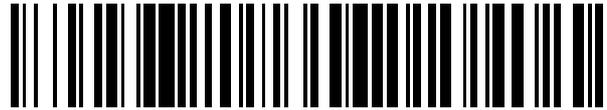


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 571 439**

51 Int. Cl.:

C12N 1/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.07.2013 E 13174717 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.02.2016 EP 2821478**

54 Título: **Cepa de *Glomus iranicum* var. *tenuihypharum* var. nov. y su uso como bionemática**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.05.2016

73 Titular/es:

**SYMBORG, S.L. (100.0%)
Edificio CEEIM, Campus Universitario s/n
30100 Murcia, ES**

72 Inventor/es:

**JUÁREZ, JESÚS y
FERNÁNDEZ, FÉLIX**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 571 439 T3

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

DESCRIPCIÓN

Cepa de *Glomus iranicum* var. *tenuihypharum* var. nov. y su uso como bionemática

CAMPO DE LA INVENCION

5 La invención se refiere al sector agronómico. Concretamente, la presente invención se refiere a una composición que comprende una cepa *Glomus iranicum* var. *tenuihypharum* var. nov. y otros componentes, que se utiliza como bionemática.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 Las composiciones micorrizógenas fabricadas hasta el momento tienen un límite natural de propágulos micorrízicos, dicho límite se debe principalmente a la cepa utilizada y al procedimiento de obtención de las composiciones micorrizógenas.

15 Los nematodos fitoparásitos representan una amenaza global para la producción agraria. Existen más de 40 géneros que actúan como parásitos obligados de plantas superiores. Uno de los métodos disponibles para la protección de los cultivos es la utilización de productos químicos sintéticos, pero muchos de estos productos tienen efectos adversos sobre los humanos y pueden ser tóxicos para el medioambiente. Alternativamente, los agricultores pueden elegir la utilización de aproximaciones biológicas como los hongos formadores de micorrizas que colonizan las raíces de las plantas cultivadas y reducen el daño causado por nematodos gracias a la compensación e incremento en el sistema radicular y al incremento en la absorción de nutrientes. Sin embargo, los hongos formadores de micorrizas disponibles actualmente no producen micelio de forma consistente, no consiguen un alto grado de colonización micorrízica y no consiguen una alta efectividad en cultivos de agricultura intensiva. La invención aquí descrita proporciona una nueva cepa de hongo formador de micorrizas que demuestra un mayor rendimiento sobre otros hongos y productos descritos en el estado de la técnica.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Una realización de la invención es una cepa de *Glomus iranicum* var. *tenuihypharum* var. nov. depositada con número de depósito BCCM 54871, que comprende la secuencia identificada por SEQ ID NO: 1.

25 La cepa *Glomus iranicum* var. *tenuihypharum* var. nov. de la invención, aislada de un suelo sódico salino Solonetz Gley en la localidad de Fortuna, Murcia (España), ha sido depositada el 19/04/2013 en la autoridad internacional de depósito Belgian Coordinated Collections of Micro-Organisms (BCCM) con dirección Université Catholique de Louvain, Mycothèque de l'Université catholique de Louvain (MUCL), Croix du Sud 2, box L7.05.06, 1348 Louvain-la-Neuve, por Symborg, S.L., con dirección en Edificio Ceeim, Campus Universitario, S/N, 30100 Murcia, España.

30 La cepa *Glomus iranicum* var. *tenuihypharum* var. nov. ha sido identificada por el depositante mediante la referencia SYMBORG-001, y recibió el número de depósito 54871 por la autoridad internacional de depósito.

35 Los esporocarpos de la cepa *Glomus iranicum* var. *tenuihypharum* var. nov. de la invención son desconocidos. Las esporas de dicha cepa se presentan solas o en racimos sueltos en el suelo, también se pueden formar esporádicamente dentro de las raíces. Las esporas son hialinas a la luz ocre, de forma subglobosas a globosas, (rara vez irregulares) relativamente pequeña, (24,0) 30,7 ± 3,7 (42) micras de diámetro, compuesto de dos capas de pared (1-4 μm de espesor) una compacta laminar interior (0.5-1.5 μm), y una capa exterior semi-permanente, áspera en esporas jóvenes de aspecto algo rugosa en esporas adultas y mayores 0,5 a 2,0 μm de espesor. Pared de la espora interior de las esporas jóvenes presentan una tinción marrón rojizo con el reactivo de Melzer, pero este color desaparece en la tinción de esporas maduras, el contenido de las esporas es de apariencia pálida. La hifa que sostiene a la espora presenta una coloración de hialina a ocre pálido, es recta u ondulada 2,5 a 4,5 micras de diámetro (media de 3,0 micras), cilíndrica y una ligera forma de embudo que se fusiona con las capas de la pared de esporas, de poro abierto, al menos en las esporas maduras. Estructura de germinación: tubo germinativo que crece y se desarrolla a volver a través de la unión de la hifa con la espora. Forma micorrizas arbusculares vesiculares.

45 El micelio forma una extensa red. El micelio extramático es hialino a amarillo pálido, profusa y las esporas aparecen siempre en la matriz del suelo, formando esporocarpos abundantes en grupo (2 hasta 8 esporas individuales). La característica singular de esta especie es la gran cantidad de redes de micelio externo y la incapacidad de crecer bajo asociación in vitro de raíces transformadas.

La cepa fue aislada de un tipo de suelo salino del tipo Solonetz Gley. La principal característica de estos suelos es que son muy hidromórficos, muy compactos y con una gran cantidad de depósitos de sal en la superficie.

La cepa fue aislada de un suelo ubicado en la localidad de Fortuna, Murcia (España).

En la siguiente tabla se muestran algunas propiedades químicas del suelo original de donde fue aislada la cepa de *Glomus iranicum* var. *tenuihypharum* var. nov..

Tabla 1. Propiedades del suelo

Parámetros	Valores
pH (H ₂ O)	8.5
CO ₃ Ca (%)	12
C/N	6.5
Ca ⁺⁺ (ppm)	5809,6
Mg ⁺⁺ (ppm)	2967,04
K ⁺ (ppm)	2955
Na ⁺ (ppm)	1829,4

5

De acuerdo con una filogenia basada en 813 pares de bases de los genes 18S ARN ribosómico (secuencia parcial), ITS1 (espaciador transcrito interno 1, secuencia completa) y el gen 5.8S de ARN ribosomal (secuencia parcial) la cepa de la invención se categoriza en un clado que consiste en *Rhizophagus* (antes grupo *Glomus* Ab, representada por *Rhizophagus irregularis*, *Rhizophagus intraradices* y *Glomus bistratum*).

- 10 De acuerdo con esta filogenia *Glomus indicum* y *Glomus achrum* son los parientes más cercanos. En el servidor NCBI (banco de genes) alrededor de cincuenta secuencias de clones *Glomus* spp. no cultivados pueden ser encontrados con una muy alta identidad (99%) a la secuencia de la cepa de la invención.

- 15 Parece por lo tanto que el nuevo taxón tiene una distribución cosmopolita y una amplia gama de huéspedes. Secuencias muy similares se han originado en Japón (Ogura-Tsujita Y. et al. 2013. Arbuscular mycorrhiza formation in cordate gametophytes of two ferns, *Angiopteris lygodiiifolia* and *Osmunda japónica*. *Journal of Plant Research*. 126 (1): 41-50; Yamato M. et al. 2011. Arbuscular mycorrhizal fungi in roots of nonphotosynthetic plants, *Sciaphila japonica* and *Sciaphila tosaensis* (Triuridaceae). *Mycoscience* 52: 217-223.), Nueva Zelanda, África y América del Norte (Appoloni S. et al. 2008. Molecular community analysis of arbuscular mycorrhizal fungi in roots of geothermal soils in Yellowstone National Park (USA). *Microbial Ecology* 56 (4): 649-659).

- 20 El carácter morfológico más llamativo de la cepa de la invención es el pequeño tamaño de sus esporas y su coloración de hialina a muy ligero ocre y que se producen solas o en pequeños grupos en el suelo.

- 25 La única cepa de *Glomus* sp. con esporas hialinas que son similares en tamaño y color a la cepa de la invención es *Glomus iranicum* (Blaszkowski J et al. (2010). *Glomus africanum* and *G. iranicum*, two new species of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota). *Mycologia* 102: 1450-1462.) (Tabla 1). Las tres capas de la pared de las esporas son morfológicamente indistinguibles de la de la cepa de la invención. Existe una diferencia inequívoca en la cepa de la invención y es que el tamaño de sus hifas unidas a la espора es muy fino.

- 30 La pared L1 externa de las esporas de *Glomus iranicum* (Blaszkowski J et al. (2010). *Glomus africanum* and *G. iranicum*, two new species of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota). *Mycologia* 102: 1450-1462.) se deteriora rápidamente y consistentemente, con una fuerte actividad dextrinoide, sin embargo en el caso de la cepa de la invención, solo se aprecia en esporas muy jóvenes con lo cual se concluye que es una variedad de *Glomus iranicum* y proponemos la variedad nueva *tenuihypharum*.

Es una cepa que se adapta y tolera perfectamente ambientes salinos, y soluciones fertilizantes con elevadas conductividades eléctricas.

- 35 La especie es productora de abundante micelio extramático, lo cual garantiza un adecuado funcionamiento simbiótico.

La especie alcanza elevadas concentraciones de colonización interna en cortos períodos de tiempo, sobre todo en cultivos bajo agricultura intensiva, indicando una elevada efectividad de actuación bajo estas condiciones.

- 5 Debido al pequeño tamaño de sus esporas y el abundante micelio extramático, así como la capacidad de recuperación del mismo, por daños físicos, la cepa permite ser manipulada y molida por debajo de 80 micras, permaneciendo totalmente viable en un sustrato de arcilla por más de dos años y con una efectividad comprobada en un rango de $1,2 \times 10^4$ y 1×10^8 propágulos infectivos. 100 ml^{-1} de suelo.

La aplicación de esta especie promueve una efectiva respuesta en la productividad de los cultivos bajo agricultura intensiva, y mantiene siempre unos niveles de actividad fisiológica elevada, a expensas de un costo energético bajo, dado por las bajas tasas de transpiración que promueven un uso elevado y eficiente del agua.

- 10 La cepa promueve un cambio radical de la arquitectura radicular, promoviendo un sistema radicular diferente, horizontal y con una mayor dicotomía inducido por la rápida colonización micorrízica interna, externa y la necesidad de mayores cantidad de células radiculares hospederas, que también promueven un mayor desarrollo de raíces en el corto y largo plazo.

- 15 Otro aspecto importante a valorar es la actividad microbiana que genera este microorganismo en el sistema rizosférico. Esta cepa produce una constante estimulación de la microbiota rizosférica en las plantas tratadas. Este hecho obedece a la propia exudación de elementos nutricionales a través de las raicillas, micorrizas e hifas que estimulan tanto la actividad rizosférica como micorizosférica, en las inmediaciones del micelio externo de la cepa de *Glomus iranicum* var. *tenuihypharum* var. nov., lo cual produce una mayor concentración microbiana en cada uno de los momentos evaluados.

- 20 *Glomus iranicum* var. *tenuihypharum* var. nov. es una especie de hongo formador de micorrizas excelente.

Otra realización es una composición que comprende una cepa de *Glomus iranicum* var. *tenuihypharum* var. nov. depositada con número de depósito BCCM 54871 que comprende la secuencia identificada por SEQ ID NO: 1, arcillas esmécticas 2:1, iones metálicos y quitina.

- 25 De forma particular, dichas arcillas esmécticas 2: 1 son dioctaédricas o trioctaédricas. Y también de forma particular, dichas arcillas esmécticas 2:1 están seleccionadas del grupo compuesto por sepiolita, atapulgita, nontronita y saponita.

- 30 La presente invención utiliza arcillas de tipo esmécticas dioctaédricas o trioctaédricas, sepiolitas y atapulgita, todas 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. Estos tipos de arcillas una vez concluido una de las fases de producción del inoculante, le confieren a los propágulos micorrízicos: esporas, micelio extramático y raicillas colonizadas; situaciones estresantes que promueven una posterior aceleración de los procesos germinativos una vez inoculados en condiciones de cultivos intensivos y ecológicos.

- 35 Otra realización es la composición de la invención, donde la concentración de dicha cepa *Glomus iranicum* var. *tenuihypharum* var. nov. es entre 0.05 y 4% en peso. De forma particular, dicha concentración es entre 0.1 y 3 % en peso.

Otra realización es la composición de la invención, donde la concentración de quitina es entre 2 y 10 % en peso.

- 40 Otra realización es la composición de la invención, donde dichos iones metálicos están seleccionados del grupo compuesto por Fe, Ca y Mg.

De forma particular, la composición de la invención comprende Fe, Ca y Mg.

Otra realización es la composición de la invención, donde la concentración de Fe es entre 3 y 12 % en peso, la concentración de Ca es entre 0.5 a 5 % en peso y la concentración de Mg es entre 0.2 a 2 % en peso.

- 45 Por su expresión micorrízica es bueno resaltar la abundante y significativa producción de micelio extramático y de Glomalina fácilmente extractable que se produce en presencia de la especie *Glomus iranicum* var. *tenuihypharum* var. nov., con independencia de la fertilización empleada, indicativo de la adaptación de este microorganismo a diversos ambientes salinos.

La plantas tratadas con *Glomus iranicum var. tenuihypharum var. nov.* exhiben mayor producción de biomasa foliar y radicular, relacionada a su vez con una mayor concentración de nutrientes en hojas en presencia de las mayores dosificaciones de fertilizantes, indicativo de elevada tolerancia a estas condiciones.

5 La aplicación de *Glomus iranicum var. tenuihypharum var. nov.* produce una actividad fotosintética elevada a expensa de menores tasas de transpiración, lo cual conduce a que las plantas tratadas hagan un uso del agua más eficiente a lo largo del cultivo, tanto en las dosis del 50% como del 100% del fertilizante aplicado.

10 La cepa *Glomus iranicum var. tenuihypharum var. nov.* tiene una elevada actividad de la cepa *Glomus iranicum var. tenuihypharum var. nov.* con relación al resto de los inoculantes empleados en el ejemplo 1, posiblemente derivada de la propia naturaleza de la especie, altamente simbiótica, superproductora de micelio extramátrico, Glomalina y una fuerte colonización interior, que produce a su vez una adecuada actividad fisiológica con una baja conductancia estomática, conducente a un uso eficiente del agua con elevadas productividades, aun con las dosis más elevadas de fertilizante.

Otra realización es la composición de la invención, donde la forma de presentación de dicha composición es polvo, concentrado emulsionable o granulado.

15 Otra realización es la composición de la invención, donde que dicha composición es un líquido, un sólido o un gel.

Otra realización es la composición de la invención, que comprende al menos un fungicida, al menos un biofungicida, al menos un insecticida, al menos un bioinsecticida, al menos un nematocida y/o al menos un bionemática.

20 De forma particular, dicho fungicida está seleccionado del grupo compuesto por Maneb, Mancozeb, Metalaxyl-Ridomil, Myclobutanil, Olpisan, Propamocarb, Quintozene, Streptomycin, Sulfur, Thiophanate-methyl, Thiram, triforine, Vinclozolin, Zinc white, Zineb, Ziram, Banrot, Fixed copper, Chlorothalonil, Chlorothalonil, Captan, Chloroneb, Cyproconazole, Zinc ethelene, bisdithiocarbamate, Etridiazole, Fenaminosulf, Fenarimol, Flutolanil, Folpet, Fosetyl-AL y Iprodione.

25 De forma particular, dicho biofungicida está seleccionado del grupo compuesto por *Trichoderma* sp, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Streptomyces* sp, *Coniothyrium minitans* y *Pythium oligandrum*.

De forma particular, dicho insecticida está seleccionado del grupo compuesto por organofosfato, carbamato y neonicotinoide.

De forma particular, dicho bioinsecticida está seleccionado del grupo compuesto por *Bacillus* sp., *Chromobacterium* sp., *Beauveria* sp. y *Metarhizium* sp.

30 De forma particular, dicho nematocida es organofosfato o carbamato.

De forma particular, dicho bionemática es *Pasteuria* sp.

Otra realización es el procedimiento de obtención de la composición de la invención, que comprende:

(a) inocular por recubrimiento una semilla de una planta huésped con la cepa *Glomus iranicum var. tenuihypharum var. nov.* depositada con número de depósito BCCM 54871,

35 (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 y

40 (e) molturar dicho sustrato por debajo de 80 micras a una temperatura entre 25 y 30°C para obtener dicha composición.

En el ejemplo 1, la composición de la invención ha demostrado tener una alta eficiencia como bionemática. Se encontró que el tratamiento con la composición de la invención mostró un desarrollo inicial más vigoroso que se mantuvo durante todo el ciclo del cultivo.

El hecho más relevante es que todos los tratamientos experimentan un acusado descenso productivo a partir de aproximadamente el día 140 desde trasplante, mostrando las plantas un decaimiento severo con el envejecimiento natural y la subida térmica propia de las fechas, que favorecen la proliferación de colonias de nematodos. Provocando la obtención de frutos muy pequeños sin valor comercial.

5 Con la segunda inoculación de los productos con la composición de la invención y aplicación del producto a comparar (Vydate), se reactiva de nuevo la producción y el desarrollo vegetativo de las plantas de una manera general en todos los tratamientos, siendo los productos *Glomus iranicum var. tenuihypharum var. nov.* y composición de la invención los que muestran un mayor vigor y pronta recuperación de la planta. Esto es debido a la rápida acción de esta especie que provocan en la planta la aceleración de la actividad radicular, mostrando un mejor comportamiento que el producto a comparar y llegando con mejor aspecto y prestaciones hasta el final del ensayo, tanto en la parte curativa como en la preventiva. Para evitar este brusco descenso en la producción se recomienda realizar la segunda inoculación de la composición de la invención aproximadamente a los 120 días para bloquear la proliferación del nematodo y fomentar de nuevo el desarrollo radicular.

10 Se obtuvo un mejor rendimiento en las dos variedades de tomate del ejemplo 2 con el tratamiento con la composición de la invención alcanzando casi los 13 Kg/planta con la variedad Daniela y 5 Kg/planta con la variedad Raf, siendo los frutos de este tratamiento los más grandes, lo que evidencia una mejor asimilación de agua y nutrientes en el fruto.

Otra realización es el uso de la composición de la invención como bionemática, en adelante uso de la invención.

20 Otra realización es el uso de la invención, donde la composición de la invención se aplica a la planta por tratamiento de las semillas, tratamiento de las raíces, embebido de raíces en una emulsión, adición al agua de riego, irrigación, aplicación de polvo al sistema radicular o aplicación de emulsión inyectada al sistema de raíces.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

25 Figura 1. Se muestran los resultados de número de bacterias totales (ufc.ml suelo, panel superior) o número de hongos totales (ufc.ml suelo, panel inferior) para diferentes tratamientos en condiciones curativas. Se representan los resultados en presencia de *Glomus iranicum var. tenuihypharum var. nov.* (línea discontinua), en presencia de *Glomus iranicum var. tenuihypharum var. nov.* con iones metálicos y quitina (línea continua), en presencia del compuesto Vidate (línea con guiones y puntos) y resultados del control (línea de puntos).

30 Figura 2. Se muestran los resultados de número de bacterias totales (ufc.ml suelo, panel superior) o número de hongos totales (ufc.ml suelo, panel inferior) para diferentes tratamientos en condiciones preventivas. Se representan los resultados en presencia de *Glomus iranicum var. tenuihypharum var. nov.* (línea discontinua), en presencia de *Glomus iranicum var. tenuihypharum var. nov.* con iones metálicos y quitina (línea continua), en presencia del compuesto Vidate (línea con guiones y puntos) y resultados del control (línea de puntos).

MODOS DE REALIZACIÓN PREFERENTE

EJEMPLO 1

35 Identificación genética de la cepa de la invención

Extracción de ADN

Hifas y esporas aisladas fueron transferidas a tubos Eppendorf de 1,5 ml con 0,2 g de perlas de vidrio de (2 mm de diámetro) y 100 µL del tampón CTAB (2% CTAB = cetyl trimethyl ammonium bromide, 1,4 M de NaCl, 0,1 M Tris-HCl pH 7,5, 0,2 M Na-EDTA).

40 Esta mezcla se homogenizó utilizando un molino de bolas tipo Retsch MM301 a toda velocidad durante 30 segundos. Se añadieron otros 400 µL de tampón CTAB y la mezcla se incubó a 65 ° C durante una hora. Posteriormente se añadieron 400 µL de Cloroformo-álcohol isoamílico (24: 1) y se mezcla invirtiendo los tubos de reacción y posteriormente se centrifugó durante 5 min a 10.000 × g, y la capa superior se recuperó en un tubo Eppendorf limpio. Este paso se repitió dos veces. A esta suspensión se le añadieron 200 µL de acetato de amonio 5 M; incubándose la mezcla a 4 ° C durante 30 minutos, seguido de 20 minutos de hilado a 4 ° C y 13.000 rpm. El ADN se precipitó con 700 µL de isopropanol a -20 ° C durante toda la noche. El sedimento de ADN obtenido se precipitó con isopropanol y se lavó con etanol helado al 70%, secándose al aire y re disolviéndose en 50 µL de tampón Tris etilendiamina (10 mM de Tris, 10 mM de EDTA, pH 8) + 4,5 U de RNasa / ml.

Condiciones de la PCR

Los cebadores usados para la amplificación por PCR y para la secuenciación de los transcritos internos de la región espaciadora del gen 18S rDNA fueron Glom1310 y ITS4i (Redecker, 2000). Las amplificaciones se realizaron en 0,2 mM de dNTP-mix, 1 mM de cada cebador, 10% de tampón de reacción de PCR y agua estéril de doble destilación. Se añadió GoTaq® ADN polimerasa (Promega, Mannheim, Alemania) a 3,75 u / 100 µL de mezcla de reacción; 2 µL de molde de ADN genómico se utilizó en cada 20 µL reacción. Las amplificaciones se llevaron a cabo en un Primus 96 termociclador avanzado- (peqLab Biotecnología) en 200 tubos de reacción µl (94 ° C, 120 s desnaturalización inicial, seguido por 30 ciclos de: 94 ° C 15 s, 52 ° C, 30 s, 72 ° C, 45 s, y una pendiente final a 72 ° C durante 120 s).

Análisis de datos

La alineación se llevó a cabo inicialmente utilizando el programa de ordenador BioEdit 7.0. Se llevaron a cabo análisis filogenéticos de máxima verosimilitud (ML) con el programa PHYML. El modelo de sustitución de nucleótidos GTR se utilizó con la estimación ML de frecuencias de base. La proporción de los sitios invariables fueron estimados y optimizados. Se establecieron cuatro categorías de la tasa de sustitución y el parámetro gamma de distribución fue también estimado y optimizado. Se utilizó un análisis Bootstrap con 100 repeticiones para poner a prueba el apoyo estadístico de las ramas.

Secuenciación

El exceso de cebadores y dNTPs se eliminaron con columnas de cromatografía (Microspin S-300 HR, Amersham Biosciences). Para la secuenciación parcial de la región 18S-ITS1-5.8S se utilizaron los cebadores Glom1310 e ITS4i en una concentración de 1,6 mM. La secuenciación se llevó a cabo con PRISM BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Kit de ABI (Applied Biosystems) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Los parámetros para la secuenciación fueron 18 segundos de retardo a 96 ° C, seguido por 25 ciclos con 18 seg a 96 ° C, 5 segundos a 50 ° C y 4 min a 60 ° C. El análisis de secuencia se realizó utilizando un analizador de secuencia automatizado (ABI PRISM 3130, Applied Biosystems) en conjunción con el software ABI Prism™ Auto Ensamblador (Versión 140, Applied Biosystems).

Se obtuvo la secuencia 18S ARN ribosómico (secuencia parcial), ITS1 (secuencia completa) y el gen 5.8S de ARN ribosomal (secuencia parcial) de la cepa de la invención, secuencia identificada por SEQ ID NO: 1.

EJEMPLO 2

Eficacia de la composición de la invención en cultivo de tomate

El ensayo se estructuró en dos partes, tratamiento preventivo y tratamiento curativo, divididos en 5 tratamientos:

- T₁: Tratamiento Control
- T₂: Tratamiento con inóculo de Micorrizas *Glomus iranicum var. tenuihypharum var. nov.*
- T₃: Tratamiento con producto a ensayar. (Composición de la invención, *Glomus iranicum var. tenuihypharum var. nov.* con iones metálicos y quitina)
- T₅: Tratamiento comparativo con producto comercial (VYDATE, *oxamilo*)

Se ha estimado la cantidad presente del hongo *Glomus iranicum var. tenuihypharum var. nov.* en los tratamientos en los que se inoculó dicho hongo. En un 1 kg de suelo, se produjo entre 1 y 5 gramos de micelio-esporas de esta especie, lo cual constituye un rango entre 0.1 y 0,5 %. Por otro lado, el sistema radicular en donde se produce, alcanzó un 10 % del peso bruto (100 g). Las raicillas finas, que son las que se micorrizan, constituyeron 40 g por 1 kilogramo de suelo, es decir, un 4% del peso total. De estas raicillas finas, solo el 75% tiene propágulos micorrízicos, por lo tanto, el porcentaje de micorrizas en un kilogramo de suelo equivalía a 3%.

La composición de la invención, utilizada en el tratamiento T₃ contiene *Glomus iranicum var. tenuihypharum var. nov.*; las concentraciones de quitina y de iones metálicos en dicha composición fueron las siguientes: quitina 5% en peso, Fe 5% en peso, Ca 4% en peso, y Mg 1% en peso.

Se realizaron 4 repeticiones de cada tratamiento para preventivo y de igual forma para curativo. Cada unidad experimental está constituida por 2 contenedores de cultivo de 30 L de capacidad, conteniendo 2 plantas cada uno. Se seleccionaron plantas al azar en cada tratamiento, o bien, se seleccionaron plantas que hayan sufrido virosis, percance o anomalía. Las filas y contenedores correspondientes a toda la periferia del ensayo no formaron parte del mismo para evitar el efecto borde.

El riego y fertilización fue común en toda la parcela de ensayo. Se estableció una descarga de 4 l/h por contenedor de cultivo, distribuida en 2 puntos de descarga para todos los tratamientos.

5 El agua de riego utilizada en la realización del ensayo procedía del trasvase Tajo-Segura. El agua de riego era alcalina y ligeramente salina, con niveles algo elevados de ión sodio y cloruros, pero en modo alguno limitantes para el cultivo objeto de ensayo.

El inóculo utilizado fue extraído de un lote de turba con raíces de tomate infestadas con nematodos fitoparásitos provenientes de invernaderos de Mazarrón, provincia de Murcia. El inóculo fue homogenizado y multiplicado para garantizar una distribución adecuada de la población de nematodos y garantizar población suficiente para la segunda inoculación.

10 En el análisis previo para la identificación de los nematodos fitoparásitos se identificó alta población de *Meloidogyne*, seguido de *Heterodera* y apenas algún individuo de *Globodera*.

La primera inoculación se hizo coincidir con la fecha de plantación de la parte curativa del ensayo. La segunda inoculación se hizo únicamente en la parte preventiva del ensayo, dos días antes de la primera aplicación de los productos. El ciclo de cultivo fue de 9 meses.

15 La inoculación de nematodos del ensayo curativo se realizó coincidiendo con el trasplante del tomate. Un mes después, se realizó la inoculación de nematodos del ensayo preventivo. Dos días después se realizó la primera aplicación (inoculaciones de la composición de la invención y aplicación de Vydate), y la segunda aplicación (inoculaciones de composición de la invención y aplicación de Vydate) se realizó 2 meses después.

20 El equilibrio de los elementos N, P, K, Ca y Mg utilizado durante el ciclo de cultivo fue: N, 12,8 mM, P, 1,4 mM; K, 5,5 mM; Ca, 4,8 mM; Mg, 2,4 mM. Las concentraciones de fertilizantes aportadas para conseguir dicho equilibrio fueron: ácido fosfórico 72% 0,117 cm³/l, nitrato de calcio 0,379 g/l, nitrato de potasio 0,547 g/l, nitrato de amonio 0,120 g/l, mezcla de micronutrientes 0,020 g/l. En el programador de riego se utilizaron los siguientes parámetros: pH final 5,5, con la finalidad de obtener pH 6 en el gotero, consumo estimado de ácido nítrico al 59% 0,07 l/m³, Conductividad eléctrica (CE) final 2,1 dS/m, incremento CE 0,8 dS/m.

25 En la siguiente tabla se muestran los tratamientos fitosanitarios realizados.

Tabla 8. Tratamientos fitosanitarios

Fecha	Materia activa	Producto	Dosis	Modo de empleo	Causa
06/10/11	Pimetrocina 50% WG	Plenum	50 g/Hl	Mochila 16 l	Mosca blanca
11/10/11	Ciprodinil 37,5%+Fludioxinil 25%	Switch	100 g/Hl	Mochila 16 l	Botritis
11/10/11	<i>Bacillus thuringiensis</i> 2,5% WG	Turex	20 g/Hl	Mochila 16 l	Gusano
16/11/11	Pimetrocina 50% WG	Plenum	50 g/Hl	Mochila 16 l	Mosca blanca
24/11/11	Pimetrocina 50% WG	Plenum	50 g/Hl	Mochila 16 l	Mosca blanca
09/11/11	Pimetrocina 50% WG	Plenum	50 g/Hl	Mochila 16 l	Mosca blanca
09/11/11	<i>Bacillus thuringiensis</i> 2,5% WG	Turex	20 g/Hl	Mochila 16 l	Gusano
03/02/12	Imidacloprid 20% SL	Confidor	75 cc/Hl	Mochila 16 l	Mosca, Pulgón
15/02/12	<i>Bacillus thuringiensis</i> 2,5% WG	Turex	20 g/Hl	Mochila 16 l	Gusano

ES 2 571 439 T3

Fecha	Materia activa	Producto	Dosis	Modo de empleo	Causa
07/03/12	Metiocarb 50% WP	Mesurool	100 g/Hl	Cuba 100 l	Trip
07/03/12	<i>Bacillus thuringiensis</i> 2,5% WG	Turex	20 g/Hl	Cuba 100 l	Gusano
21/03/12	Piriproxifen 10% EC	Brai	75 cc/Hl	Cuba 100 l	Mosca, Pulgón
12/04/12	Imidacloprid 20% SL	Confidor	75 cc/Hl	Cuba 100 l	Mosca, Pulgón
12/04/12	<i>Bacillus thuringiensis</i> 2,5% WG	Turex	20 g/Hl	Cuba 100 l	Gusano
02/05/12	Flubendiamida 24% WG	Fenos	25 g/Hl	Cuba 100 l	Tuta, Polilla
09/05/12	Flubendiamida 24% WG	Fenos	25 g/Hl	Cuba 100 l	Tuta, Polilla
17/05/12	Spinosad 48% SC	Spintor	25 cc/Hl	Cuba 100 l	Tuta, Trip, Mosca
01/06/12	Spinosad 48% SC	Spintor	25 cc/Hl	Cuba 100 l	Tuta, Trip, Mosca
01/06/12	Ciprodinil 37,5%+Fludioxinil 25%	Switch	100 g/Hl	Cuba 100 l	Botritis
20/06/12	Spinosad 48% SC	Spintor	25 cc/Hl	Cuba 100 l	Tuta, Trip, Mosca
20/06/12	<i>Bacillus thuringiensis</i> 2,5% WG	Turex	20 g/Hl	Cuba 100 l	Gusano

Evaluación de la formación de agallas

Por cada tratamiento se realizaron 2 extracciones al inicio en curativo para evaluar el nivel de infestación y en preventivo al final del cultivo con el mismo fin.

- 5 La primera extracción se realizó a los 45 días de la inoculación de nematodos y 7 días de la aplicación del producto a ensayar. Se realizó un escaneado de alta resolución, aumentado las raíces vivas sumergidas en agua osmotizada, observando un alto porcentaje de agallas en todos los tratamientos, lo que indica una población elevada de nematodos.
- 10 La segunda extracción se realizó a los 120 días de la inoculación y 83 días de la aplicación del producto a ensayar. En este momento ya se apreció claramente una diferencia significativa entre tratamientos, siendo los tratamientos con la composición de la invención los que contienen un menor número de agallas y un mayor número de raicillas activas.
- La tercera extracción se realizó al final del cultivo en plantas pertenecientes a la parte de preventivo para estimar el grado de infestación de nematodos en todos los tratamientos.
- 15 Se observó la misma diferencia en desarrollo y arquitectura radicular que a los 120 días, siendo el producto a ensayar el que presentó mejores resultados, como pudo comprobarse en el escaneado de raíces vivas sumergidas en agua osmotizada.

Análisis de raíces

Por cada tratamiento se realizaron 9 extracciones de suelo y 2 de raíces para evaluar grosor de las raíces, colonización radicular, micelio externo, microflora total y nematología.

En las siguientes tablas se recogen los valores totales de la colonización micorrízica, micelio extramático y nematología correspondientes a los datos tomados en las nueve extracciones realizadas a lo largo de todo el ciclo de cultivo.

5

Colonización micorrízica

Tabla 9. Colonización micorrízica en tratamiento curativo

Días	Control (%)	<i>Glomus iranicum</i> var. <i>tenuihypharum</i> var. nov. (%)	Composición de la invención (%)	Vydate (%)
0d	11	4	2	10
30d	15	19	10	2
60d	18	38	40	5
90d	16	56	57	4
120d	9	63	59	8
150d	15	65	63	9
180d	33	67	71	18
210d	20	69	82	18
240d	18	74	89	22

Tabla 10. Colonización micorrízica en tratamiento preventivo

Días	Control (%)	<i>Glomus iranicum</i> var. <i>tenuihypharum</i> var. nov. (%)	Composición de la invención (%)	Vydate (%)
0d	13	2	5	12
30d	4	32	27	2
60d	10	36	39	8
90d	2	25	70	12
120d	22	66	70	22
150d	28	75	82	24

Días	Control (%)	<i>Glomus iranicum</i> var. <i>tenuihypharum</i> var. nov. (%)	Composición de la invención (%)	Vydate (%)
180d	22	78	82,3	16
210 d	28	85	87	22
240 d	24	71	89	24

Se tomaron muestras de raicillas, que fueron lavadas con agua desionizada y clarificadas con una solución al 10% de KOH durante 10 minutos a 90°C. Posteriormente se pasaron por HCl 2N, durante 10 minutos y finalmente fueron teñidas con una solución de 0.05 lacto glicerina - Azul de tripano.

- 5 Tal y como muestran los datos el tratamiento con la composición de la invención ha sido el que ha obtenido una mayor colonización de micorrizas llegando a alcanzar tanto en la parte curativa del ensayo como en la preventiva el 89%. Los valores de micorrización alcanzados en el tratamiento con *Glomus iranicum* var. *tenuihypharum* var. nov. fueron inferiores en presencia de iones metálicos y quitina. Tanto en condiciones curativas como preventivas se vio afectada la colonización de los HMA nativos, haciéndose mucho más negativo en presencia de Vydate, que indiscutiblemente afectó a la micorrización nativa.
- 10

Micelio extramático

Tabla 11. Micelio extramático en tratamiento curativo

Días	Control (mg.kg suelo)	<i>Glomus iranicum</i> var. <i>tenuihypharum</i> var. nov. (mg.kg suelo)	Composición de la invención (mg.kg suelo)	Vydate (mg.kg suelo)
30 d	223,5	260,1	248,3	173,8
60 d	173,8	360,1	260,8	223,5
90 d	273,2	434,6	422,2	161,4
120 d	223,5	571,2	471,8	173,8
150 d	347,7	347,7	682,9	173,8
180 d	347,7	533,9	720,7	186,3
210 d	173,8	260,8	397,3	235,0
240 d	484,3	645,7	608,4	183,6

Tabla 12. Micelio extramático en tratamiento preventivo

Días	Control (mg.kg suelo)	<i>Glomus iranicum</i> var. <i>tenuihypharum</i> var. nov. (mg.kg suelo)	Composición de la invención (mg.kg suelo)	Vydate (mg.kg suelo)
30 d	223,5	347,7	285,6	161,4
60 d	260,8	360,1	335,3	186,3
90 d	298,0	298,0	434,6	161,4
120 d	322,8	397,3	409,8	161,4
150 d	248,3	682,9	620,8	149,0
180 d	447,0	397,3	645,7	223,5
210 d	235,9	260,8	447,0	149,0
240 d	422,7	471,8	831,9	322,8

5 Posteriormente a la centrifugación y decantado de una alícuota de suelo de 50 g, se procedió a tomar todo el material recolectado en el tamiz de 40 micras, se pasó por una batidora a 900 rpm, se filtró al vacío y se tomó del material recolectado 5 réplicas cada una de 40 mg y se evaluó bajo microscopio de disección. Se contaron dos líneas imaginarias horizontalmente y verticalmente y del promedio de micelios contados, se multiplicó por el factor de corrección, 0,000745 y se extrapoló a mg de micelio por gramo de muestra.

10 La evolución del micelio extramático fue similar a la colonización micorrízica, al igual que en el porcentaje de colonización los mayores valores se reportaron para el tratamiento con la composición de la invención. Los valores de micelio fueron superiores en presencia de iones metálicos y quitina, no obstante, las plantas tratadas solamente con *Glomus iranicum* var. *tenuihypharum* var. nov., alcanzaron también un elevada concentración de este parámetro, en comparación con el control y el tratamiento con Vydate, que disminuyó aún más la expresión del micelio extramático de los hongos nativos. Al igual que el porcentaje de colonización los valores fueron muy similares para las dos condiciones de aplicación, llegándose a producir la mayor estimulación en el tratamiento curativo.

15 Conteo de nematodos en el tratamiento curativo

Tabla 13. Conteo de nematodos juveniles vivos

Días	Control (n)	<i>Glomus iranicum</i> var. <i>tenuihypharum</i> var. nov. (n)	Composición de la invención (n)	Vydate (n)
0	52,5	27	51,5	55
30	46,5	48	36,5	15,5
60	61	44	23	16,5
90	63	57,5	42	29,5

Días	Control (n)	<i>Glomus iranicum</i> var. <i>tenuihypharum</i> var. nov. (n)	Composición de la invención (n)	Vydate (n)
120	44,5	32,5	30,5	78,5
150	155,5	104,5	22,5	33
180	137	67	31	42,5
210	59	62,5	14	23
240	182	16,5	19,5	73,5

Tabla 14. Conteo de nematodos juveniles muertos

Días	Control (n)	<i>Glomus iranicum</i> var. <i>tenuihypharum</i> var. nov. (n)	Composición de la invención (n)	Vydate (n)
0	68,5	26,5	54	40
30	31,5	71,5	88,5	30,5
60	102	153	114	86,5
90	65	106	185	67,5
120	106,5	86,5	113	118
150	66	251	127	49,5
180	82	143,5	158,5	33
210	20	27	41	5,5
240	34	6	54	38,5

Tabla 15. Tasa de mortalidad

Días	Control (%m)	<i>Glomus iranicum</i> var. <i>tenuihypharum</i> var. nov. (%m)	Composición de la invención (%m)	Vydate (%m)
0	56,8%	63,0%	51,4%	42,1%

30	40,4%	59,9%	70,7%	66,5%
Días	Control (%m)	<i>Glomus iranicum</i> var. <i>tenuihypharum</i> var. nov. (%m)	Composición de la invencción (%m)	Vydate (%m)
60	62,6%	77,7%	83,2%	84,2%
90	50,8%	64,9%	81,8%	69,2%
120	70,5%	72,4%	79,8%	53,9%
150	29,8%	72,0%	84,8%	60,0%
180	39,6%	68,2%	83,7%	43,8%
210	25,3%	32,1%	73,9%	19,1%
240	16,0%	27,0%	73,4%	34,7%

5 El análisis de la evolución de la población de nematodos en suelo se realizó a partir del conteo de los juveniles (J2) y las tasas de mortalidad de sus poblaciones. Se comprobó que tanto el tratamiento de Vydate como el de la composición de la invencción, mantuvieron unos niveles de J2 muy parecidos a lo largo del ensayo, demostrando el control por parte de estos tratamientos, no así para el caso de la aplicación de *Glomus iranicum* var. *tenuihypharum* var. nov. y el control absoluto.

10 Sin embargo, se pudo constatar que la aplicación de la composición de la invencción promovió las mayores tasas de mortalidad, unido a que estas fueron constantes a partir de los 60 días hasta el final del ensayo, lo que pone de manifiesto su poder como bionemática, debido al efecto promovido de la acción conjunta por una parte del hongo micorrízico, y por otra de los iones metálicos y la quitina que estimuló la eliminación de nematodos en la zona rizosférica. El tratamiento testigo químico alcanzó las mayores tasas a los 60 días, pero su efectividad estuvo muy relacionada con los momentos puntuales de su aplicación y no de manera sostenida como con el caso anterior.

15 La cepa sola de *Glomus iranicum* var. *tenuihypharum* var. nov. tuvo unos valores de mortalidad por encima del 60 %, y después de los 6 meses, su actividad decayó de manera importante. El control absoluto tuvo las peores tasas de mortalidad en suelo.

Conteo de nematodos en el tratamiento preventivo

Tabla 16. Conteo de nematodos juveniles vivos

Días	Control (n)	<i>Glomus iranicum</i> var. <i>tenuihypharum</i> var. nov. (n)	Composición de la invencción (n)	Vydate (n)
0	70,5	130	53	53
30	91,5	43	45,5	14
60	41,5	15,5	4,5	3,5
90	143,5	58	38	49,5

ES 2 571 439 T3

Días	Control (n)	<i>Glomus iranicum</i> var. <i>tenuihypharum</i> var. nov. (n)	Composición de la invención (n)	Vydate (n)
120	52,5	33	32,5	7
150	45	168	62	41
180	162,5	173	108,5	37
210	63	63,5	14,5	30,5
240	82	71,5	14	65

Tabla 17. Conteo de nematodos juveniles muertos

Días	Control (n)	<i>Glomus iranicum</i> var. <i>tenuihypharum</i> var. nov. (n)	Composición de la invención (n)	Vydate (n)
0	119	221,5	99,5	116
30	21,5	56	99,5	30
60	184,5	103	45	29,5
90	95	130	212	105
120	109	146	125,5	47,5
150	108	201,5	177,5	140
180	107	197	179,5	50
210	17	24	44	43,5
240	17	18,5	63,5	54

Tabla 18. Tasa de mortalidad (%)

Días	Control (n)	<i>Glomus iranicum</i> var. <i>tenuihypharum</i> var. nov. (n)	Composición de la invención (n)	Vydate (n)
0	41,0%	49,7%	46,6%	53,1%

30	19,1%	56,7%	68,6%	67,8%
60	81,6%	86,6%	90,9%	89,7%
Días	Control (n)	<i>Glomus iranicum</i> var. <i>tenuihypharum</i> var. nov. (n)	Composición de la invención (n)	Vydate (n)
90	41,7%	68,9%	84,8%	70,3%
120	67,7%	83,4%	81,9%	87,0%
150	71,1%	59,7%	72,3%	77,8%
180	39,5%	53,7%	62,0%	57,3%
210	21,4%	28,6%	75,8%	58,4%
240	17,2%	20,7%	81,0%	45,3%

En el caso preventivo el tratamiento de Vydate mantuvo unos niveles más bajos J2 que el tratamiento de la composición de la invención, no obstante, en ambos casos se logró controlar la población de nematodos en comparación con el resto de los tratamientos que mantuvieron niveles muy parecidos a lo largo del ensayo.

- 5 El análisis de la tasa de mortalidad en estas condiciones sí arrojó resultados muy similares al caso curativo, resultando la aplicación de la composición de la invención la que promovió las mayores tasas de mortalidad, unido a que estas fueron también constantes a partir de los 60 días hasta el final del ensayo, El tratamiento testigo químico alcanzó las mayores tasas a los 60 y 120 días, pero disminuyeron después progresivamente. También aquí su efectividad estuvo muy relacionada con los momentos puntuales de su aplicación y no de manera sostenida.
- 10 Tanto en las condiciones curativas como en preventivas, la composición de la invención ha demostrado tener una elevada tasa de mortalidad de nematodos, que mantiene en torno al 70-80% a lo largo del ciclo de cultivo. El tratamiento Vydate, sin embargo, perdió efectividad con el paso de los días.

Actividad rizosférica en el tratamiento curativo

- 15 Se hicieron diluciones seriadas de muestras de suelo rizosférico. Posteriormente, se cuantificaron las concentraciones de bacterias y hongos rizosféricos presentes en los diferentes tratamientos a través de la determinación del número más probable de microorganismos. Para el desarrollo de bacterias se utilizó el medio agar nutritivo y para el desarrollo de los hongos, Rosa Bengala y Patata dextrosa agar

- 20 En las gráficas de la evolución microbiana de la microflora total (Bacterias y Hongos) a lo largo del ensayo en los tratamientos curativos (Figura 1) se pone de manifiesto el efecto estimulador que tiene el tratamiento de la composición de la invención sobre el control de nematodos, la propia colonización, la actividad micorrízica y también en la estimulación de los microorganismos rizosféricos. También se pudo apreciar un ligero efecto estimulante en el tratamiento con el HMA solo, lo cual indica que a pesar de la conocida estimulación hifosférica que se da en las asociaciones de micorrizas arbusculares, estas se ven potenciadas más aun en presencia de los iones metálicos y quitina.

Actividad rizosférica en el tratamiento preventivo

Los resultados se muestran en la Figura 2. En los tratamientos bajo las condiciones preventivas se obtuvo el mismo efecto encontrado en las condiciones curativas.

- 30 Es bueno destacar la baja actividad microbiana encontrada en el tratamiento control y en el Vydate. Esta baja actividad se debe a severas afectaciones en las plantas controles por el ataque de nematodo y a un efecto desinfectante del Vydate que provocó una disminución muy importante de las poblaciones microbianas.

Producción y calidad

Se cosechó cada tratamiento, en condiciones curativas y preventivas y se contaron y pesaron los frutos. Se descartaron los frutos que presentaron algún defecto o enfermedad.

5 Únicamente se toman como destrío los frutos que presentaron algún defecto o enfermedad, los cuales son descartados. No se descartaron los frutos de pequeño tamaño. Una vez iniciada la recolección se cosechó aproximadamente una vez por semana hasta el final del cultivo.

Los datos totales de cada una de las variedades en el tratamiento preventivo y curativo se muestran a continuación:

Tabla 19. Tomate Daniela (tratamiento curativo)

	Peso (g)	Número de frutos	Peso medio	Número de plantas	Frutos/planta	Peso (g/planta)
Control	27113,7	315	101,7	6	52,5	4519,0
<i>Glomus iranicum</i> var. <i>tenuihypharum</i> var. nov.	45453,4	388	115,2	5	77,6	9090,7
Composición de la invención	49444,2	390	124,1	4	97,5	12361,1
Vydate	46672,3	385	130,5	7	55,0	6667,5

10

Tabla 20. Tomate Daniela (tratamiento preventivo)

	Peso (g)	Número de frutos	Peso medio	Número de plantas	Frutos/planta	Peso (g/planta)
Control	40625,8	380	118,5	6	63,3	6771,0
<i>Glomus iranicum</i> var. <i>tenuihypharum</i> var. nov.	55495	375	147,8	6	62,5	9249,2
Composición de la invención	64839,1	414	149,0	5	82,8	12967,8
Vydate	57619,9	452	134,4	6	75,3	9603,3

Tabla 21. Tomate Raf (tratamiento curativo)

	Peso (g)	Número de frutos	Peso medio	Número de plantas	Frutos/planta	Peso (g/planta)
Control	23161,1	229	105,8	7	32,7	3308,7

	Peso (g)	Número de frutos	Peso medio	Número de plantas	Frutos/planta	Peso (g/planta)
<i>Glomus iranicum</i> var. <i>tenuihypharum</i> var. nov.	28997,4	241	115,6	6	40,2	4832,9
Composición de la invención	22626,6	235	96,7	5	47,0	4925,3
Vydate	23876	244	105,6	6	40,7	3979,3

Tabla 22. Tomate Raf (tratamiento preventivo)

	Peso (g)	Número de frutos	Peso medio	Número de plantas	Frutos/planta	Peso (g/planta)
Control	27512,8	275	94,5	6	45,8	4585,5
<i>Glomus iranicum</i> var. <i>tenuihypharum</i> var. nov.	28334,3	234	127,5	6	39,0	4722,4
Composición de la invención	29132,4	243	114,2	6	40,5	4855,4
Vydate	24129,1	253	97,9	7	36,1	3447,0

- 5 Se tomaron datos de grados Brix y dureza del fruto en recolecciones alternas, cinco ocasiones en total a lo largo de todo el periodo de producción con el fin de evaluar si la calidad del fruto resulta se vio afectada de alguna manera.

Los datos medios totales de cada una de las variedades en el tratamiento preventivo y curativo se muestran a continuación:

Tabla 23. Tomate Raf (dureza)

Dureza RAF	T1	T2	T3	T4
Cur	5,5	5	5	4,7
Prev	4,5	4,5	5,5	5,1

10

Tabla 24. Tomate Raf (°Brix)

°Brix RAF	T1	T2	T3	T4
-----------	----	----	----	----

ES 2 571 439 T3

Cur	7,7	7,7	8,1	7,8
°Brix RAF	T1	T2	T3	T4
Prev	7,4	7,4	8,1	7,5

Tabla 25. Tomate Daniela (dureza)

Dureza Daniela	T1	T2	T3	T4
Cur	4,8	5,6	5	5,6
Prev	4,8	5,3	5,1	4,9

Tabla 26. Tomate Daniela (° Brix)

°Brix Daniela	T1	T2	T3	T5
Cur	6,2	6,1	6,4	6
Prev	6,1	5,8	6,1	5,9

5

No se apreció ningún cambio drástico en los grados Brix provocados por la población de nematodos ni por las aplicaciones de los productos. Los valores fueron normales para las dos variedades alcanzando los máximos grados Brix a mitad de ciclo (8,1 °Brix medidos en la variedad Raf y 6,4 °Brix en la variedad Daniela, ambos datos pertenecen al tratamiento T3).

10 La dureza del fruto tampoco se vio afectada de manera significativa ya que los valores del penetrómetro son los normales para cada variedad. En Raf los valores están entre 4,5 y 5,5 para todos los tratamientos y en Daniela de 4,8 a 5,6. Por lo tanto los frutos presentaron una consistencia normal tanto en presencia de la plaga como tras la aplicación de los productos ensayados.

Lista de secuencias

15 <110> SYMBORG, S. L.

<120> Cepa de *Glomus iranicum* var. *tenuihypharum* var. nov. y su uso como bionematicida

<160> 1

<170> BiSSAP 1.2

<210> 1

20 <211> 813

<212> ADN

<213> *Glomus iranicum* var. *tenuihypharum* var. nov.

<220>

<221> fuente

25 <222> 1..813

ES 2 571 439 T3

<223> /mol_tipo="ADN no asignado" /nota= "18S (secuencia parcial)-ITS1 (secuencia completa)-5,8S (secuencia parcial)" /organismo= "*Glomus iranicum* var. *tenuihypharum* var. nov."

<400> 1

cctg	cg	gctt	attg	actca	acac	gg	gaa	actc	accagg	tccag	acata	gta	aggattg	60
acag	attgag	agct	ctttct	tgatt	ctatg	ggtg	gtggtg	catg	gccggt	cttag	ttggt	120		
ggag	tgattt	gtct	ggttaa	ttcc	gttaac	gaac	gagacc	ttaac	ctgct	aaat	agctag	180		
gctt	aacttc	ggtt	aggctg	tcag	cttctt	agag	gggacta	tcgg	tgttta	accg	atggaa	240		
gttt	gaggca	ataa	caggct	tgtg	atgcc	ttag	atgctc	tggg	ccgcac	gcgc	gctaca	300		
ctg	atgaagt	catc	gagttc	attc	ccttta	tcgg	aagata	tggg	taatct	ttt	gaaactt	360		
cat	cgtgctg	ggg	atagagc	ttt	gcaatta	ttg	ctctta	acg	aggaatc	cct	agtaagc	420		
aca	agtc	atc	agct	tgtgct	gatt	acgtcc	ctgc	cctttg	taca	caccgc	ccgt	cgtac	480	
tacc	gattga	atgg	cttagt	gagg	ccctcg	gatc	gacgct	cgg	agactgg	caac	agtttc	540		
cg	tcg	ttga	gaag	ttggtc	aaact	tggct	attt	agagga	agta	aaaagtc	gta	acaaggt	600	
ttcc	gtaggt	gaac	ctgcg	aagg	atcatt	attg	atntag	cga	accgagc	gtag	cggagg	660		
ttct	gcg	atc	gctt	atattt	aaa	acc	act	ctta	acgtat	aaa	attttta	720		
aaaa	aatag	atc	actctat	aaa	atcggaa	aacc	cgctta	aaat	ttttta	tgt	ctttcga	780		
atag	ataaaa	aaaa	atatca	cttt	ca	caaa	cg	813						

REIVINDICACIONES

1. Cepa de *Glomus iranicum var. tenuihypharum* var. nov. depositada con número de depósito BCCM 54871, caracterizada por que comprende la secuencia identificada por SEQ ID NO: 1.
- 5 2. Composición caracterizada por que comprende una cepa de *Glomus iranicum var. tenuihypharum* var. nov. depositada con número de depósito BCCM 54871 que comprende la secuencia identificada por SEQ ID NO: 1, arcillas esmécticas 2:1, iones metálicos y quitina.
3. Composición según la reivindicación 2, caracterizada por que dichas arcillas esmécticas 2: 1 son dioctaédricas o trioctaédricas.
- 10 4. Composición según la reivindicación 2, caracterizada por que dichas arcillas esmécticas 2:1 están seleccionadas del grupo compuesto por sepiolita, atapulgita, nontronita y saponita.
5. Composición según una de las reivindicaciones 2 ó 3, caracterizada por que la concentración de dicha cepa *Glomus iranicum var. tenuihypharum* var. nov. es entre 0.05 y 4% en peso.
6. Composición según la reivindicación 5, caracterizada por que dicha concentración es entre 0.1 y 3 % en peso.
- 15 7. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6, caracterizada por que la concentración de quitina es entre 2 y 10 % en peso.
8. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7, caracterizada por que dichos iones metálicos están seleccionados del grupo compuesto por Fe, Ca y Mg.
9. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 8, caracterizada por que comprende Fe, Ca y Mg.
- 20 10. Composición según una de las reivindicaciones 8 ó 9, caracterizada por que la concentración de Fe es entre 3 y 12 % en peso, la concentración de Ca es entre 0.5 a 5 % en peso y la concentración de Mg es entre 0.2 a 2 % en peso.
11. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 10, caracterizada por que la forma de presentación de dicha composición es polvo, concentrado emulsionable o granulado.
- 25 12. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 11, caracterizado por que dicha composición es un líquido, un sólido o un gel.
13. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 12, caracterizada por que comprende al menos un fungicida, al menos un biofungicida, al menos un insecticida, al menos un bioinsecticida, al menos un nematocida y/o al menos un bionematicida.
- 30 14. Composición según la reivindicación 13, caracterizada por que dicho fungicida está seleccionado del grupo compuesto por Maneb, Mancozeb, Metalaxyl-Ridomil, Myclobutanil, Olpisan, Propamocarb, Quintozene, Streptomycin, Sulfur, Thiophanate-methyl, Thiram, triforine, Vinclozolin, Zinc white, Zineb, Ziram, Banrot, Fixed copper, Chlorothalonil, Chlorothalonil, Captan, Chloroneb, Cyproconazole, Zinc ethelene, bisdithiocarbamate, Etridiazole, Fenaminosulf, Fenarimol, Flutolanil, Folpet, Fosetyl-AL y Iprodione.
- 35 15. Composición según una de las reivindicaciones 13 ó 14, caracterizada por que dicho biofungicida está seleccionado del grupo compuesto por *Trichoderma* sp, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Streptomyces* sp, *Coniothyrium minitans* y *Pythium oligandrum*.
16. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15, caracterizado por que dicho insecticida está seleccionado del grupo compuesto por organofosfato, carbamato y neonicotinoide.
- 40 17. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 16, caracterizado por que dicho bioinsecticida está seleccionado del grupo compuesto por *Bacillus* sp., *Chromobacterium* sp., *Beauveria* sp. y *Metarhizium* sp.
18. Composición según cualquier de las reivindicaciones 13 a 17, caracterizado por que dicho nematocida es organofosfato o carbamato.

19. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 18, caracterizado por que dicho bionemático es *Pasteuria* sp.
20. Procedimiento de obtención de una composición según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 19, caracterizado por que comprende:
- 5 (a) inocular por recubrimiento una semilla de una planta huésped con la cepa *Glomus iranicum* var. *tenuihypharum* var. nov. depositada con número de depósito BCCM 54871,
- (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,
- 10 (d) eliminar la parte aérea de la planta y extraer el sustrato y
- (e) moltrar dicho sustrato por debajo de 80 micras a una temperatura entre 25 y 30°C para obtener dicha composición.
21. Uso de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 19 como bionemático.
- 15 22. Uso según la reivindicación 21, caracterizado por que dicha composición se aplica a la planta por tratamiento de las semillas, tratamiento de las raíces, embebido de raíces en una emulsión, adición al agua de riego, irrigación, aplicación de polvo al sistema radicular o aplicación de emulsión inyectada al sistema de raíces.

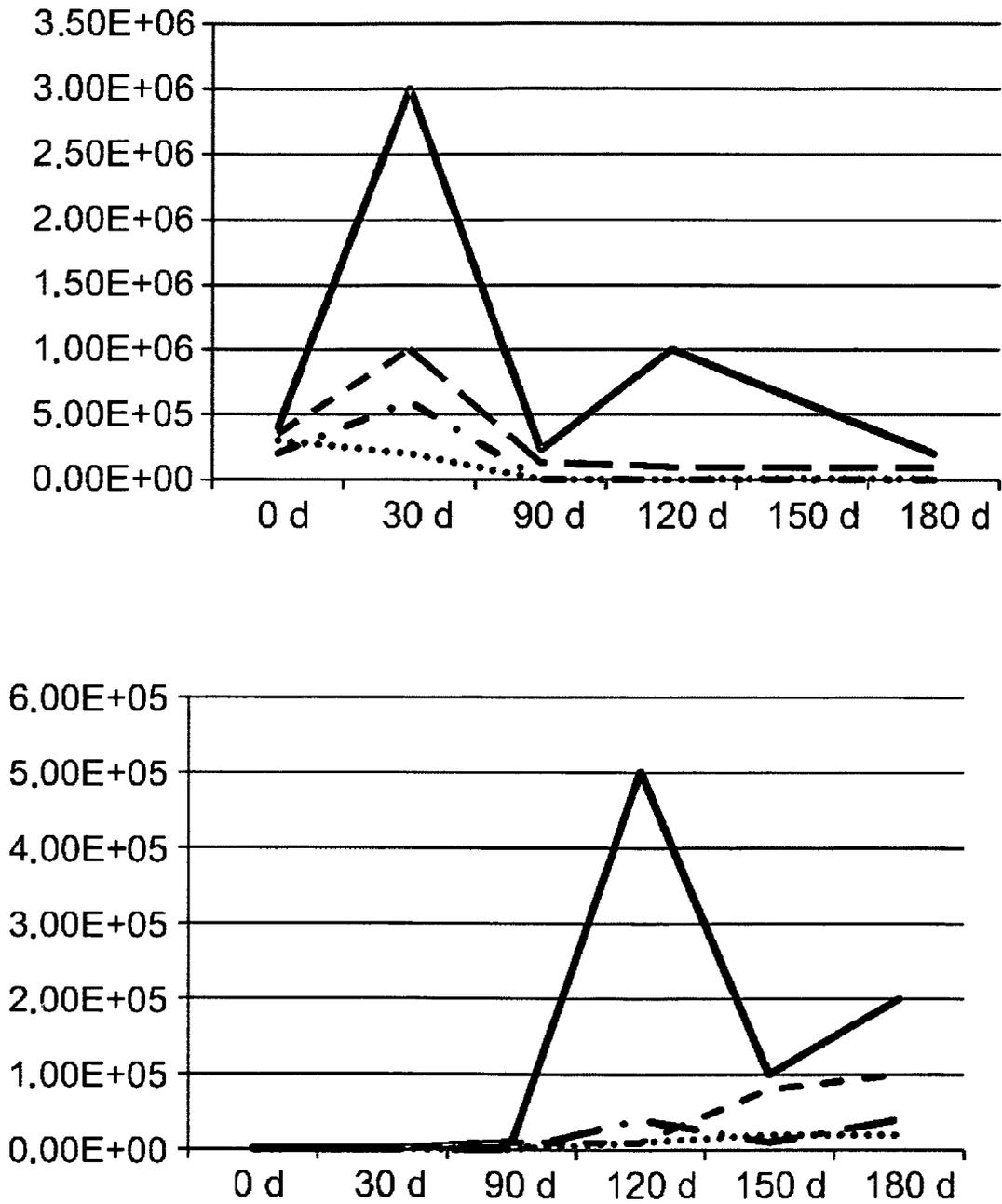


Fig. 1

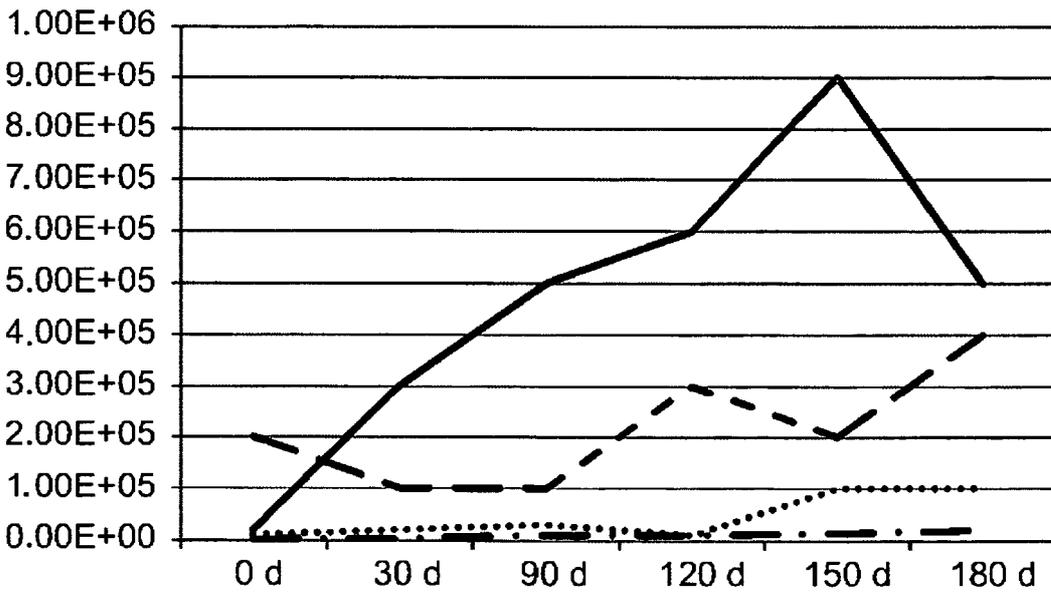
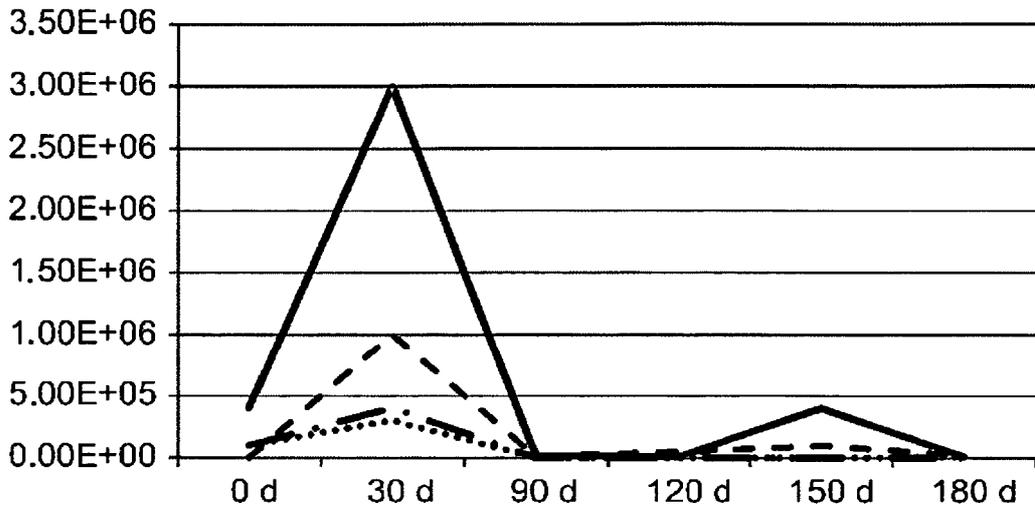


Fig. 2