

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 594 455**

51 Int. Cl.:

**A01N 63/04** (2006.01)

**C12N 1/14** (2006.01)

**A01H 17/00** (2006.01)

**C12R 1/645** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.07.2013** **E 13174708 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.09.2015** **EP 2820953**

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

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**20.12.2016**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**JUAREZ, JESÚS y**  
**FERNANDEZ, FÉLIX**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

ES 2 594 455 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 bioestimulante

### Campo de la invención

5 La invención se refiere al campo agronómico. Específicamente, la presente invención se refiere a una composición que comprende una cepa de *Glomus iranicum* var. *tenuihypharum* var. nov. y otros componentes, que se usa como bioestimulante.

### Antecedentes de la invención

10 Las composiciones de micorriza preparadas hasta ahora tienen un límite natural de propágulos de micorriza. Dicho límite se debe principalmente a la cepa usada y el método para obtener las composiciones de micorriza. No todas las especies de hongos de micorriza encontrados en la bibliografía tienen una actividad de micorriza constante y positiva en cultivos.

15 Los hongos que forman micorrizas descritos en el estado de la técnica no proporcionan un impacto constantemente positivo sobre el rendimiento de cultivos debido a una ausencia de eficacia en la colonización de micorrizas en todas las condiciones de suelo y niveles de fertilidad. El documento ES 2 364 684 A1 describe el cultivo de hongos de micorriza *Glomus* spp. y su uso en combinación con fertilizantes para potenciar los rendimientos en diversos cultivos. *Glomus iranicum* no está entre las especies enumeradas.

20 El alto nivel de colonización de micorrizas y el crecimiento del micelio demostrado por la cepa descrita en la presente solicitud en una amplia gama de condiciones salinas del suelo permitirá un uso más extendido de esa tecnología en agricultura intensiva, produciendo una eficacia mejorada en el uso del agua, la captación de nutrientes, el rendimiento global del cultivo y el crecimiento. Además, esta cepa ha demostrado efectos beneficiosos en combinación con altos niveles de fertilización.

### Descripción de la invención

25 Una realización de la invención es una cepa de *Glomus iranicum* var. *tenuihypharum* var. nov depositada en el número de depósito de BCCM 54871, que comprende la secuencia identificada por la SEQ ID NO: 1, a partir de ahora en este documento cepa de la invención.

30 La cepa de *Glomus iranicum* var. *tenuihypharum* var. nov de la invención, aislada de un suelo sódico salino Solonetz Gley en la ciudad de Fortuna, Murcia (España), se depositó el 19/04/2013 en la autoridad depositaria internacional Belgian Coordinated Collections of Micro-Organisms (BCCM) con dirección en Université Catholique de Louvain, Mycothèque de l'Université catholique de Louvain (MUCL), Croix du Sud 2, Box L7.05.06, 1348 Louvain-la-Neuve, de Symborg, S.L., con dirección en, Ceeim Building, University Campus, S/N, 30100 Murcia, España.

La cepa de *Glomus iranicum* var. *tenuihypharum* var. nov se ha identificado por el depositario por la referencia SYMBORG-001, y recibió el número de depósito 54871 por la autoridad depositaria internacional.

35 Los esporocarpos de la cepa de *Glomus iranicum* var. *tenuihypharum* var. nov de la invención son desconocidos. Dichas esporas de la cepa aparecen individualmente o en grupos sueltos en el suelo y también pueden formarse esporádicamente en las raíces. Las esporas son hialinas a ocre claro, con forma subglobosa a globular (raramente irregular), relativamente pequeñas (24,0)  $30,7 \pm 3,7$  (42) micrómetros de diámetro, compuestas por dos capas de pared (1-4 m de grosor), una capa compacta laminada interior (0,5-1,5 m), y una capa semipermanente exterior, rugosa en esporas jóvenes y aspecto algo áspero en esporas adultas y más grandes de 0,5 a 2,0 m de grosor. Las paredes de la espora interior de esporas jóvenes tienen una tinción marrón rojiza con reactivo de Melzer, pero el color desaparece en tinción de esporas maduras, los contenidos de las esporas tienen un aspecto pálido. Las hifas que albergan las esporas tienen un color hialino a ocre pálido, son rectas u onduladas de 2,5 a 4,5 micrómetros de diámetro (promedio de 3,0 micrómetros), cilíndricas y con una ligera forma de embudo que se fusiona con las capas de poro abierto de la pared de la espora, al menos en esporas maduras. Estructura de germinación: tubo germinal que crece y se desarrolla de vuelta a través de la unión de las hifas con la espora. Forma micorrizas arbusculares vesiculares.

40

45

El micelio forma una red extensiva. El micelio extramatricial es hialino amarillo pálido, profuso y las esporas aparecen siempre en la matriz del suelo, formando abundantes esporocarpos en grupo (2 a 8 esporas individuales). La característica única de esta especie es la gran cantidad de red de micelio externo y la incapacidad de crecer en asociación *in vitro* de raíces transformadas.

50 La cepa se aisló de un suelo salino de tipo Solonetz Gley. La característica principal de estos suelos es que son muy

hidromórficos, muy compactos y con un montón de depósitos salinos sobre la superficie.

La cepa se aisló de un suelo localizado en la ciudad de Fortuna, Murcia (España).

La siguiente tabla muestra algunas propiedades químicas del suelo original donde se aisló la cepa de *Glomus iranicum* var. *tenuihypharum* var. nov.

5

Tabla 1. Propiedades de suelo

Parámetros	Valores
pH (H <sub>2</sub> O)	8,5
CaCO <sub>3</sub> (%)	12
C/N	6,5
Ca <sup>++</sup> (ppm)	5809,6
Mg <sup>++</sup> (ppm)	2.967,04
K <sup>+</sup> (ppm)	2955
Na <sup>+</sup> (ppm)	1829,4

De acuerdo con una filogenia basada en 813 pares de bases de los genes de ARN ribosómico 18S (secuencia parcial), ITS1 (espaciador transcrito interno 1, secuencia completa) y el gen del ARN ribosómico 5,8S (secuencia parcial), se clasificó la cepa de la invención en un clado que consiste en *Rhizophagus* (antes grupo *Glomus* Ab, representado por *Rhizophagus irregularis*, *Glomus intraradices* y *Rhizophagus bistratum*).

10

De acuerdo con esta filogenia, *Glomus indicum* y *Glomus achrum* son los parientes más cercanos. Pueden encontrarse aproximadamente cincuenta secuencias de clones de *Glomus* spp. no cultivados con una alta identidad (99 %) con la secuencia de la cepa de la invención en el servidor del NCBI (banco de germoplasma).

15

Parece, por lo tanto, que el nuevo taxón tiene una distribución cosmopolita y un amplio rango de hospedador. Se han originado secuencias muy similares en Japón (Ogura-Tsujita Y. *et al.* 2013. Arbuscular mycorrhiza formation in cordate gametophytes of two ferns, *Angiopteris lygodiiifolia* and *Osmunda japonica*. *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 (EE.UU.). *Microbial Ecology* 56 (4): 649-659).

20

El carácter morfológico más notable de la cepa de la invención es el pequeño tamaño de las esporas y la coloración hialina a ocre muy claro y que aparecen individualmente o en grupos pequeños en el suelo.

25

La única cepa de *Glomus* spp. 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 las de la cepa de la invención. Existe una clara diferencia en la cepa de la invención y es que el tamaño de sus hifas unidas a la espóra es muy fino.

30

La pared exterior L1 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 de forma constante, con fuerte actividad dextrinoide, sin embargo, en el caso de la cepa de la invención, solamente se observa en esporas muy jóvenes, por tanto, se concluye que es una variedad de *Glomus iranicum* y proponemos la nueva variedad *tenuihypharum*.

Es una cepa que se adapta a y tolera perfectamente entornos salinos y soluciones fertilizantes con altas conductividades eléctricas.

35

La especie produce abundante micelio extramatricial, que asegura un apropiado funcionamiento simbiótico.

La especie alcanza altas concentraciones de colonización interna en cortos períodos de tiempo, especialmente en cultivos en agricultura intensiva, lo que indica una alta eficacia de rendimiento en estas condiciones.

40

Debido al pequeño tamaño de sus esporas y el abundante micelio extramatricial, así como la capacidad de recuperación de las mismas debido a daño físico, la cepa puede manipularse y molerse hasta por debajo de 80 micrómetros, permaneciendo totalmente viable en un sustrato de arcilla durante más de dos años y una eficacia demostrada en un intervalo de  $1,2 \times 10^4$  a  $1 \times 10^8$  propágulos infecciosos por 100 ml<sup>-1</sup> de suelo.

La aplicación de esta especie promueve una respuesta eficaz en la productividad de cultivos en agricultura intensiva, y mantiene altos niveles de actividad fisiológica a expensas de un bajo coste energético, dado por las bajas tasas de transpiración que promueven un uso elevado y eficaz del agua.

5 La cepa promueve un cambio radical de la arquitectura de las raíces, promoviendo un sistema diferente de raíces, horizontal y con mayor dicotomía inducida por la rápida colonización interna y externa de micorrizas, y la necesidad de mayor cantidad de células en la raíz hospedadora, que también promueve un mayor desarrollo de las raíces a corto y largo plazo.

10 Otro aspecto importante a evaluarse es la actividad microbiana generada por ese organismo en el sistema de rizosfera. Esta cepa produce una estimulación constante de la microbiota rizosférica en las plantas tratadas. Este hecho se debe a la propia exudación de elementos nutritivos a través de las radículas, micorrizas e hifas que estimulan tanto la actividad de la micorrizosfera como de la rizosfera en las cercanías del micelio externo de la cepa de *Glomus iranicum* var. *tenuihypharum* var. nov., que produce una mayor concentración microbiana en cada uno de los momentos ensayados.

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

15 Una realización de la invención es una composición, a partir de ahora en este documento, composición de la invención, que comprende una cepa de *Glomus iranicum* var. *tenuihypharum* var. nov. depositada en el número de depósito de BCCM 54871 que comprende la secuencia identificada por la SEQ ID NO: 1 y arcillas esmectíticas 2:1. En particular, dichas arcillas esmectíticas 2:1 son dioctaédricas o trioctaédricas. También en particular dichas arcillas esmectíticas 2:1 se seleccionan del grupo que consiste en sepiolita, atapulgita, nontronita y saponita.

20 La presente invención utiliza arcilla del tipo esmectita, sepiolita y atapulgita dioctaédrica o trioctaédrica, todas con alta plasticidad cuando se humedecen y que consisten en un material granular muy fino, que consiste en partículas muy pequeñas cuyo tamaño es de menos de 4 micrómetros, y su propiedad principal es la expansión en sistemas con baja disponibilidad de agua ya que puede ser un sustrato para la reproducción de hongos de micorrizas. Por otro lado, es muy importante la formación de coloides y la desintegración en presencia de agua abundante cuando se aplica en sistemas localizados de irrigación. Estos tipos de arcillas tras completarse una de las fases de producción del inoculante, proporcionan los propágulos de micorrizas con: esporas, micelio extramatricial y radículas colonizadas; situaciones estresantes que promueven la posterior aceleración de los procesos de germinación una vez inoculadas en condiciones de cultivo intensivo y ecológico.

30 En el Ejemplo 1 de la invención, se descubrió que los efectos promovidos por la cepa *Glomus iranicum* var. *tenuihypharum* var. nov., en todas las variables estudiadas, eran mayores que los encontrados en las especies *Glomus mosseae* y *Glomus intraradices*.

35 Debido a su expresión de micorrizas, es bueno para poner de relieve la producción rica y significativa de micelio extramatricial y de Glomalina fácilmente extraíble que aparece en presencia de la especie *Glomus iranicum* var. *tenuihypharum* var. nov. independientemente de la fertilización usada, indicativo de la adaptación de este microorganismo a diversos entornos salinos.

Las plantas tratadas con *Glomus iranicum* var. *tenuihypharum* var. nov. muestran producción aumentada de biomasa de hojas y raíces, relacionada a su vez, con una mayor concentración de nutrientes en las hojas en presencia de las mayores dosificaciones de fertilizante, indicativo de la alta tolerancia a estas condiciones.

40 Las plantas tratadas con un 100 % de fertirrigación en presencia de las cepas de *Glomus mosseae* y *Glomus intraradices*, no produjeron diferencias significativas en comparación con plantas de control en términos de producción de biomasa fresca. Su actividad disminuyó a partir del aumento en las dosis de fertilizantes.

La aplicación de *Glomus iranicum* var. *tenuihypharum* var. nov. produce alta actividad fotosintética a expensas de tasas inferiores de transpiración, que conduce a que las plantas tratadas hagan un uso más eficaz del agua en todo el cultivo, tanto a dosis del 50 % como del 100 % del fertilizante aplicado.

45 La cepa de *Glomus iranicum* var. *tenuihypharum* var. nov. tiene alta actividad respecto al resto de inoculantes usados en el Ejemplo 1, posiblemente derivada de la naturaleza de la propia especie, es muy simbiótica, superproductora de micelio extramatricial, Glomalina y una fuerte colonización interior que, a su vez, produce una actividad fisiológica adecuada con baja conductancia estomática, que conduce a un uso eficaz del agua con alta productividad, incluso con dosis mayores de fertilizante.

50 Otra realización es la composición de la invención, donde la concentración de dicha cepa de *Glomus iranicum* var. *tenuihypharum* var. nov. es entre el 0,05 y el 4 % en peso. En particular, dicha concentración es entre el 0,1 y el 3 % en peso.

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

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

5 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 bioestimulante.

10 En particular, dicho fungicida se selecciona del grupo que consiste en Maneb, Mancozeb, Metalaxil-Ridomil, Miclobutanil, Olpisan, Propamocarb, Quintozeno, Estreptomocina, Azufre, Thiofanato-metilo, Thiram, triforina, vinclozolina, blanco de zinc, Zineb, Ziram, Banrot, cobre fijado, Clorotalonil, Clorotalonil, Captan, Cloroneb, Ciproconazol, eteleno de zinc, bisditiocarbamato, Etridiazol, Fenaminosulf, Fenarimol, Flutolanil, Folpet, Fosetil-AL e Iprodiona.

En particular, dicho biofungicida se selecciona del grupo que consiste en *Trichoderma* sp, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Streptomyces* sp, *Coniothyrium minitans* y *Pythium oligandrum*.

En particular, dicho insecticida se selecciona del grupo que consiste en organofosfato, carbamato y neonicotinoide.

15 En particular, dicho bioinsecticida se selecciona del grupo que consiste en *Bacillus* sp., *Chromobacterium* sp., *Beauveria* sp. y *Metarhizium* sp.

En particular, dicho nematocida es organofosfato o carbamato.

En particular, dicho bionematocida es *Pasteuria* sp.

Otra realización es un método para obtener la composición de la invención, que comprende:

- 20 (a) inoculación por recubrimiento de una semilla de una planta hospedadora con *Glomus iranicum* var. *tenuihypharum* var. nov. depositada en el número de depósito de BCCM 54871,  
 (b) cultivo de dicha planta en ciclos de riego entre 7 a 10 días en un sustrato de reproducción que comprende arcillas esmectíticas en un porcentaje por encima del 52 % del peso total de dicho sustrato,  
 (c) interrupción de dicho riego durante un período igual a o mayor de 20 días,  
 25 (d) retirada de la parte aérea de la planta y retirada del sustrato y  
 (e) molienda de dicho sustrato por debajo de 80 micrómetros a una temperatura entre 25 y 30 °C para obtener dicha composición.

Otra realización es el uso de la composición de la invención como bioestimulante.

30 La cepa de la invención ejerce la función de traslocación de nutrientes, tomando estos nutrientes del suelo o sustrato y usando dichos nutrientes en su sistema metabólico, trasloca dichos nutrientes desde su red de micelio y posteriormente los intercambia en las células de la raíz. Este fenómeno puede describirse por el término bioestimulación y que es por lo que una de las realizaciones de la invención es el uso de la composición de micorrizas de la invención como estimulante.

35 En la presente memoria descriptiva debe entenderse que el término "fertilizante" está dentro del alcance del término más amplio "bioestimulante".

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, raíces embebidas en una emulsión, adición al agua de irrigación, irrigación, aplicación de polvo al sistema de raíces o aplicación de emulsión inyectada en el sistema de raíces.

### Realizaciones preferidas

#### 40 Ejemplo 1

Identificación genética de la cepa de la invención

#### Extracción de ADN

Se transfirieron hifas y esporas aisladas a tubos Eppendorf de 1,5 ml con 0,2 g de perlas de vidrio (diámetro de 2 mm) y 100 µl de tampón CTAB (CTAB al 2 % = Bromuro de cetil trimetil amonio, NaCl 1,4 M, Tris-HCl 0,1 M pH 7,5,

Na-EDTA 0,2 M).

5 Esta mezcla se homogeneizó usando un molino de bolas de tipo Retsch MM301 a velocidad máxima 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-alcohol isoamílico (24:1) y se mezcla invirtiendo los tubos de reacción y después se centrifugó durante 5 minutos a 10.000 x g, y se recuperó la capa superior en un tubo Eppendorf limpio. Esta etapa se repitió dos veces. Se añadieron 200 µl de acetato de amonio 5 M a esta suspensión, la mezcla se incubó a 4 °C durante 30 minutos, seguido por 20 minutos de centrifugación a 4 °C y 13.000 r.p.m. El ADN se precipitó con 700 µl de isopropanol a -20 °C durante una noche. El sedimento de ADN obtenido se precipitó con isopropanol y se lavó con etanol enfriado en hielo al 70 %, se secó al aire y se volvió a disolver en 50 µl de tampón Tris etilendiamina (Tris 10 mM, EDTA 10 mM, pH 8) + 4,5 U de RNase/ml.

### Condiciones de PCR

15 Los cebadores usados para la amplificación por PCR y para la secuenciación de la región espaciadora transcrita interna del gen de ADNr 18S fueron Glom1310 e ITS4i (Redecker, 2000). Las amplificaciones se realizaron en mezcla de dNTP 0,2 mM, 1 mM de cada cebador, un 10 % de tampón de reacción de PCR y agua estéril bidestilada. Se añadió ADN polimerasa GoTaq® (Promega, Mannheim, Alemania) a 3,75 u/100 µl de mezcla de reacción; se usaron 2 µl de molde de ADN genómico en cada 20 µl/reacción. Las amplificaciones se realizaron en un termociclador avanzado Primus 96 -(peqLab Biotechnology) en 200 tubos de reacción mu 1 (94 °C, 120 s de desnaturalización inicial, seguida 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).

### 20 Análisis de datos

La alineación se realizó inicialmente usando el programa informático BioEdit 7.0. El análisis filogenético por probabilidad máxima (ML) se realizó con el programa PHYML. Se usó el modelo de sustitución de nucleótidos GTR con estimaciones ML de las frecuencias de bases. La proporción de sitios invariables se estimó y optimizó. Se desarrollaron cuatro categorías de la tasa de sustitución y también se estimó el parámetro de distribución gamma y se optimizó. Se usó análisis de inicialización con 100 réplicas para ensayar el respaldo estadístico de las ramificaciones.

### Secuenciación

30 Se retiró el exceso de cebadores y dNTP por cromatografía en columna (Microspin S-300 HR, Amersham Biosciences). Para la secuenciación parcial de la región 18SITS1-5,8S se usaron los cebadores Glom1310 e ITS4i en una concentración de 1,6 mM. La secuenciación se realizó con el kit de secuenciación PRISM BigDye™ Terminator Cycle de ABI (Applied Biosystems) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Los parámetros para la secuenciación fueron un retardo de 18 segundos a 96 °C, seguido por 25 ciclos con 18 s a 96 °C, 5 segundos a 50 °C y 4 min a 60 °C. El análisis de secuencia se realizó usando un analizador automático de secuencia (ABI PRISM 3130, Applied Biosystems) junto con el software ABI Prism™ Auto Assembler (versión 140, Applied Biosystems).

Se obtuvo la secuencia del ARN ribosómico 18S (secuencia parcial), ITS1 (secuencia completa) y el gen del ARN ribosómico 5,8S (secuencia parcial) de la cepa de la invención, cuya secuencia se identifica por la SEQ ID NO: 1.

### Ejemplo 2

Eficacia de la composición de la invención sobre cultivo de lechuga.

40 La especie vegetal estudiada fue *Lactuca sativa* L tipo "Romana", una planta anual con un ciclo de crecimiento de 90 días. La siembra se realizó por trasplante en el período de enero-marzo, en macetas de 75 cm x 15 cm x 15 cm de tamaño, colocando tres plántulas por maceta. Los datos del análisis químico del suelo usado en el ensayo se muestran a continuación (Tabla 2)

Tabla 2. Características principales del suelo usado en el ensayo

Elementos	Contenidos
Materia orgánica (%)	1,3
Nitrógeno total (%)	0,2
Relación C:N	6,4
Carbonatos totales (%)	10,2
Piedra caliza activa (%)	2,6

Elementos	Contenidos
Fosfatos asimilables (ppm)	231,2
Cloruros (mequiv./100 g)	0,09
Sulfatos (mequiv./100 g)	0,3
Hierro asimilable (ppm)	25,2
Cobre asimilable (ppm)	2,3
Manganeso asimilable	32,0
Zinc asimilable (ppm)	1,2

Se usaron tres especies de hongos formadores de micorrizas en este estudio: *Glomus mosseae* (Nicholson y Gerdeman) Gerdeman y Trappe, *Glomus intraradices* (NC Schenck y GS Sm. 1982) y *Glomus iranicum* var. *tenuihypharum* var. nov.

5 El método para obtener los inoculantes consistía en la propagación de las diferentes especies de *Glomus* en el sustrato mineral de arcilla con la planta hospedadora perenne *Lolium* durante 5 meses. Al final del ciclo vital de la especie vegetal, se homogeneizaron el sistema de raíces y los propágulos de micorrizas, las esporas, el micelio y las radículas colonizadas y se aplicaron a la tasa de 2 gramos por planta.

10 La concentración final de las cepas fue: *Glomus mosseae*: 45 esporas g<sup>-1</sup> y 123 mg de micelio extramatricial g<sup>-1</sup>, *Glomus intraradices*: 166 esporas g<sup>-1</sup> y 200 mg de micelio extramatricial g<sup>-1</sup> y *Glomus iranicum* var. *tenuihypharum* var. nov., 200 esporas g<sup>-1</sup> y 430 mg de micelio extramatricial g<sup>-1</sup> (determinada por los métodos de Giovannetti et Mosse, 1980; Herrera *et al.*, 1986, respectivamente).

15 Se instaló un sistema de irrigación y cada maceta se equipó con una tasa de goteo de 2 l h<sup>-1</sup> y un dispositivo para homogeneizar el suministro de agua sobre la superficie completa del sustrato. Se estudiaron dos condiciones de fertilización en este ensayo, 100 % y 50 % del total del fertilizante.

20 La fertilización consistía en una parte de un abono básico (500 kg/ha<sup>-1</sup>), usando un fertilizante comercial, cuya composición consistía en: 7 % de N total (5 % de N de amoníaco, 2 % de N ureico); 10 % de fósforo (4 % soluble en agua); 6 % de potasio; 25 % de azufre y 2 % de magnesio, y por otra parte, durante todo el experimento, se aplicó una solución de fertirrigación de pH 7,90, conductividad eléctrica 2106 mmhos/cm<sup>-1</sup>, y sólidos solubles totales 0,93 g/l<sup>-1</sup>, KNO<sub>3</sub> (15.000 g), Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (1.000 g), H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (508 g), HNO<sub>3</sub> (452 g) dos veces a la semana. En el caso de los tratamientos con 50 % de fertilización, estos recibieron la mitad del abono básico (250 kg/ha<sup>-1</sup>) y la mitad de los nutrientes de la solución de fertirrigación a la misma frecuencia que las plantas regadas con el 100 % de la dosis. La irrigación se aplicó igualmente en todos los tratamientos (3 veces por semana).

25 Se usó un diseño experimental que consistía en 8 tratamientos, 10 macetas por tratamiento y 3 plantas por maceta. Los tratamientos estudiados fueron el tipo de cepa de hongo formador de micorriza y un control no tratado, frente a dos dosis de fertilizante, 100 % y 50 %.

Los tratamientos estudiados fueron:

- 30 T1. *Glomus mosseae* (100 % de fertilización).  
 T2. *Glomus intraradices* (100 % de fertilización).  
 T3. *Glomus iranicum* var. *tenuihypharum* var. nov. (100 % de fertilización).  
 T4. Control (100 % de fertilización).  
 T5. *Glomus mosseae* (50 % de fertilización).  
 T6. *Glomus intraradices* (50 % de fertilización).  
 35 T7. *Glomus iranicum* var. *tenuihypharum* var. nov. (50 % de fertilización).  
 T8. Control (50 % de fertilización).

40 Se ha estimado la cantidad del hongo *Glomus iranicum* var. *tenuihypharum* var. nov. presente en los tratamientos en que el hongo se inoculó. Se produjeron entre 1 y 5 gramos de micelio-esporas de esta especie en 1 k de suelo, que es un intervalo ente el 0,1 y el 0,5 %. Por otro lado, el sistema de raíces en que se produjo, alcanzó el 10 % del peso bruto (100 g). Las radículas finas, que son las asociadas con el hongo formador de micorrizas y estas fueron de 40 g por 1 kilogramo de suelo, es decir un 4 % del peso total. A partir de estas radículas finas, solamente el 75 % tenía propágulos de micorrizas, por lo tanto, el porcentaje de micorrizas en un kilogramo de suelo fue equivalente al 3 %.

45 Se estudió el desarrollo de micorrizas analizando las raíces de 5 plantas por tratamiento después de 75 días de aplicación de tratamiento. Estas raíces se lavaron con agua y se usó un método basado en tinción no vital con azul de tripano para la detección. Este método permitió comparar la cantidad de biomasa fúngica viva en el sistema de micorrizas. En todos los casos, las muestras se observaron en un microscopio Olympus (CX21).

Se midió el micelio extramatricial estimando la cantidad de mg presentes en un área dada a partir de un factor de corrección. También se detectó Glomalina fácilmente extraíble.

5 Se evaluó el peso fresco de las hojas (LFW), el peso seco de las hojas (LDW) y el peso fresco de las raíces (RFW) y el peso seco de las raíces (RDW) en 90 días desde el inicio de los tratamientos. Para este estudio se recogieron 5 plantas por tratamiento y se separaron en diferentes órganos y se pesaron en una balanza modelo Sartorius. Para el peso seco las muestras se colocaron en un horno a 80 °C para un peso constante.

10 Se midieron los parámetros de intercambio de gas (fotosíntesis neta,  $A_n$  y conductancia estomática,  $G_s$ ) en 10 plantas por tratamiento, usando el sistema de fotosíntesis portátil LICOR LI-6400 (LI-COR Inc., Lincoln, NE, EE. UU. modelo LI- 6400). Todas las mediciones se realizaron al mediodía solar y dos veces durante el período de ensayo (40 y 75 días). Se determinó la eficacia de uso de agua (WUE) por la relación  $A_n/G_s$ .

15 Se midió la medición de clorofila, en unidades SPAD, en 10 plantas dos veces (40 y 75 días) mientras duró el ensayo. Se determinó con un medidor portátil (medidor de clorofila SPAD-502, Konica Minolta). El aparato realizó mediciones instantáneas y no destructivas, llamado índice relativo de clorofila (RCI, unidades SPAD), que indica un valor de absorbancia del intervalo de longitud de onda máximo a 650 nm (rojo) emitido por las hojas, que es una región de alta absorbancia debido a las moléculas de clorofila.

Los datos de contenido de iones en las hojas se obtuvieron por la técnica ICP-OES (Iris Intrepid II XDL, OribaSci.) en el servicio Ionomics del CEBAS-CSIC, Murcia, en 75 días desde el inicio del tratamiento.

Los iones medidos fueron:

- 20
- Macroelementos: Nitrógeno (N), Fósforo (P), Potasio (K) y Calcio (Ca)
  - Elementos traza: Manganeso (Mn), Hierro (Fe) y Zinc (Zn)

La determinación de iones se realizó sobre material seco y molido hasta alcanzar un tamaño de partícula capaz de pasar a través de un tamiz de 0,5 mm de diámetro de malla y se almacenó en recipientes de plástico hasta posterior análisis químico.

25 La Tabla 3 muestra los resultados obtenidos en la evaluación de la actividad de micorrizas de estas tres cepas en estudio en presencia de dos dosis de fertilizantes. Un análisis rápido de los resultados muestra que en cualquiera de las situaciones de fertilización usadas, los hongos formadores de micorrizas tienen mayor expresión en términos de colonización de micorrizas, producción de micelio y Glomalina, en comparación con controles que, como tenían suelo agrícola natural, tienen hongos formadores de micorrizas, pero con valores generalmente inferiores en presencia de las dosis de fertilización usadas.

30 En los análisis de parámetros individuales, puede observarse que, para el caso de colonización de micorrizas internas, los mayores niveles están en las cepas de hongos formadores de micorrizas y dentro de estos la cepa de *Glomus iranicum* var. *tenuihypharum* var. nov., de un suelo salino con sodio, destaca significativamente alcanzando los mayores niveles en las plantas tratadas con el 100 % de la dosis de fertilizante (78 %) aunque no es significativamente diferente del equivalente del 50 % (70 %). Sin embargo, este comportamiento no se observó para las otras dos cepas.

35

Tanto *Glomus mosseae* y *Glomus intraradices* alcanzaron su mayor presencia interna en presencia de dosis inferiores de fertilizantes (43 y 53,7 %, respectivamente), pero frente a dosis mayores de fertilización, estos valores cayeron hasta el 21,24 y 24,0 % respectivamente, muy cerca de los valores alcanzados por el control en estas condiciones (Tabla 3).

40 Tabla 3. Micelio extramatricial ( $\text{mg/kg}^{-1}$ ), Colonización de micorrizas (%) y concentración de Glomalina fácilmente extraíble ( $\text{mg/g}^{-1}$  de suelo) en plantas de lechuga inoculadas con *Glomus mosseae* (G.m), *Glomus intraradices* (G.i) y *Glomus iranicum* var *tenuihypharum* var. nov. (G. iranicum) y no tratadas (C) después de 75 días en cultivo con fertilización del 100 % y el 50 %.

	Micelio extramatricial ( $\text{mg.kg}^{-1}$ ) 1 s)	Colonización de micorrizas (%)	Glomalina ( $\text{mg.g}^{-1}$ de suelo)
G.m 100 %	143,0 ± 17,8 e	21,25 ± 1,5 d	133,0 ± 2,1 d
G.i 100 %	232,0 ± 13,9 d	24,0 ± 6,7 d	323,3 ± 1,6 b
G.iranicum 100 %	850,0 ± 19,9 a	78,7 ± 1,63 a	467,1 ± 5,6 a
C 100 %	122,2 ± 13,9 e	12,75 ± 1,0 e	90,10 ± 7,7 e
G.m 50 %	221,2 ± 11,2 d	43,0 ± 3,78 c	209,7 ± 4,5 c
G.i 50 %	345,5 ± 12,9 c	53,75 ± 1,0 b	345,0 ± 7,7 b

	Micelio extramatricial (mg.kg <sup>-1</sup> )	Colonización de micorrizas (%)	Glomalina (mg.g <sup>-1</sup> de suelo)
G.iranicum 50 %	765,9 ± 11,2 b	70,0 ± 1,46 a	422,3 ± 9,8 a
C 50 %	155,4 ± 15,9 e	9,25 ± 0,69 e	100,6 ± 9,9 de
Es x	10,23***	6,83***	8,4***

\*\*\* Indica el nivel de significancia de 0,001. Diferentes letras en las mismas columnas corresponden a valores significativamente diferentes. De acuerdo con el ensayo de comparación múltiple de Duncan (P<0,05).

El micelio extramatricial mostró sorprendentemente diferencias extremas entre los tipos de especies de hongo en las dos condiciones de fertilización estudiadas. De nuevo, la especie aislada de suelo salino con sodio (*Glomus iranicum* var. *tenuihypharum* var. nov.), expresó los mayores niveles de micomasa ectófitas, alcanzando valores de 850 mg/k de suelo en presencia de la mayor dosis de fertilizante, en este caso significativamente diferente de la dosis más baja de fertilizante, 765,9 mg/k de suelo. Sin embargo, en comparación con otros tratamientos, las diferencias fueron muy significativas. En este caso, las cepas restantes tuvieron mayor rendimiento que los controles no tratados en cualquiera de las situaciones, siendo la mejor combinación significativamente diferente cuando las plantas tuvieron un 50 % de fertilización química. Cuando las cepas se enfrentaron a la dosis más alta tuvieron un desarrollo inferior e incluso en el caso de *Glomus mosseae* desarrollaron bajos niveles de micelio, comparable con las cepas nativas, que tuvieron un bajo rendimiento.

Este efecto también se observó en la producción de Glomalina fácilmente extraíble del suelo. En este caso y como consecuencia de la actividad de micorrizas ectófitas, los mayores valores de Glomalina, que es una glucoproteína insoluble secretada por el micelio extramatricial de hongos formadores de micorrizas, se alcanzaron en aquellos tratamientos con mayor producción de micelio, que consiste en casi un calco del comportamiento del micelio. De nuevo, los mayores niveles se expresaron en presencia de la cepa *Glomus iranicum* var. *tenuihypharum* var. nov.; en este caso no hubo diferencias significativas entre las dosis de fertilizante usadas con 467,1 (100 %) y 422,3 (50 %) mg/g de suelo y fue la especie que excretó más proteína en el medio, seguida por las otras dos especies que, de nuevo, expresaron su mayor potencial frente a dosis inferiores de fertilizante (50 %) con 345 mg/g de suelo para *Glomus intraradices* y 209 mg/g de suelo para *Glomus mosseae*.

Este efecto encontrado en la actividad de micorrizas se mantuvo en la evolución de las concentraciones de clorofila y las mediciones de intercambio de gas realizadas en todo el cultivo.

La Tabla 4 y 5, muestran los resultados de la evolución de las mediciones de SPAD, fotosíntesis neta (An), conductancia estomática (Gs) y eficacia en el uso de agua (W/Gs) a los 40 y 75 días en los tratamientos inoculados con diferentes cepas de hongos formadores de micorrizas y plantas no tratadas frente a las dosis del 50 % y 100 % de fertilización química.

Tabla 4. SPAD, fotosíntesis neta (An) ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), conductancia estomática (Gs) ( $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) y eficacia en el uso de agua (WUE,  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mmol}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$ ) en plantas de lechuga inoculadas y de control con 100 % y 50 % de fertilización (40 días).

Tratamientos	SPAD	An ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )	Gs ( $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )	WUE (An/Gs)
G. mosseae 100 %	25,2 b	8,23 c	121 a	68,01 c
G. intraradices 100 %	22,0 d	8,12 c	123 a	66,0 c
G. iranicum 100 %	31,1 a	10,33 a	117 b	88,29 a
Control 100 %	22,2 d	7,3 d	120 a	60,83 d
G. mosseae 50 %	24,4 c	9,4 b	119 a	78,99 b
G. intraradices 50 %	23,4 c	9,21 b	122 a	75,49 b
G. iranicum 50 %	26,3 b	10,66 a	119 b	89,57 a
Control 50 %	22,47 d	7,34 d	121 a	60,66 d
Es x	0,14***	0,42***	1,89***	2,25**

\*\*\* Indica el nivel de significancia de 0,001. Diferentes letras en la misma columna corresponden a valores significativamente diferentes. De acuerdo con el ensayo de comparación múltiple de Duncan (P<0,05).

Igual que el comportamiento de micorrizas, se obtienen mayores valores SPAD en comparación con los controles en las variantes tratadas con diferentes especies de hongos de micorrizas 40 días después de sembrar las lechugas. La especie *Glomus iranicum* var. *tenuihypharum* var. nov. tuvo un valor SPAD de 31, promovió mayores valores de SPAD frente a la dosis más alta de fertilizante en plantas tratadas, constituyendo la mayor producción, seguida por *Glomus mosseae*, con un valor SPAD de 25; sin embargo, en el caso de las plantas tratadas con *Glomus intraradices* presentaron un comportamiento contrario, desarrollando mayores niveles SPAD frente a la dosis del 50 %. Sin embargo, este valor indica la concentración indirecta de clorofila y también puede ser indicativa de mejor nutrición de nitrógeno, pero como es una medición indirecta, no es una variable que indique un funcionamiento

particular, sino un indicador de la concentración de luz emitida por la hoja y relacionado, a su vez, con los plástidos presentes en células fotosintéticas, por tanto, su análisis siempre debe correlacionarse con el intercambio de gas.

5 En los parámetros restantes de intercambio de gas medidos, los valores de fotosíntesis fueron siempre mayores en el caso de las cepas de hongos formadores de micorrizas y las plantas tratadas con *Glomus iranicum* var. *tenuihypharum* var. nov., donde se consiguieron las mayores tasas de asimilación de CO<sub>2</sub> de 10,33 (100 %) y 10,66 (50 %) en cualquiera de las variantes y, a su vez, las tasas inferiores de conductancia estomática de 117 (100 %) y 119 (50 %), que finalmente expresa los mayores niveles de uso eficaz del agua de 88,29 en el caso de fertilización del 100 % y 89,27 frente al 50 %.

10 Estos valores aumentaron después de 75 días de cultivo (Tabla 5), donde no solamente fueron los mayores de nuevo, sino que tuvieron una actividad fotosintética mayor en términos absolutos a expensas de una baja conductancia estomática, derivada de un apropiado funcionamiento fisiológico y un uso mucho más eficaz del agua del orden de 106,3 en el caso de fertilización del 100 % y 95,77 en el caso del 50 %.

15 Tabla 5. SPAD, fotosíntesis neta (An) ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), conductancia estomática (Gs) ( $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) y eficacia en el uso de agua (WUE,  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mmol}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$ ) en plantas de lechuga inoculadas y de control con 100 % y 50 % de fertilización (75 días).

Tratamientos	SPAD	An ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )	Gs ( $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )	WUE (An/Gs)
G. mosseae 100 %	20,2 b	9,39 b	140 a	67,07 d
G. intraradices 100 %	19,0 c	9,23 b	140 a	65,09 d
G. iranicum 100 %	28,1 a	12,76 a	120 b	106,3 a
Control 100 %	19,1 d	8,47 c	125 a	67,76 d
G. mosseae 50 %	21,28 b	9,795 b	133 a	73,30 c
G. intraradices 50 %	20,41 c	9,39 b	132 a	71,14 c
G. iranicum 50 %	23,1 b	11,78 a	123 b	95,77 b
Control 50 %	21,66 c	8,17 c	125 a	65,36 d
Es x	0,25***	0,815***	2,4**	1,80***

\*\*\* Indica el nivel de significancia de 0,001. Diferentes letras en la misma columna corresponden a valores significativamente diferentes. De acuerdo con el ensayo de comparación múltiple de Ducan (P<0,05).

20 Las otras cepas fueron inferiores a *Glomus iranicum* var. *tenuihypharum* var. nov. en cualquier condición de fertilización, y aunque tuvieron mayor actividad fotosintética a los 75 días, con respecto a la evolución previa, lo hicieron a expensas de una conductividad estomática aumentada, mediante lo cual alcanzaron un uso menos eficaz de agua, en comparación no solamente con la cepa de *Glomus iranicum* var. *tenuihypharum* var. nov. sino también con su propio comportamiento a los 40 días, que puede relacionarse con una pérdida de la propia actividad de micorrizas, como se ha apreciado previamente con una caída de la colonización de micorrizas frente a mayores dosis de fertilización.

25 Aunque los tratamientos de control tuvieron un uso de agua generalmente menos eficaz a los 40 días, este efecto fue diferente al final del ciclo. En el caso de las plantas tratadas con un 50 % de fertilización, el tratamiento de control estuvo por debajo de las plantas tratadas con hongos formadores de micorrizas, pero al 100 % de fertilización, solo las plantas tratadas con *Glomus iranicum* var. *tenuihypharum* var. nov. tuvieron un uso más eficaz. La eficacia del control alcanzó su máximo (67,76), sin diferencias significativas con las otras dos especies de hongos de micorrizas arbusculares (AMF) (67,07 y 65,09), incluso en el caso de *Glomus intraradices*. Este valor es inferior que el tratamiento de control, aunque no significativo, lo que demuestra un desajuste fotosintético posiblemente derivado de una relación simbiótica no adecuada para esta fase del cultivo.

35 Obviamente, este análisis de la actividad fisiológica de las plantas evaluadas está muy relacionado con la productividad y los niveles nutritivos conseguidos en plantas tratadas con AMF. La Tabla 6 y 7, muestran los pesos frescos y secos de las hojas y las raíces, alcanzados en los diferentes tratamientos en la recolección, así como los elementos nutritivos a los 75 días de cultivo.

El análisis de la biomasa de hojas y raíces muestra el efecto positivo de la aplicación de AMF. Tanto en condiciones de fertilidad máxima como en condiciones promedio, las cepas de hongos formadores de micorrizas produjeron mayor biomasa respecto a sus equivalentes no tratados, pero de un modo diferente.

40 En el caso de la cepa de *Glomus iranicum* var. *tenuihypharum* var. nov., siguiendo con este apropiado funcionamiento de micorrizas y el potencial fisiológico proporcionado a las plantas tratadas, se obtienen los mayores niveles de biomasa tanto en una condición como en la otra; sin embargo, alcanzó los mayores niveles con fertilización máxima (Tabla 5).

Tabla 6. Peso Fresco de las Hojas (g), Peso seco de las Hojas (g), Peso Fresco de las Raíces (g) y Peso Seco de las Raíces (g) en plantas de lechuga inoculadas con *Glomus mosseae* (G.m), *Glomus intraradices* (G.i) y *Glomus iranicum* var. *tenuihypharum* var. nov. (G. iranicum) y no tratadas (C) después de 90 días en cultivo con 100 % y 50 % de fertilización.

Tratamientos	Peso fresco de las hojas (g)	Peso seco de las hojas (g)	Peso fresco de las raíces (g)	Peso seco de las raíces (g)
G. mosseae 100 %	600,42 ± 3,3 b	9,18 ± 1,5 e	122,28 ± 1,6 g	1,7 ± 1,7 c
G. intraradices 100 %	613,68 ± 4,6 b	10,71 ± 2,3 d	162,83 ± 9,62 d	1,6 ± 0,33 c
G. iranicum 100 %	800,03 ± 0,62 a	17,19 ± 0,25 a	232,13 ± 5,43 a	2,89 ± 0,44 a
Control 100 %	678,26 ± 3,73 b	9,12 ± 2,45 e	179,51 ± 3,21 e	1,4 ± 0,93 d
G. mosseae 50 %	770,42 ± 1,61 ab	13,44 ± 0,35 c	171,7 ± 3,74 c	1,8 ± 0,12 c
G. intraradices 50 %	640,42 ± 2,55 b	11,50 ± 1,19 c	199,31 ± 4,74 b	2,0 ± 0,45 a
G. iranicum 50 %	782,50 ± 2,18 a	15,04 ± 0,41 b	203,13 ± 4,56 b	2,2 ± 1,32 b
Control 50 %	510,58 ± 1,58 c	8,69 ± 1,2 e	158,57 ± 1,66 f	1,3 ± 1,41 d
Es x	6,38***	1,76***	32,7***	0,6**

\*\*\* Indica el nivel de significancia de 0,001. Diferentes letras en la misma columna corresponden a valores significativamente diferentes. De acuerdo con el ensayo de comparación múltiple de Duncan (P<0,05).

5 Sin embargo, las cepas restantes obtuvieron su mayor potencial de desarrollo en los tratamientos fertilizados con 50 % del fertilizante, reduciendo su productividad según se aumentaron los niveles de fertilizante en la solución de suelo. En el caso de los controles no tratados, se expresaron los mayores valores de biomasa en presencia de las mayores dosis de fertilizantes.

10 El análisis de concentraciones foliares de nutrientes observadas a los 75 días de cultivo confirmó los resultados obtenidos en las otras variables estudiadas (Tabla 6). En este caso, en la mayoría de los elementos se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos estudiados excepto los contenidos de K y Zn en las hojas. De nuevo, esta vez los mayores valores aparecieron en los tratamientos que alcanzaron el mayor desarrollo en la biomasa y actividad fisiológica, poniendo de relieve las plantas tratadas con la especie *Glomus iranicum* var. *tenuihypharum* var. nov., en presencia de la mayor dosis de fertilizantes.

15 Es importante poner de relieve los valores de los elementos traza Fe (constituyente de la clorofila) y Mn (co-factor enzimático del proceso de fotosíntesis y actividad de crecimiento en general) encontrados, muy relacionados con la actividad fotosintética de las plantas. Su alta expresión en plantas tratadas con *Glomus iranicum* var. *tenuihypharum* var. nov., significativamente diferente del resto de las plantas tratadas o no con AMF, indica no solamente una fuerte respuesta a la absorción de este elemento, sino también una necesidad de simbiosis para elevar sus concentraciones en respuesta a una actividad fotosintética aumentada en general

20

Tabla 7. Concentraciones de algunos elementos nutritivos (ppm) en plantas de lechuga inoculadas con *Glomus mosseae* (G.m), *Glomus intraradices* (G.i) y *Glomus iranicum* var. *tenuihypharum* var. nov. (G. iranicum) y no tratadas (C) después de 75 días de cultivo con 100 % y 50 % de fertilización.

	N (ppm)	P (ppm)	K (ppm)	Ca (ppm)	Mn (ppm)	Fe (ppm)	Zn (%)
G.m 100 %	2,2 c	0,12 c	5,9	2,3 c	130,2 c	322 b	23,4
G.i 100 %	2,1 c	0,11 d	5,9	2,4 c	132,2 c	342 b	22,1
G. iranicum 100 %	2,9 a	0,14 a	6,5	3,2 a	167,4 a	750 a	34,2
C 100 %	2,4 c	0,11 d	5,8	2,9 b	133,5 c	389 b	30,2
G.m 50 %	2,5 bc	0,11 d	5,6	2,1 c	125,2 d	343 b	33
G.i 50 %	2,6 b	0,13 a	5,7	2,1 c	134,2 c	332 b	32
G. iranicum 50 %	2,8 a	0,13 a	5,6	2,4 c	146,9 b	688 a	36,4
C50 %	2,2 c	0,11 d	5,5	2,0 c	122,3 d	399 b	28,9
Es x	0,02**	0,03**	1,1 n.s	0,02**	8 9***	11 2**	7,8 n.s

\*\* , \*\*\* y n.s indican el nivel de significancia de 0,05, 0,001, no significativo, respectivamente. Diferentes letras en la misma columna corresponden a valores significativamente diferentes. De acuerdo con el ensayo de comparación múltiple de Duncan (P <0,05).

25 El resto de los elementos siguieron la tendencia encontrada en las variables analizadas restantes, apareciendo los mayores niveles de nutrientes en plantas tratadas con un 50 % de fertilización para cepas tratadas con las cepas de *Glomus intraradices* y *Glomus mosseae*, pero cuando la fertilización fue mayor, estos valores se igualaron incluso



REIVINDICACIONES

1. Cepa de *Glomus iranicum* var. *tenuihypharum* var. nov. depositada en el número de depósito de BCCM 54871, **caracterizada por que** comprende la secuencia identificada por la SEQ ID NO: 1.
- 5 2. Composición **caracterizada por que** comprende una cepa de *Glomus iranicum* var. *tenuihypharum* var. nov. depositada en el número de depósito de BCCM 54871 que comprende la secuencia identificada por la SEQ ID NO: 1 y arcillas esmectíticas 2:1.
3. Composición de acuerdo con la reivindicación 2, **caracterizada por que** dichas arcillas esmectíticas 2:1 son dioctaédricas o trioctaédricas.
- 10 4. Composición de acuerdo con la reivindicación 2, **caracterizada por que** dichas arcillas esmectíticas 2:1 se seleccionan del grupo que consiste en sepiolita, atapulgita, nontronita y saponita.
5. Composición de acuerdo con una de las reivindicaciones 2 o 3, **caracterizada por que** la concentración de dicha cepa de *Glomus iranicum* var. *tenuihypharum* var. nov. es entre el 0,05 y el 4 % en peso.
6. Composición de acuerdo con la reivindicación 5, **caracterizada por que** dicha concentración es entre el 0,1 y el 3 % en peso.
- 15 7. Composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6, **caracterizada por que** la forma de presentación de dicha composición es en polvo, concentrado emulsionable o gránulos.
8. Composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7, **caracterizada por que** dicha composición es un líquido, un sólido o un gel.
- 20 9. Composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 8, **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 bionematocida.
- 25 10. Composición de acuerdo con la reivindicación 9, **caracterizada por que** dicho fungicida se selecciona del grupo que consiste en Maneb, Mancozeb, Metalaxil-Ridomil, Miclobutanil, Olpisan, Propamocarb, Quintozeno, Estreptomocina, Azufre, Tiofanato-metilo, Tiram, triforina, Vinclozolina, blanco de zinc, Zineb, Ziram, Banrot, cobre fijado, Clorotalonil, Clorotalonil, Captan, Cloroneb, Ciproconazol, eteleno de zinc, bisditiocarbamato, Etridiazol, Fenaminosulf, Fenarimol, Flutolanil, Folpet, Fosetil-AL e Iprodiona.
- 30 11. Composición de acuerdo con una de las reivindicaciones 9 o 10, **caracterizada por que** dicho fungicida se selecciona del grupo que consiste en *Trichoderma* sp, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Streptomyces* sp, *Coniothyrium minitans* y *Pythium oligandrum*.
- 30 12. Composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, **caracterizada por que** dicho insecticida se selecciona del grupo que consiste en organofosfato, carbamato y neonicotinoide.
- 35 13. Composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12, **caracterizada por que** dicho bioinsecticida se selecciona del grupo que consiste en *Bacillus* sp. *Chromobacterium* sp., *Beauveria* sp. y *Metarhizium* sp.
- 35 14. Composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9 a 13, **caracterizada por que** dicho nematocida es organofosfato o carbamato.
- 35 15. Composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9 a 14, **caracterizada por que** dicho bionematocida es *Pasteuria* sp.
- 40 16. Método para obtener una composición de acuerdo con las reivindicaciones 2 a 15, **caracterizado por que** comprende:
  - (a) inoculación por recubrimiento de una semilla de una planta hospedadora con la cepa de *Glomus iranicum* var. *tenuihypharum* var. nov. depositada en el número de depósito de BCCM 54871,
  - (b) cultivo de dicha planta en ciclos de riego entre 7 y 10 días sobre un sustrato de reproducción que comprende arcillas esmectíticas en un porcentaje por encima del 52 % del peso total de dicho sustrato,
  - 45 (c) interrupción de dicho riego durante un periodo igual o mayor de 20 días,
  - (d) retirada de la parte aérea de la planta y retirada del sustrato y

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

17. Uso de la composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 16 como bioestimulante.

5 18. Uso de acuerdo con la reivindicación 17, **caracterizado por que** dicha composición se aplica a la planta mediante tratamiento a las semillas, tratamiento a las raíces, raíces embebidas en una emulsión, adición al agua de irrigación, irrigación, aplicación de polvo al sistema de raíces o aplicación de emulsión inyectada en el sistema de raíces.