrízico del género *Glomus*, seleccionado en particular de entre *Glomus mosseae*, *Glomus fasciculatus*, *Glomus aggregatum*, *Glomus intraradices* y preferentemente *Glomus intraradices*.

10 Según aún otro modo de realización preferido de la invención, el inóculo utilizado en el procedimiento anterior es un inóculo fúngico específico de la ectomicorrización que comprende por lo menos un hongo ectomicorrízico del género *Pisolithus*, seleccionado en particular de entre *Pisolithus albus*, *Pisolithus tinctorius*, o del género *Scleroderma*, seleccionado en particular de entre *Scleroderma dictyosporum*, *Scleroderma verrucosum* y preferentemente *Scleroderma dictyosporum*.

15 En otro modo de realización, el inóculo fúngico es un inóculo que comprende por lo menos un hongo endomicorrízico del género *Glomus*, seleccionado en particular de entre *Glomus mosseae*, *Glomus fasciculatus*, *Glomus aggregatum*, *Glomus intraradices* y preferentemente *Glomus intraradices* y por lo menos un hongo ectomicorrízico del género *Pisolithus*, seleccionado en particular de entre *Pisolithus albus*, *Pisolithus tinctorius*, o del género *Scleroderma*, seleccionado en particular de entre *Scleroderma dictyosporum*, *Scleroderma verrucosum* y preferentemente *Scleroderma dictyosporum*. Según un modo de realización preferido del procedimiento anterior, el tamaño de las partículas de dicho polvo está comprendido entre 1 µm y 1000 µm, y preferentemente entre 1 µm y 500 µm.

25 Según otro modo de realización preferido, el polvo de termiteros procede de termitas del género *Macrotermes* y preferentemente del género *Macrotermes subhyalinus*.

30 Según todavía otro modo de realización del procedimiento anterior, se ha introducido una mezcla de inóculo fúngico y de polvo de termiteros, eventualmente triturada, en asociación con un sustrato, habiendo sido el inóculo fúngico y el polvo de termiteros mezclados con un sustrato, y siendo dicho inóculo fúngico preparado mediante crecimiento de un hongo micorrízico sobre un soporte.

35 Según un modo de realización preferido, la relación inóculo : polvo de termiteros está comprendida entre 0,1% (v:v) y 10% (v:v), preferentemente entre 0,1% (v:v) y 5% (v:v) y más preferentemente entre 0,1% (v:v) y 1% (v:v).

40 Según otro modo de realización preferido, el inóculo fúngico se prepara mediante crecimiento de por lo menos un hongo endomicorrízico a una dosis de aproximadamente 2 g de raíces micorrizadas de dicho hongo endomicorrízico sobre un soporte constituido por arena en asociación con una planta micotrófica, o mediante crecimiento de por lo menos un hongo ectomicorrízico a una dosis de aproximadamente 10 mg de peso seco de biomasa de hongo ectomicorrízico sobre un soporte constituido por turba/vermiculita (1:4 v:v) o por bolas de alginato de calcio.

45 Según aún otro modo de realización preferido, el inóculo fúngico y el polvo de termiteros están mezclados con un sustrato, siendo dicho sustrato seleccionado de entre la arena, el abono compuesto que procede de residuos de cultivo y preferentemente de mantillo, o una mezcla de arena y de abono compuesto,

estando la relación inóculo fúngico : sustrato comprendida entre 1% (v:v) y 10% (v:v), preferentemente entre 1% (v:v) y 5% (v:v) y más preferentemente tiene el valor de 1% (v:v), y

50 estando la relación polvo de termiteros : sustrato comprendida entre 1% (v:v) y 10% (v:v), preferentemente entre 1% (v:v) y 5% (v:v) y más preferentemente tiene el valor de 1% (v:v).

55 Según un modo de realización preferido, el procedimiento comprende una etapa de introducción de un elemento unitario de cultivo en unos espacios destinados a los cultivos que contienen previamente el inóculo fúngico y el polvo de termiteros, siendo dicho elemento unitario en particular una semilla o una planta.

La semilla o la planta se introducen en un espacio que contiene ya el inóculo fúngico.

Según otro modo de realización, el procedimiento comprende las etapas siguientes:

60 a. preparar el inóculo fúngico mediante crecimiento de por lo menos un hongo endomicorrízico y mediante crecimiento de por lo menos un hongo ectomicorrízico sobre un soporte,

b. mezclar el polvo de termiteros, eventualmente triturado, e inóculo fúngico con un sustrato,

65 c. introducir la mezcla obtenida en la etapa anterior en unos espacios destinados a los cultivos a una dosis por elemento unitario de cultivo de 0,01 a 1 ml de inóculo fúngico y preferentemente de 0,01 a 0,1 ml de inóculo

fúngico,

d. introducir un elemento unitario de cultivo, en particular una semilla de cultivo o una planta, en los espacios destinados a los cultivos que contienen la mezcla.

Este procedimiento comprende una etapa de pre-inoculación de las plantas en terrina en un volumen de suelo reducido, lo cual procura la ventaja de evitar las pérdidas de propágulos fúngicos habitualmente registradas en las técnicas clásicas de micorrización.

### 10 Descripción de las figuras

La figura 1 representa la influencia de la proporción de la enmienda con polvo de termitero sobre la colonización micorrízica de los sembrados de *A. holosericea* con los diferentes tratamientos de inoculación micorrízica.

15 (A) Inoculación endomicorrízica (primer cultivo)

----- PIF 1%.  $y = 18,53 \ln x + 36,9$ .  $R = 0,78$ .  $p < 0,0001$   
 -.-.- PIF 5%  $y = 15,99 \ln x + 27,9$   $R = 0,61$ .  $p = 0,004$   
 ----- PIF 10%  $y = 15,45 \ln x + 41,48$   $R = 0,67$   $p = 0,0012$

20 (B) Inoculación endomicorrízica (segundo cultivo)

----- PIF 1%.  $y = 5,73 \ln x + 34,7$ .  $R = 0,48$ .  $p < 0,0031$   
 -.-.- PIF 5%  $y = 1,99 \ln x + 67,9$   $R = 0,14$   $p = 0,56$   
 ----- PIF 10%  $y = 11,9 \ln x + 40,9$   $R = 0,67$   $p = 0,005$   
 PIF: Proporción del inóculo fúngico

La línea continua a 59,3% en los gráficos (A) y (B) representa la colonización micorrízica de los sembrados de *A. holosericea* obtenida por inoculación fúngica efectuada habitualmente en los viveros (tabla 6).

30 (C) Inoculación ectomicorrízica (primer cultivo)

----- PIF 1%  $y = 10,98 \ln x + 40,8$   $R = 0,73$   $p < 0,0003$   
 -.-.- PIF 5%  $y = 4,26 \ln x + 49,4$   $R = 0,34$   $p = 0,14$   
 ----- PIF 10%  $y = 0,64 \ln x + 49,6$   $R = 0,67$   $p = 0,81$

(D) Inoculación ectomicorrízica (primer cultivo)

----- PIF 1%.  $y = 2,87 \ln x + 54,1$   $R = 0,30$   $p < 0,19$   
 -.-.- PIF 5%  $y = 4,12 \ln x + 56,1$   $R = 0,58$   $p = 0,007$   
 ----- PIF 10%  $y = 6,3 \ln x + 53,9$   $R = 0,71$   $p = 0,0004$   
 PIF: Proporción del inóculo fúngico

La línea continua a 35,6% en los gráficos (C) y (D) representa la colonización micorrízica de los sembrados de *A. holosericea* obtenida por inoculación fúngica efectuada habitualmente en los viveros (tabla 6).

La figura 2 representa el efecto de la enmienda con polvo de termitero sobre el crecimiento de los sembrados de *A. holosericea* con diferentes densidades de inóculo fúngico después de 4 meses de cultivo en invernadero.

50 (A) Inoculación endomicorrízica (primer cultivo)

----- PAT = 0%.  $y = 474,6 \ln x + 464,7$ .  $R = 0,87$ .  $p < 0,0001$   
 ----- PAT = 1%.  $y = 785,1 \ln x + 732,1$ .  $R = 0,84$ .  $p < 0,0001$   
 ----- PAT = 5%.  $y = 643,9 \ln x + 810,5$ .  $R = 0,76$ .  $p < 0,0001$   
 ----- PAT = 10%.  $y = 745,6 \ln x + 759$ .  $R = 0,79$ .  $p < 0,0001$

(B) Inoculación endomicorrízica (segundo cultivo)

----- PAT = 0%.  $y = 522,6 \ln x + 246,6$ .  $R = 0,93$ .  $p < 0,0001$   
 ----- PAT = 1%.  $y = 803,9 \ln x + 293,6$ .  $R = 0,84$ .  $p < 0,0001$   
 ----- PAT = 5%.  $y = 684,1 \ln x + 478,9$ .  $R = 0,76$ .  $p < 0,0001$   
 ----- PAT = 10%.  $y = 536,6 \ln x + 594,5$ .  $R = 0,79$ .  $p < 0,0001$   
 PAT: Proporción de la enmienda con polvo de termitero.

65 La línea rayada a 2380,4 mg representa la biomasa total de los sembrados de *A. holosericea* inoculados con *G. intraradices* (A, B) utilizando el procedimiento clásico de micorrización controlada (véase la tabla 6).

(C) Inoculación ectomicorrízica (primer cultivo)

- 5 ----- PAT = 0%.  $y = 549,7 \ln x + 225,9$ .  $R = 0,73$ .  $p < 0,0002$   
 ----- PAT = 1%.  $y = 174,2 \ln x + 477,8$ .  $R = 0,63$ .  $p < 0,003$   
 ----- PAT = 5%.  $y = -33,2 x^2 + 412,7 x + 378,6$ .  $R = 0,60$ .  $p < 0,02$   
 ----- PAT = 10%.  $-14,9 x^2 + 168,4 x + 710$ .  $R = 0,29$ .  $p < 0,47$

(D) Inoculación ectomicorrízica (primer cultivo)

- 10 ----- PAT = 0%.  $y = 398,7 \ln x + 181,3$ .  $R = 0,82$ .  $p < 0,0001$   
 ----- PAT = 1%.  $y = 429,7 \ln x + 282,4$ .  $R = 0,90$ .  $p < 0,0001$   
 ----- PAT = 5%.  $y = 490,7 \ln x + 509,9$ .  $R = 0,85$ .  $p < 0,0001$   
 ----- PAT = 10%.  $y = 617,9 \ln x + 178,1$ .  $R = 0,79$ .  $p < 0,0001$

15 La línea rayada a 1680,3 mg representa la biomasa total de los sembrados de *A. holosericea* inoculados con *P. albus* IR100 (C,D) utilizando el procedimiento convencional de micorrización controlada (véase la tabla 6).

20 **Ejemplos**

**Ejemplo 1: Análisis de los termiteros de *M. subhyalinus***

25 Las muestras de termiteros de *M. subhyalinus* se han extraído en una sabana arbolada, a 50 km al norte de Ouagadougou en Burkina Faso. Se han triturado y después tamizado sobre un tamiz de 2 mm antes de la utilización. Las características químicas y microbiológicas se presentan en la tabla I:

Tabla I. Características químicas y microbiológicas de polvo de termitero de *Macrotermes subhyalinus*.

NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (µg N g <sup>-1</sup> de polvo de termitero seco)	9,4
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (µg N g <sup>-1</sup> de polvo de termitero seco)	3408,9
P disponible (µg g <sup>-1</sup> de polvo de termitero seco)	3,5
Biomasa microbiana (µg C g <sup>-1</sup> de polvo de termitero seco)	22,5
<i>Pseudomonas</i> fluorescentes (x 10 <sup>2</sup> CFU g <sup>-1</sup> polvo de termitero seco)	79,3
Actinomicetos (x 10 <sup>2</sup> CFU g <sup>-1</sup> de polvo de termitero seco)	39,5
Ergosterol (µg g <sup>-1</sup> de polvo de termitero seco)	0,316

30 Brevemente, el contenido en NH<sub>4</sub><sup>+</sup> y NO<sub>3</sub><sup>-</sup> se ha medido según el método de Bremner (Bremner J. M., Inorganic forms of nitrogen. Methods of Soil Analysis, Parte 2. Agronomy Monographs, Vol. 9, (Black CA, ed.), p. 1179-1237. Agronomy Society of America and Soil Science Society of America, Madison, WI, (1965)), el fósforo disponible se ha determinado según Olsen *et al.* (Olsen SR, Cole CV, Watanabe FS & Dean LA Estimation of available phosphorus in soils by extraction with sodium bicarbonate. Circular, Vol. 939, p. 19. US Department of Agriculture, Washington DC. (1954)). El contenido en ergosterol se ha determinado utilizando el método de Grand y West (Grant WD & West AW Measurement of ergosterol, diamino pimelic acid and glucosamine in soil: evaluation as indicators of microbial biomass. J Microbiol 6: 47-53, (1986)). El método de extracción-fumigación se ha utilizado para estimar la biomasa microbiana (Amato M & Ladd. JM (1988) Assay for microbial biomass based on ninhydrin-reactive nitrogen in extracts of fumigated soils. Soil Biol Biochem 20: 107-114.). La numeración de las unidades que forman unas colonias (CFU) se ha llevado a cabo en el medio agar King B para las *Pseudomonas* fluorescentes (King EO, Ward MK & Raney DE (1954) Two simple media for the demonstration of pyocyanine and fluorescein. J Lab Clin Med 44: 301-307) y en un medio agar desprovisto de actinomicetos (Difco Laboratories, Detroit, Mi) para los actinomicetos. La mayoría de las *Pseudomonas* fluorescentes pertenecen a la especie *Pseudomonas monteillii* (Duponnois, R., Assigbetse, K., Ramanankierana, Kisa, M., Thioulouse, J. & Lepage, M. (2006). Litter-forager termite mounds enhance the ectomycorrhizal symbiosis between *Acacia holosericea* A. Cunn. Ex G. Don and *Scleroderma dictyosporum* isolates. FEMS Microbiology Ecology, 56: 292-303).

**Ejemplo 2: Preparación del inóculo fúngico**

50 El hongo ectomicorrízico *P. albus* IR100 se ha conservado en un medio agar Melin-Norkrans (MMN) a 25°C (Marx, DH (1969) The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infections: I. Antagonism of mycorrhizal fungi to root pathogenic fungi and soil bacteria. Phytopathology 59: 153-163). El inóculo fúngico ectomicorrízico se ha preparado según Duponnois y Garbaye (Duponnois R, Garbaye J (1991) Techniques for controlled synthesis of the Douglas fir-Laccaria laccata ectomycorrhizal symbiosis. Ann Sci For 48: 239-251).  
 55 Unos tarros de vidrio de un litro se han llenado con 600 ml de una mezcla de vermiculita y turba (4:1; v:v) y autoclave (120°C, 20 minutos). Se han añadido después 300 ml de líquido MMN al sustrato, los tarros se han cerrado herméticamente y pasado por autoclave a 120°C durante 20 minutos. Después del enfriamiento, el sustrato se inoculó con unos conos fúngicos extraídos del borde de las colonias fúngicas. Los tarros de vidrio se han dispuesto a

25°C en la oscuridad durante 3 meses. Una mezcla pasada por autoclave de vermiculita-turba humidificada (medio MMN) se ha utilizado para el control sin inoculación ectomicorrízica.

El hongo endomicorrízico *G. intraradices* (DAOM 181 602, Ottawa Agricultural Herbarium) se cultivó sobre mijo (Penisetum typhoides cv. IKMV 8201) durante 12 semanas en un invernadero sobre un suelo arenoso pasado por autoclave (120°C, 60 minutos). El inóculo endomicorrízico está constituido por una mezcla de suelo de rizosfera que contiene esporas, micelio y raíces micorrizadas cortadas en trozos de 1 a 3 mm de longitud que tienen aproximadamente 250 vesículas por cm<sup>2</sup>. Unas raíces de mijo no micorrizadas, preparadas como anteriormente, se han utilizado para el control sin inoculación endomicorrízica.

### Ejemplo 3: Concepción experimental

Unas semillas de *A. holosericea* se han esterilizado en superficie con ácido sulfúrico a 95% durante 60 minutos. La disolución de ácido se ha decantado después y las semillas se han aclarado y sumergido durante 12 minutos en agua destilada estéril. Las semillas se han transferido después de manera aséptica a cajas de Petri llenadas con 1% (m/v) de medio agar/agua. Estas cajas se han incubado a 25°C en la oscuridad. Las semillas que han germinado se utilizaron cuando las raíces medían de 1 a 2 cm de longitud.

El suelo arenoso utilizado en este experimento se ha recogido en una población de *A. holoserica* localizada al este de Dakar. Después de la recogida, el suelo se trituró, se pasó a través de un tamiz de 2 mm y se pasó por autoclave durante 60 minutos a 120°C para eliminar la microflora nativa. Después de la autoclave, sus características fisicoquímicas son las siguientes: pH (H<sub>2</sub>O) 5,3; 3,6% de arcilla; 0,0% de limo fino; 0,8% de limo basto; 55,5% de arena fina; 39,4% de arena basta; 0,17% de carbono; 0,02% de nitrógeno; 8,5 C/N; 39 ppm de P total y 4,8 ppm de P soluble (Olsen SR, Cole CV, Watanabe FS & Dean LA (1954) Estimation of available phosphorus in soils by extraction with sodium bicarbonate. Circular, Vol. 939, p. 19. US Department of Agriculture, Washington DC). Este suelo se mezcló con 0, 1,5 y 10% (v:v) de polvo de termitero *M. Subhyalinus*. La inoculación ectomicorrízica y endomicorrízica se efectuó mezclando los suelos con un inóculo fúngico (10/1; v:v) con una mezcla pasada por autoclave de vermiculita-turba en la misma relación (control ectomicorrízico) o con raíces de mijo no micorrizadas y su suelo rizoestérico (control endomicorrízico).

Unos contenedores de plástico (30 x 30 x 5 cm) llenados con estas mezclas de suelo se han plantado cada uno con 100 semillas germinadas de *A. holosericea*. Los sembrados se han guardado en un invernadero con luz natural (aproximadamente 12 horas de luz por día, temperatura diaria media 30°C) y se han regado sin fertilizantes todos los días. Tres contenedores por tratamiento se han dispuesto de manera completamente aleatoria.

Después de 1 a 2 meses de cultivo, se han desraizado cinco plantas por contenedor y transferidas a una maceta de un litro (un sembrado por maceta) llenada con el mismo suelo esterilizado pero sin enmienda con polvo de termitero, e inoculación fúngica. Los sembrados se han conservado en un invernadero en las mismas condiciones que anteriormente, y se han regado diariamente sin fertilizante. Las macetas se han dispuesto de manera completamente aleatoria con 15 macetas por tratamiento. Después de 3 (primer trasplante) y 2 (segundo trasplante) meses de cultivo, se han desraizado cinco plantas de *A. holosericea* seleccionadas de manera aleatoria en cada tratamiento, y se han lavado cuidadosamente los sistemas de raíces. Se ha medido el peso seco (una semana a 65°C) de la plántula. Los sistemas de raíces se han cortado en trozos de 1 cm y se han mezclado. El porcentaje de raíces cortas ectomicorrizadas [(número de raíces cortas ectomicorrizadas/número total de raíces cortas) x 100] se ha determinado bajo estereomicroscopio a 40x de aumento en una muestra aleatoria de por lo menos 50 raíces cortas por sistema de raíces. La colonización interna de hongo endomicorrízico a lo largo de los sistemas de raíces se cuantificó mediante aclaramiento y coloración de las raíces según el método de Phillips y Hayman (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. Trans. Br. Mycol. Soc. 55, 158-161).

Los trozos de raíces se han dispuesto sobre una lámina para una observación con microscopio a 250 de aumento. (Brundrett, M.C., Piche, Y., Peterson, R.L., 1985. A developmental study of the early stages in vesicular-arbuscular mycorrhizal formation. Can. J. Bot. 63, 184-194). La extensión de la colonización micorrízica se expresó en términos de fracción de longitud de raíz con unas estructuras internas micorrizadas (vesículas o micelio):(longitud de fragmento de raíz colonizado/longitud total de fragmentos de raíz) x 100, y después se midió el peso seco de las raíces (1 semana a 65°C).

Paralelamente a este experimento, se cultivaron unos sembrados de *A. holosericea* en macetas de 1 l rellenas con el mismo suelo desinfectado como anteriormente. Para la inoculación ectomicorrízica, se mezcló el suelo con un inóculo fúngico de *P. albus* IR 100 (10/1; v:v). El control (sin hongo), recibió una mezcla pasada por autoclave de vermiculita-turba húmeda (medio MMN) en una misma proporción. Para la inoculación endomicorrízica, se efectuó un agujero (1 cm x 5 cm) en cada maceta y se relleno con un gramo de raíz de mijo fresco (micorrizado o no para el tratamiento control sin hongo). Los agujeros se cubrieron después con el mismo suelo pasado por autoclave: Las plantas se regaron diariamente sin fertilizante y se dispusieron de manera completamente aleatoria con ocho muestras por tratamiento. Se conservaron en un invernadero bajo luz natural (aproximadamente 12 h de luz por día, a temperatura media diaria de 30°C). Después de 4 meses de cultivo, las plantas de *A. holosericea* se desraízan y

se miden sus biomasa aérea y de raíces y su índice micorrízico tal como se ha descrito anteriormente.

**Ejemplo 4: Análisis estadístico**

5 Los datos se trataron con un análisis de varianza de una o dos variables. Las medias se compararon utilizando el ensayo de Newman y Keuls ( $p < 0,05$ ). Los porcentajes de colonización micorrízica se transformaron por raíz cuadrada de arco seno antes del análisis estadístico.

**Ejemplo 5: Resultados**

10 *Efectos de la inoculación fúngica endomicorrízica y de la enmienda con polvo de termitero sobre el crecimiento de las plantas y la colonización micorrízica de sembrados de A. holosericea.*

15 Para todas las proporciones de inóculo fúngico combinadas y para los dos tratamientos de cultivo, aparecen unas diferencias significativas entre la biomasa aérea y de raíces y la colonización micorrízica de los sembrados de *A. holosericea* (tablas 2 y 3).

20 Tabla 2. Efecto de las proporciones en inoculación endomicorrízicas y de enmienda con polvo de termitero sobre el crecimiento de *A. holosericea* y sobre la formación micorrízica después de 3 meses de cultivo en macetas de 1 litro (primera plantación).

Factor <sup>(A)</sup>	Biomasa aérea (mg de peso seco)	Biomasa de raíces (mg de peso seco)	Colonización micorrízica (%)
<i>Proporción del inóculo fúngico (%)</i>			
0	278,5 (26,8) <sup>(1)</sup> a <sup>(2)</sup>	62,5 (8,9) a	0 a
1	1215,1 (89,1) b	350,5 (31,9) b	59,5 (5,1) c
5	1580 (73,1) c	520,1 (34,1) d	47,5 (5,6) b
10	1550 (88,8) c	444,1 (43,3) c	60,7 (4,9) c
<i>Proporción de la enmienda con polvo de termitero (%)</i>			
0	838,5 (90,9) a	205,5 (36,2) a	18,0 (4,4) a
1	1261,5 (146,8) b	429,0 (55,1) b	47,5 (6,8) b
5	1218,5 (136,9) b	378,2 (48,2) b	49,2 (7,1) b
10	1305,5 (156,2) b	364,5 (48,2) b	53,1 (7,4) b
Proporción del inóculo fúngico (PIF)	S	S	S
Proporción de la enmienda con polvo de termitero (PAT)	S	S	S
PIF x PAT	NS	S	S

S: significativo ( $p < 0,05$ ), NS: no significativo ( $p < 0,05$ ). <sup>(1)</sup> Error estándar sobre la media. <sup>(2)</sup> Los datos en la misma columna y para cada factor seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes según el ensayo de Newman-Keuls ( $p < 0,05$ ). <sup>(A)</sup> Los valores son las medias de 20 muestras para las proporciones de inóculo fúngico y de enmienda con polvo de termiteros. El factor de proporción de inóculo fúngico se combina para todos los tratamientos con las proporciones de enmienda con polvo de termiteros. El factor de enmienda con polvo de termiteros se combina para todos los tratamientos con proporción de inóculo fúngico.

25 Tabla 3. Efecto de las proporciones en inoculación endomicorrízica y de enmienda con polvo de termitero sobre el crecimiento de *A. holosericea* y sobre la formación micorrízica después de 2 meses de cultivo en macetas de 1 litro (segunda plantación)

Factor <sup>(A)</sup>	Biomasa aérea (mg de peso seco)	Biomasa de raíces (mg de peso seco)	Colonización micorrízica (%)
<i>Proporción del inóculo fúngico (%)</i>			
0	190,1 (22,6) <sup>(1)</sup> a <sup>(2)</sup>	70,5 (8,5) a	0 a
1	783,5 (41,5) b	238,1 (18,4) b	41,8 (2,5) b
5	1236,1 (48,9) c	357,1 (20,3) c	70,1 (2,6) d
10	1510,1 (73,9) d	334,5 (35,9) c	55,5 (4,3) c
<i>Proporción de la enmienda con polvo de termitero (%)</i>			
0	709,6 (101,1) a	175,0 (25,6) a	31,0 (5,3) a
1	1000,5 (142,9) b	274,5 (43,3) b	47,3 (7,3) b
5	1019,5 (125,2) b	294,5 (30,7) b	41,5 (6,4) b
10	988,5 (113,4) b	256,1 (29,9) ab	47,5 (6,6) b
Proporción del inóculo fúngico (PIF)	S	S	S
Proporción de la enmienda con polvo de termitero (PAT)	S	S	S
PIF x PAT	NS	S	S

Para las leyendas, véase la tabla 2.

5 Comparadas con el control, las biomásas y el índice de colonización micorrízica más elevados se encontraron con la proporción de inóculo fúngico de 10% en el primer experimento de cultivo (véase la tabla 2), mientras que en el experimento del segundo cultivo, la colonización micorrízica más fuerte se encontró con el índice de inóculo fúngico de 5% (véase la tabla 3).

10 Para todas las proporciones combinadas de enmienda con polvo de termiteros en el primer experimento de cultivo, el crecimiento y la colonización micorrízica han sido mucho más elevados en los suelos inoculados con polvo de termitero comparado con el control, salvo para las biomásas de raíces para la proporción de enmienda con polvo de termiteros de 10% (véase la tabla 2).

15 En el segundo experimento de cultivo, no se ha encontrado ninguna diferencia importante entre los diferentes tratamientos de inoculación para las biomásas de raíces, pero el efecto positivo del polvo de termitero sobre la colonización micorrízica se ha mantenido (véase la tabla 3). La biomasa aérea más elevada de *A. holosericea* se registró en las proporciones de enmienda con polvo de termitero al 5% (véase la tabla 3). Unas interacciones significativas entre las inoculaciones fúngicas y las enmiendas en polvo de termiteros se encontraron para las biomásas de raíces y la colonización micorrízica en los dos tratamientos de cultivo (véase las tabla 2 y 3).

20 *Efecto de la enmienda con inoculación fúngica ectomicorrízica y con polvo de termitero sobre el crecimiento de la planta y la colonización micorrízica de sembrados de A. holosericea.*

La inoculación ectomicorrízica aumentó de manera significativa el crecimiento y la colonización micorrízica de sembrados de *A. holosericea* en los dos experimentos de cultivo (tablas 4 y 5).

25 Tabla 4. Efecto de las proporciones de inoculación ectomicorrízicas y de enmienda con polvo de termitero sobre el crecimiento de *A. holosericea* y sobre la formación micorrízica después de 3 meses de cultivo en macetas de 1 litro (primera plantación).

Factor <sup>(A)</sup>	Biomasa aérea (mg de peso seco)	Biomasa de raíces (mg de peso seco)	Colonización micorrízica (%)
<i>Proporción del inóculo fúngico (%)</i>			
0	278,5 (26,8) <sup>(1)</sup> a <sup>(2)</sup>	62,5 (8,9) a	0 a
1	830,5 (101,9) b	341,5 (29,4) c	54,2 (3,2) b
5	771,0 (79,8) b	261,5 (25,7) b	54,6 (2,7) b
10	813,5 (104,9) b	277,5 (31,9) bc	50,4(2,4)b
<i>Proporción de la enmienda con polvo de termitero (%)</i>			
0	658,5 (122,5) b	288,5 (42,1) a	33,5 (4,8) a
1	482,5 (44,9) a	208,0 (23,6) a	39,6 (5,4) b
5	830,1 (101,3) c	268,1 (35,4) a	42,6 (6,3) b
10	722,5 (93,6) bc	228,0 (35,3) a	43,6 (6,3) b
Proporción del inóculo fúngico (PIF)	S	S	S
Proporción de la enmienda con polvo de termitero (PAT)	S	NS	S
PIF x PAT	S	S	S

Para las leyendas, véase la tabla 2.

30 Tabla 5. Efecto de las proporciones de inoculación ectomicorrízica y de enmienda con polvo de termitero sobre el crecimiento de *A. holosericea* y sobre la formación micorrízica después de 2 meses de cultivo en macetas de 1 litro (segunda plantación)

Factor <sup>(A)</sup>	Biomasa aérea (mg de peso seco)	Biomasa de raíces (mg de peso seco)	Colonización micorrízica (%)
<i>Proporción del inóculo fúngico (%)</i>			
0	191,0 (27,9) <sup>(1)</sup> a <sup>(2)</sup>	74,5 (12,9) a	0 a
1	556,5 (61,4) b	166,1 (15,2) b	57,6 (2,1) b
5	745,5 (43,6) c	221,1 (17,4) c	61,1 (1,5) c
10	1197,5 (96,6) d	364,5 (27,1) d	61,6 (1,9) c
<i>Proporción de la enmienda con polvo de termitero (%)</i>			
0	501,0 (77,1) a	167,0 (27,4) a	41,1 (5,5) a
1	612,2 (78,1) ab	195,0 (30,2) ab	41,6 (5,6) a
5	858,6 (96,9) c	250,5 (27,8) b	51,2 (6,8) c
10	719,1 (135,5) bc	213,5 (33,6) b	46,3 (6,4) b
Proporción del inóculo fúngico (PIF)	S	S	S
Proporción de la enmienda con polvo de termitero (PAT)	S	S	S
PIF x PAT	S	S	S

Para las leyendas, véase la tabla 2.

En el primer experimento de cultivo, se encontró un efecto positivo de la inoculación fúngica sobre el crecimiento y la colonización micorrízica de sembrados de *A. holosericea* (tabla 4). El crecimiento de las raíces fue mucho más importante cuando las plantas habían sido inoculadas con un índice de 1% (véase la tabla 4). En el tratamiento del segundo cultivo, se registró la biomasa aérea y de raíces más elevada con la proporción de inóculo fúngico de 10% (tabla 5).

La enmienda del suelo con el polvo de termitero no tuvo ningún efecto significativo sobre el crecimiento de las raíces, mientras que aumentó significativamente la colonización micorrízica de los sembrados en el primer experimento de cultivo (véase la tabla 4). Comparado con el control (suelo sin polvo de termitero), el crecimiento de las raíces fue significativamente más bajo para la enmienda con polvo de termitero al 1% y más elevada para la enmienda de polvo de termitero al 5% (tabla 4).

En el segundo experimento de cultivo, los efectos positivos sobre el crecimiento de la planta y la colonización micorrízica sólo se encontraron en los tratamientos al 5 y 10% de polvo de termitero (véase la tabla 5). Unas interacciones significativas entre las inoculaciones fúngicas y las enmiendas con polvo de termitero se encontraron para las biomasa de raíces y la colonización micorrízica en los dos tratamientos de cultivo (véanse las tablas 4 y 5).

*Efectos de la inoculación y de la enmienda con polvo de termitero sobre la colonización micorrízica de sembrados de A. holosericea.*

Utilizando el procedimiento clásico de micorrización controlada y después de 4 meses de crecimiento, las inoculaciones fúngicas endomicorrízicas y ectomicorrízicas han aumentado significativamente la biomasa aérea (respectivamente: +64,7% y 50,9%) y la biomasa de las raíces (respectivamente: +42,8% y +48,2%) (tabla 6). Los índices de colonización micorrízica de sembrados de *A. holosericea* fueron de 59,3% para el tratamiento endomicorrízico y de 35,6% para el tratamiento ectomicorrízico (véase la tabla 6).

Tabla 6. Efecto de las inoculaciones ectomicorrízicas y endomicorrízicas sobre el crecimiento de *A. holosericea* y sobre la formación micorrízica después de 4 meses de cultivo en invernadero con el procedimiento convencional de micorrización controlada

Tratamientos	Biomasa aérea (mg de peso seco)	Biomasa de raíces (mg de peso seco)	Colonización micorrízica (%)
Inoculación endomicorrízica			
Control	648,1 a <sup>(1)</sup>	312,2 a	0
<i>Glomus intraradices</i>	1834,1 b	546,3 b	59,3
Inoculación ectomicorrízica			
Control	550 a	290 a	0
<i>Pisolithus albus</i> IR100	1120,1 b	560,2 b	35,6

<sup>(1)</sup> Para cada tipo de inoculación fúngica, los datos en la misma columna seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes según el ensayo de Newman-Keuls (p < 0,05).

*Relaciones entre la enmienda con polvo de termitero, la inoculación fúngica y la formación micorrízica.*

En los dos experimentos de cultivo, la colonización endomicorrízica aumentó con unos índices crecientes de enmienda con polvo de termitero, salvo para el inóculo micorrízico a 5% en el segundo experimento de cultivo (véanse las figura 1 y 2).

En el tratamiento del primer cultivo, la colonización endomicorrízica obtenida con el procedimiento clásico de micorrización controlada (59,3%) (tabla 6) se alcanzó para todos los índices de tratamientos micorrízicos cuando la inoculación fúngica se asoció con 5% y 10% de enmiendas con polvo de termiteros y para las enmiendas al 1% de polvo de termitero cuando se asociaron a un tratamiento de inoculación endomicorrízica al 1% y 10% (figura 1A).

En el segundo tratamiento de cultivo, la colonización micorrízica de 59,3% se alcanzó para todos los tratamientos endomicorrízicos con una enmienda con polvo de termitero de 10% y en los tratamientos con una enmienda con polvo de termitero de 5% para una inoculación endomicorrízica de 5% y 10% (figura 1B). No se encontró ninguna relación significativa entre la colonización micorrízica y los índices de enmienda con polvo de termitero en los tratamientos de inoculación endomicorrízica al 5% (véase la figura 1B).

Para la inoculación ectomicorrízica y en el primer experimento de cultivo, los índices micorrízicos eran iguales o más elevados que los obtenidos con el procedimiento clásico de micorrización controlada (35,6%) (figura 1C). La colonización micorrízica fue positivamente relacionada con una enmienda con polvo de termitero creciente para un tratamiento de inoculación ectomicorrízica al 1% (véase la figura 1C).

En el segundo experimento de cultivo, la colonización micorrízica de los sembrados de *A. holosericea* fue significativamente más elevada, para todos los tratamientos fúngicos, que las obtenidas en el método clásico (figura

1D). Los índices de ectomicorrización se correlacionaron para las proporciones de enmienda con polvo de termiteros con las proporciones de inóculo ectomicorrízicas al 5% y 10% (figura 1D).

*Relaciones entre la enmienda con polvo de termitero, la inoculación fúngica y el crecimiento de las plantas.*

Para los tratamientos de inoculación endomicorrízica, el crecimiento de las plantas se correlacionó de manera significativa para las cantidades de propágulos micorrízicos inoculados en el suelo con o sin polvo de termita para los dos tratamientos de cultivo (figura 2A y B).

Cuando se añadieron los polvos de termiteros, el crecimiento de las plantas aumentó significativamente y alcanzó el obtenido con el procedimiento clásico de inoculación micorrízica (biomasa total = 2380,3 mg de peso seco) para el tratamiento del inóculo fúngico al 10% endomicorrízico con las enmiendas en polvo de termitero al 1%, 5% y 10% en el primer experimento de cultivo (figura 2A) y con unas enmiendas en polvo de termitero al 1% y 5% en el segundo experimento de cultivo (figura 2B).

Para los tratamientos de inoculación ectomicorrízico, el crecimiento de las plantas se correlacionó con los índices de inoculación micorrízica salvo para el tratamiento fúngico al 10% asociado a una enmienda con polvo de termitero al 10% en el tratamiento del primer cultivo (figura 2C y 2D).

El peso total seco de los sembrados de *A. holosericea* inoculados clásicamente con *P. albus* IR100 (biomasa total = 1680,2 mg de peso seco) se alcanzó para los tratamientos por el inóculo fúngico al 10% con unas enmiendas con polvo de termitero al 1% y 10% en el segundo experimento de cultivo (figura 2D) pero sólo se alcanzó para el tratamiento por el inóculo fúngico al 5% con una enmienda con polvo de termitero al 5% en el primer experimento de cultivo así como para el suelo sin *P. albus* IR100 pero enmendado con 10% de polvo de termitero (figura 2C).

### **Ejemplo 6: Conclusión**

Los objetivos principales de este experimento eran ensayar el efecto de una enmienda con polvo de termitero de *Macrotermes subhyalinus* sobre la formación de micorrizas entre *A. holosericea* y un aislado de *P. albus* (*P. albus* IR 100) y de *Glomus intraradices* utilizando un sistema de cultivo dividido en dos etapas de manera que se minimicen las cantidades de inóculos fúngicos añadidas al sustrato de cultivo. La primera etapa de esta práctica cultural se llevó a cabo para inocular los sembrados de *A. holosericea* mientras que el segundo permitió el desarrollo de estas plantas micorrizadas en unos volúmenes de suelo más grandes.

En el presente estudio, la enmienda de termitero aumentó de manera significativa la formación micorrízica de los dos aislados fúngicos. Las cantidades de polvo de termitero añadidas al suelo, en la más pequeña proporción (1%, v:v) inducen un aumento significativo de la formación micorrízica. Este efecto positivo se efectuó con sólo 7,8 10<sup>3</sup> CFU por litro de sustrato de cultivo (aproximadamente 7 bacterias por gramo de suelo). Este estudio muestra asimismo una interacción significativa entre las dosis fúngicas y los índices de enmienda con termitero.

Todos estos resultados sugieren que la utilización del polvo de termitero tal como *M. Subhyalinus*, que contiene algunos MHB ("Mycorrhiza Jelper Bacteria") proporciona una herramienta de inóculo beneficiosa para el desarrollo de estas bacterias protegiendo las células bacterianas de factores medioambientales perjudiciales.

En la mayoría de los tratamientos fúngicos descritos en el presente estudio, el efecto estimulante de la enmienda con polvo de termitero sobre la formación micorrízica se asoció con un aumento del crecimiento de la planta. Esto sugiere que la enmienda con polvo de termitero no interactúa con la eficacia de la simbiosis micorrízica.

Uno de los problemas encontrados en la micorrización controlada clásica de las plantaciones de bosques reside en la gran cantidad de inóculo fúngico necesaria para la producción de plantas micorrizadas de alta calidad en condiciones de viveros.

En las zonas tropicales y mediterráneas, la dosis de inóculo micorrízico añadida por planta al sustrato de cultivo es generalmente de 1 litro por litro de suelo (inoculación endomicorrízica) (Duponnois, R., Plenchette, C., Prin, Y., Ducouso, M., Kisa, M., Bâ, A.M. & Galiana, A. (2007). Use of mycorrhizal inoculation to improve reforestation process with Australian Acacia in Sahelian ecozones. *Ecological Engineering*, 29: 105-112).

Con el procedimiento de la invención, estas cantidades se reducen drásticamente puesto que, con sólo 450 ml de inóculo ectomicorrízico o endomicorrízico (mezcla de esporas, raíces micorrízicas y suelo de rizosfera), se pueden producir aproximadamente 100 plantas de *A. holosericea* con el mismo crecimiento y colonización micorrízica que unas plantas micorrizadas producidas por el procedimiento clásico de micorrización.

Por consiguiente, los costes de inoculación se pueden reducir en gran medida puesto que los termiteros se encuentran comúnmente en los ecosistemas y puesto que las cantidades fúngicas requeridas son muy bajas.

Esta técnica de inoculación puede ser útil para la reforestación de las regiones tropicales, puesto que es bien

conocido que la micorrización controlada es una herramienta beneficiosa para aumentar la supervivencia y la productividad de las variedades de árboles en las zonas degradadas.

## REIVINDICACIONES

1. Utilización de por lo menos un inóculo fúngico constituido por uno o varios hongos endomicorrízicos y/o ectomicorrízicos, y por polvo de termiteros, como agente estimulante de la micorrización de cultivos en particular forestales, de cereales, forrajeros, de hortalizas, frutícolas u hortícolas, siendo dicho inóculo utilizado a una dosis por semilla o planta, de aproximadamente por lo menos diez veces inferior a la dosis utilizada en ausencia de polvo de termiteros, siendo la dosis de 0,01 a 1 ml de inóculo fúngico y preferentemente de 0,01 a 0,1 ml de inóculo fúngico y estando la relación inóculo : polvo de termiteros comprendida entre 0,1% (v:v) y 10% (v:v), preferentemente 0,1% (v:v) y 5% (v:v) y más preferentemente entre 0,1% (v:v) y 1% (v:v).
2. Utilización según la reivindicación 1, en la que el polvo de termiteros procede de termitas del género *Macrotermes* y preferentemente del género *Macrotermes subhyalinus*.
3. Utilización según una de las reivindicaciones 1 ó 2, en la que el inóculo fúngico está constituido por uno o varios hongos endomicorrízicos, del género *Glomus*, seleccionado en particular de entre *Glomus mosseae*, *Glomus fasciculatus*, *Glomus aggregatum*, *Glomus intraradices* y preferentemente *Glomus intraradices*.
4. Utilización según una de las reivindicaciones 1 ó 2, en la que el inóculo fúngico está constituido por uno o varios hongos ectomicorrízicos, del género *Pisolithus*, seleccionado en particular de entre *Pisolithus albus*, *Pisolithus tinctorius*, o del género *Scleroderma*, seleccionado en particular de entre *Scleroderma dictyosporum*, *Scleroderma verrucosum* y preferentemente *Scleroderma dictyosporum*.
5. Utilización según una de las reivindicaciones 1 ó 2, en la que el inóculo fúngico está constituido por uno o varios hongos endomicorrízicos del género *Glomus*, seleccionado en particular de entre *Glomus mosseae*, *Glomus fasciculatus*, *Glomus aggregatum*, *Glomus intraradices* y preferentemente *Glomus intraradices*, y por uno o varios hongos ectomicorrízicos del género *Pisolithus*, seleccionado en particular de entre *Pisolithus albus*, *Pisolithus tinctorius*, o del género *Scleroderma*, seleccionado en particular de entre *Scleroderma dictyosporum*, *Scleroderma verrucosum* y preferentemente *Scleroderma dictyosporum*.
6. Utilización según una de las reivindicaciones 1 a 5, en la que el inóculo fúngico se prepara mediante crecimiento de un hongo endomicorrízico sobre un soporte, en particular en presencia de una planta micotrófica, en particular de tipo arena, o mediante crecimiento de un hongo ectomicorrízico sobre un soporte de tipo turba-vermiculita o de bolas de alginato de calcio.
7. Utilización según una de las reivindicaciones 1 a 6, en la que el inóculo fúngico y el polvo de termiteros están asociados a un sustrato, seleccionado en particular de entre la arena, el abono compuesto que procede de residuos de cultivo y preferentemente de mantillo, o una mezcla de arena y de abono compuesto.
8. Utilización según una de las reivindicaciones 1 a 7, en la que la relación inóculo fúngico : sustrato del inóculo está comprendida entre 1% (v:v) y 10% (v:v), preferentemente entre 1% (v:v) y 5% (v:v) y más preferentemente tiene el valor de 1% (v:v).
9. Utilización según una de las reivindicaciones 1 a 8, en la que la relación polvo de termiteros : sustrato del inóculo está comprendida entre 1% (v:v) y 10% (v:v), preferentemente entre 1% (v:v) y 5% (v:v) y más preferentemente tiene el valor de 1% (v:v).
10. Utilización según una de las reivindicaciones 1 a 3 y 6 a 9, en particular de hongo endomicorrízico, en unos espacios destinados a los cultivos, en particular de cereales, forrajeros, de hortalizas, frutícolas u hortícolas, y preferentemente de hortalizas, frutícolas y hortícolas.
11. Utilización según una de las reivindicaciones 1 ó 2 y 4 a 9, en particular de hongo ectomicorrízico, en unos espacios destinados a los cultivos forestales.
12. Utilización según una de las reivindicaciones 1 a 9, en particular de hongo endomicorrízico y ectomicorrízico, en unos espacios destinados a los cultivos forestales, en particular las esencias leñosas de los géneros Casuarina, Allocasuarina, Eucalyptus y Acacia de origen australiano.
13. Composición que comprende por lo menos un inóculo fúngico constituido por uno o varios hongos endomicorrízicos y/o ectomicorrízicos, y polvo de termiteros, estando la relación inóculo : polvo de termiteros comprendida entre 0,1% (v:v) y 10% (v:v), preferentemente entre 0,1% (v:v) y 5% (v:v) y más preferentemente entre 0,1% (v:v) y 1% (v:v).
14. Composición según la reivindicación 13, que comprende:
- a. un inóculo fúngico constituido por uno o varios hongos endomicorrízicos del género *Glomus*, tal como se ha definido en la reivindicación 3,

- b. polvo de termiteros, tal como se ha definido en la reivindicación 2, estando el tamaño de las partículas de dicho polvo de termiteros comprendido entre 1  $\mu\text{m}$  y 1.000  $\mu\text{m}$ , y preferentemente entre 1  $\mu\text{m}$  y 500  $\mu\text{m}$ ,
- 5 estando la relación inóculo fúngico : polvo de termiteros comprendida entre 0,1% (v:v) y 10% (v:v), preferentemente entre 0,1% (v:v) y 5% (v:v) y más preferentemente entre 0,1% (v:v) y 1% (v:v).
15. Composición según la reivindicación 13 ó 14, en la que el inóculo fúngico está constituido por:
- 10 i. uno o varios hongos endomicorrízicos que resultan por ejemplo del crecimiento de una dosis de aproximadamente 2 g de raíces micorrizadas de dicho hongo endomicorrízico,
- ii. un soporte de tipo arena
- 15 iii. una planta micotrófica.
16. Composición según una de las reivindicaciones 13 a 15, que comprende:
- 20 a. un inóculo fúngico constituido por uno o varios hongos endomicorrízicos,
- b. polvo de termiteros,
- 25 c. un sustrato seleccionado de entre el abono compuesto, que procede de residuos de cultivo, y preferentemente de mantillo, arena, o una mezcla de arena y de abono compuesto, estando la relación polvo de termiteros : sustrato comprendida entre 1% (v:v) y 10% (v:v), y preferentemente entre 1% (v:v) y 5% (v:v) y más preferentemente tiene el valor de 1% (v:v), y estando la relación inóculo fúngico : sustrato comprendida entre 1% (v:v) y 10% (v:v), preferentemente entre 1% (v:v) y 5% (v:v) y más preferentemente tiene el valor de 1% (v:v).
- 30 17. Composición según la reivindicación 13, que comprende:
- a. un inóculo fúngico constituido por uno o varios hongos ectomicorrízicos, del género *Pisolithus*, tal como se ha definido en la reivindicación 4,
- 35 b. polvo de termiteros, tal como se ha definido en la reivindicación 2, estando el tamaño de las partículas de dicho polvo comprendido entre 1  $\mu\text{m}$  y 1.000  $\mu\text{m}$ , preferentemente entre 1  $\mu\text{m}$  y 500  $\mu\text{m}$ ,
- c. un sustrato tal como se ha definido en la reivindicación 7,
- 40 estando la relación inóculo fúngico : polvo de termiteros comprendida entre 0,1% (v:v) y 10% (v:v), preferentemente entre 0,1% (v:v) y 5% (v:v) y más preferentemente entre 0,1% (v:v) y 1% (v:v), y
- estando la relación inóculo fúngico : sustrato comprendida entre 1% (v:v) y 10% (v:v), preferentemente entre 1% (v:v) y 5% (v:v) y más preferentemente tiene el valor de 1% (v:v), y
- 45 estando la relación polvo de termiteros : sustrato comprendida entre 1% (v:v) y 10% (v:v), preferentemente entre 1% (v:v) y 5% (v:v) y más preferentemente tiene el valor de 1% (v:v),
- 50 con la condición de que por lo menos una de las dos relaciones, inóculo fúngico : sustrato o polvo de termiteros : sustrato, sea inferior a 10% (v:v) y preferentemente que por lo menos una de dichas dos relaciones esté comprendida entre 1% (v:v) y 5% (v:v).
18. Composición según la reivindicación 17, en la que el inóculo fúngico está constituido por:
- 55 i. uno o varios hongos ectomicorrízicos, que resultan por ejemplo del crecimiento de una dosis de 10 mg de peso seco de biomasa de hongo ectomicorrízico,
- ii. un soporte de tipo turba-vermiculita (1:4, v:v) o bolas de alginato de calcio.
- 60 19. Composición según una de las reivindicaciones 13 a 16, que comprende:
- a. un inóculo fúngico constituido por un hongo endomicorrízico del género *Glomus*, tal como se ha definido en la reivindicación 3, y por un hongo ectomicorrízico del género *Pisolithus*, tal como se ha definido en la reivindicación 4,
- 65 b. polvo de termiteros, tal como se ha definido en la reivindicación 2, estando el tamaño de las partículas de dicho polvo comprendido entre 1  $\mu\text{m}$  y 1.000  $\mu\text{m}$ , y preferentemente entre 1  $\mu\text{m}$  y 500  $\mu\text{m}$ ,

estando la relación inóculo fúngico : polvo comprendida entre 0,1% (v:v) y 10% (v:v), preferentemente entre 0,1% (v:v) y 5% (v:v) y más preferentemente entre 0,1% (v:v) y 1% (v:v).

5 20. Composición según la reivindicación 19, en la que el inóculo fúngico está constituido por:

i. uno o varios hongos endomicorrízicos que resultan por ejemplo del crecimiento de una dosis de aproximadamente 2 g de raíces micorrizadas de dicho hongo endomicorrízico y un hongo ectomicorrízico que resulta por ejemplo del crecimiento de una dosis de 10 mg de peso seco de biomasa de hongo ectomicorrízico,

10 ii. un soporte de tipo arena en asociación con una planta micotrófica para el hongo endomicorrízico y un soporte de tipo turba-vermiculita (1:4, v:v) o bolas de alginato de calcio para el hongo ectomicorrízico.

15 21. Composición según una de las reivindicaciones 19 ó 20, que comprende:

a. un inóculo fúngico,

b. polvo de termiteros,

20 c. un sustrato seleccionado entre el abono compuesto que procede de residuos de cultivo, y preferentemente de mantillo, arena, o una mezcla de arena y de abono compuesto, estando la relación polvo de termiteros : sustrato comprendida entre 1% (v:v) y 10% (v:v), preferentemente entre 1% (v:v) y 5% (v:v) y más preferentemente tiene el valor de 1% (v:v), y estando la relación inóculo fúngico : sustrato comprendida entre 1% (v:v) y 10% (v:v), preferentemente entre 1% (v:v) y 5% (v:v) y más preferentemente tiene el valor de 1% (v:v).

25 22. Composición según una de las reivindicaciones 13 a 21, en la que el polvo de termiteros procede de termitas del género *Macrotermes* y preferentemente del género *Macrotermes subhyalinus*.

30 23. Procedimiento de estimulación de la micorrización en unos espacios destinados a los cultivos, que comprende una etapa de introducción de una mezcla de por lo menos un inóculo fúngico constituido por uno o varios hongos endomicorrízicos y/o ectomicorrízicos y polvo de termiteros, eventualmente triturado, tal como se han definido en la reivindicación 1, estando la relación inóculo : polvo de termiteros comprendida entre 0,1% (v:v) y 10% (v:v), preferentemente entre 0,1% (v:v) y 5% (v:v) y más preferentemente entre 0,1% (v:v) y 1% (v:v), tras una etapa de preparación del inóculo fúngico mediante crecimiento de por lo menos un hongo endomicorrízico con un soporte o mediante crecimiento de por lo menos un hongo ectomicorrízico sobre un soporte, y siendo dicho inóculo utilizado a una dosis por semilla o planta de aproximadamente por lo menos diez veces inferior a la dosis utilizada en ausencia de polvo de termiteros, de 0,01 a 1 ml de inóculo fúngico y preferentemente de 0,01 a 0,1 ml de inóculo fúngico.

40 24. Procedimiento según la reivindicación 23, en el que la dosis de inóculo fúngico por elemento unitario de cultivo está comprendida entre 0,01 y 1 ml, y preferentemente entre 0,01 y 0,1 ml.

45 25. Procedimiento según una de las reivindicaciones 23 ó 24, en el que el inóculo fúngico es un inóculo fúngico específico de la endomicorrización constituido por uno o varios hongos endomicorrízicos del género *Glomus*, seleccionado en particular de entre *Glomus mosseae*, *Glomus fasciculatus*, *Glomus aggregatum*, *Glomus intraradices* y preferentemente *Glomus intraradices*.

50 26. Procedimiento según una de las reivindicaciones 23 ó 24, en el que inóculo fúngico es un inóculo fúngico específico de la ectomicorrización constituido por uno o varios hongos ectomicorrízicos del género *Pisolithus*, seleccionado en particular de entre *Pisolithus albus*, *Pisolithus tinctorius*, o del género *Scleroderma*, seleccionado en particular de entre *Scleroderma dictyosporum*, *Scleroderma verrucosum* y preferentemente *Scleroderma dictyosporum*.

55 27. Procedimiento según una de las reivindicaciones 24 ó 25, en el que el inóculo fúngico es un inóculo constituido por uno o varios hongos endomicorrízicos del género *Glomus*, seleccionado en particular de entre *Glomus mosseae*, *Glomus fasciculatus*, *Glomus aggregatum*, *Glomus intraradices* y preferentemente *Glomus intraradices* y por uno o varios hongos ectomicorrízicos del género *Pisolithus*, seleccionado en particular de entre *Pisolithus albus*, *Pisolithus tinctorius*, o del género *Scleroderma*, seleccionado en particular de entre *Scleroderma dictyosporum*, *Scleroderma verrucosum* y preferentemente *Scleroderma dictyosporum*.

60 28. Procedimiento según una de las reivindicaciones 23 a 27, en el que el tamaño de las partículas de dicho polvo está comprendido entre 1 µm y 1.000 µm, y preferentemente entre 1 µm y 500 µm.

65 29. Procedimiento según una de las reivindicaciones 23 a 28, en el que el polvo de termiteros procede de termitas del género *Macrotermes* y preferentemente del género *Macrotermes subhyalinus*.

30. Procedimiento de estimulación de la micorrización en unos espacios destinados a los cultivos según una de las

reivindicaciones 23 a 29, en el que se ha introducido una mezcla de inóculo fúngico y polvo de termiteros, eventualmente triturado, en asociación con un sustrato, habiendo sido el inóculo fúngico y el polvo de termiteros mezclados con un sustrato, y estando dicho inóculo fúngico preparado mediante crecimiento de un hongo micorrízico sobre un soporte.

5 31. Procedimiento según la reivindicación 30, en el que el inóculo fúngico se prepara mediante crecimiento de por lo menos un hongo endomicorrízico a la dosis útil de aproximadamente 2 g de raíces micorrizadas sobre un soporte constituido por arena en asociación con una planta micotrófica, o mediante crecimiento de por lo menos un hongo ectomicorrízico a la dosis útil de aproximadamente 10 mg de peso seco de biomasa de hongo ectomicorrízico sobre un soporte constituido por turba/vermiculita (1:4 v:v) o por bolas de alginato de calcio.

10 32. Procedimiento según una de las reivindicaciones 30 a 31, en el que el inóculo fúngico y el polvo de termiteros están mezclados con un sustrato, siendo dicho sustrato seleccionado de entre la arena, el abono compuesto que procede de residuos de cultivo y preferentemente de mantillo, o una mezcla de arena y de abono compuesto,

15 estando la relación inóculo fúngico : sustrato comprendida entre 1% (v:v) y 10% (v:v), preferentemente entre 1% (v:v) y 5% (v:v) y más preferentemente tiene el valor de 1% (v:v), y

20 estando la relación polvo de termiteros : sustrato comprendida entre 1% (v:v) y 10% (v:v), preferentemente entre 1% (v:v) y 5% (v:v) y más preferentemente tiene el valor de 1% (v:v).

25 33. Procedimiento según una de las reivindicaciones 30 a 32, que comprende una etapa de introducción de un elemento unitario de cultivo en unos espacios destinados a los cultivos que contienen previamente el inóculo fúngico y el polvo de termiteros, siendo dicho elemento unitario en particular una semilla o una planta.

34. Procedimiento según una de las reivindicaciones 30 a 33, que comprende las etapas siguientes:

30 a. preparar el inóculo fúngico mediante crecimiento de por lo menos un hongo endomicorrízico y de por lo menos un hongo ectomicorrízico sobre un soporte,

b. mezclar el polvo de termiteros, eventualmente triturado, y el inóculo fúngico con un sustrato,

35 c. introducir la mezcla obtenida en la etapa anterior en unos espacios destinados a los cultivos a la dosis por elemento unitario de cultivo de 0,01 a 1 ml de inóculo fúngico y preferentemente de 0,01 a 0,1 ml de inóculo fúngico,

d. introducir un elemento unitario de cultivo, en particular una semilla a cultivar o una planta, en los espacios destinados a los cultivos que contienen la mezcla.

Figura 1

◆ : Proporción del inóculo fúngico (PIF) 1% (v/v). ■ : PIF 5% (v/v). ▲ : PIF 10% (v/v)

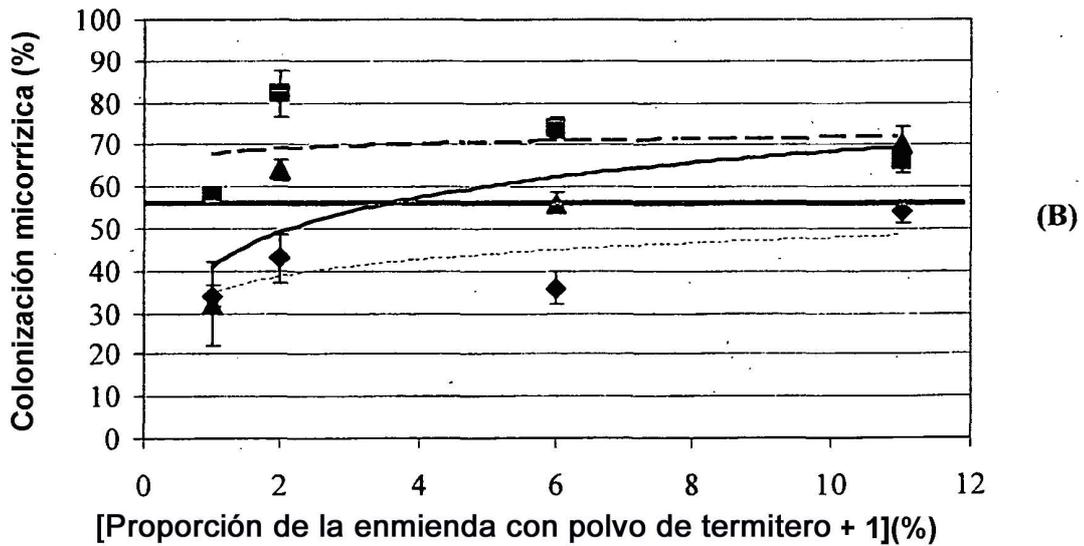
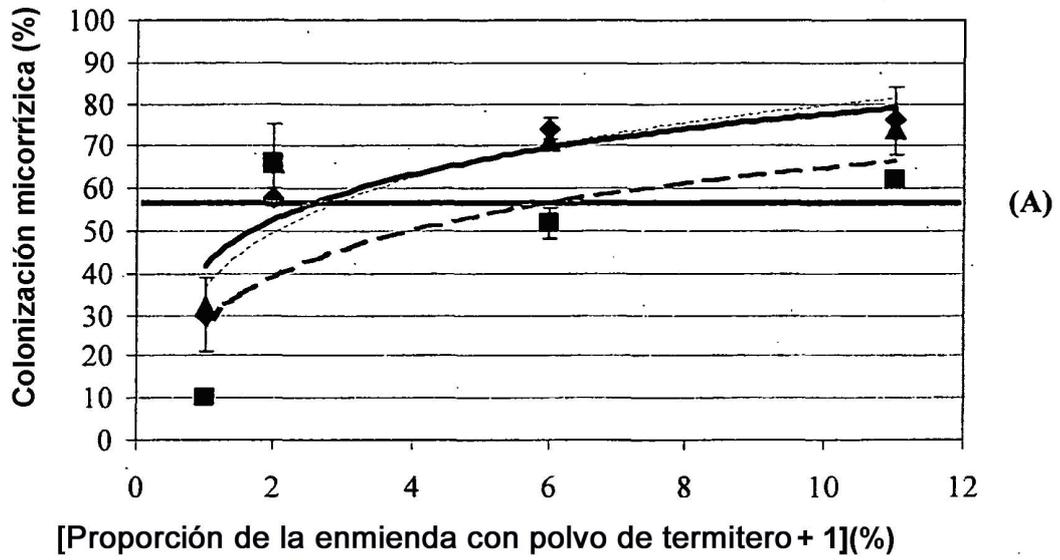
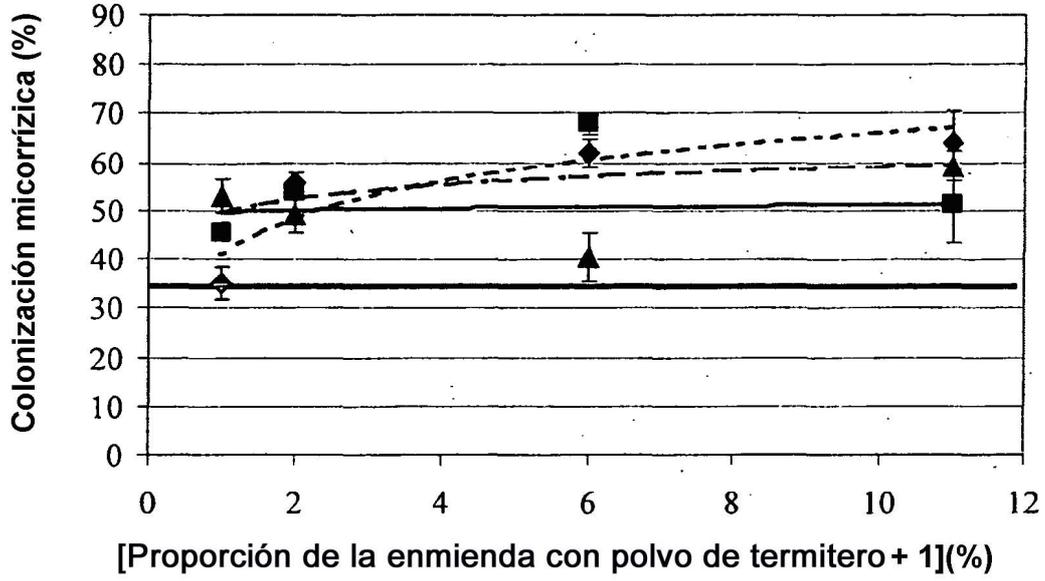
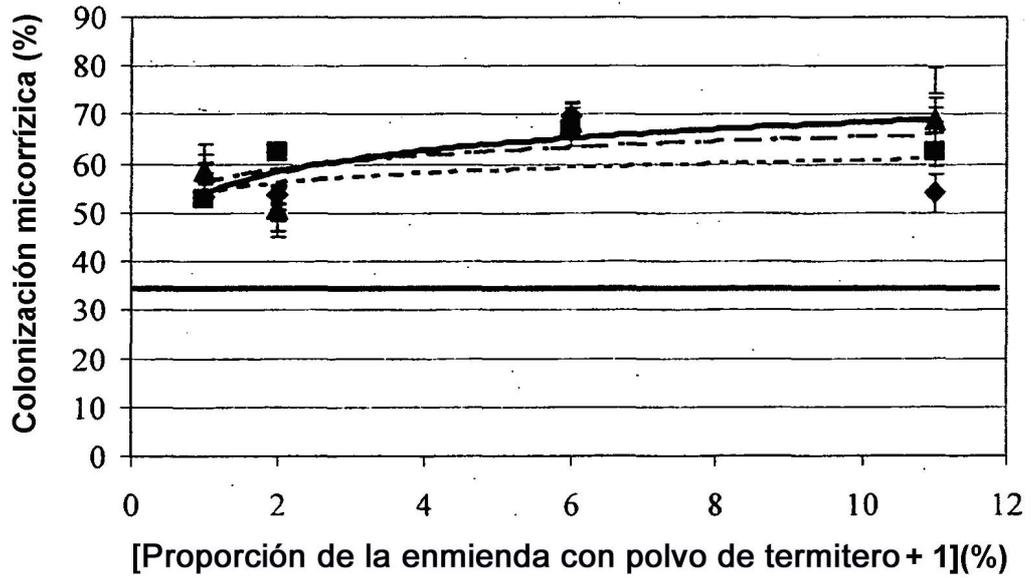


Figura 1 (continuación)



(C)



(D)

FIGURA 2

■ : Proporción de la enmienda con polvo de termitero (PAT) = 0% (v/v). ■ : PAT = 1% (v/v). ■ : PAT = 5% (v/v). ■ : PAT = 10% (v/v).

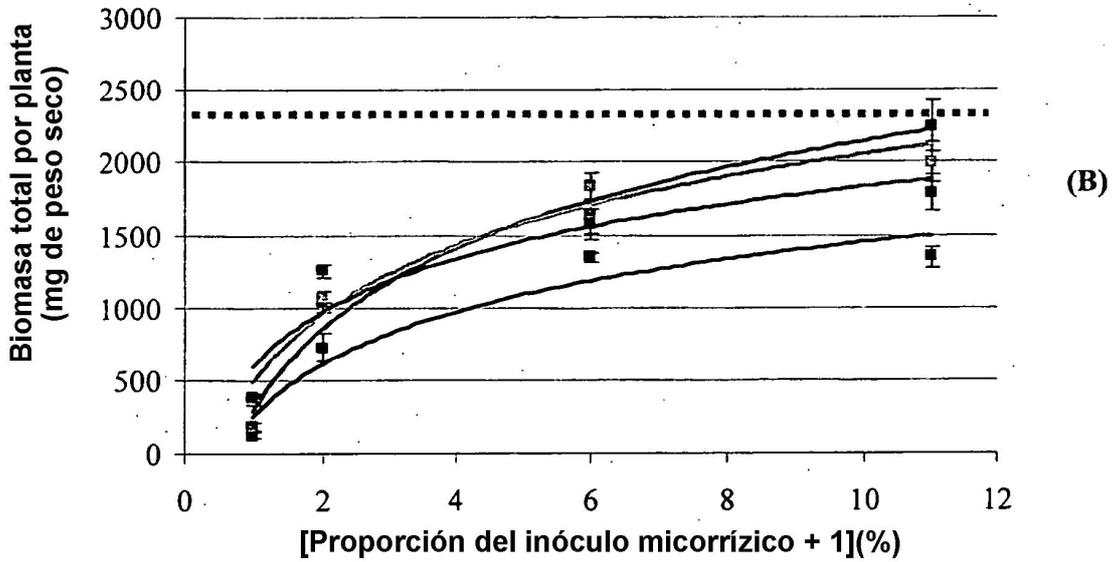
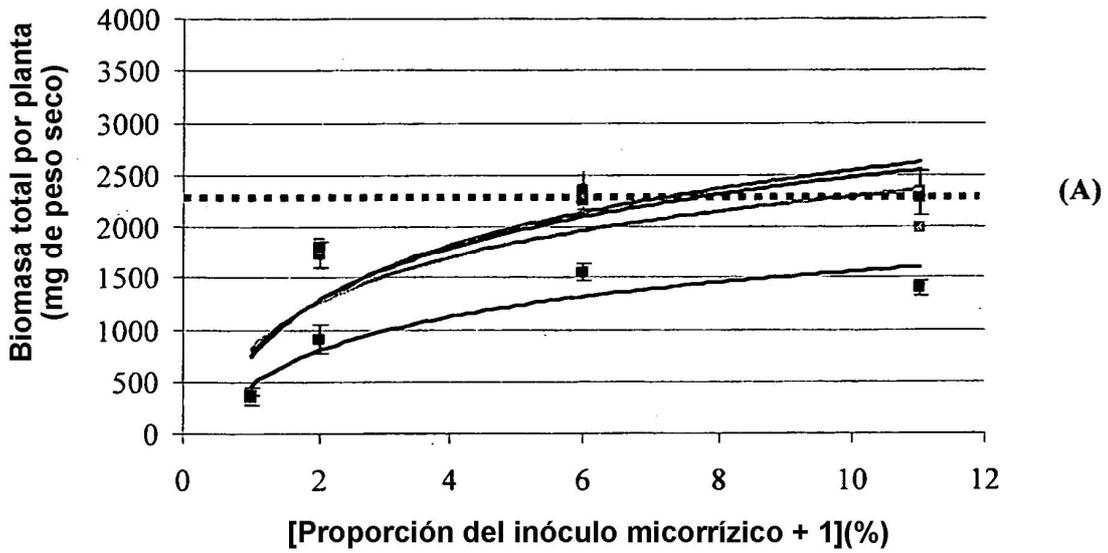


Figura 2 (continuación)

