

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 645 083**

51 Int. Cl.:

C12N 1/14 (2006.01)

C12N 1/20 (2006.01)

C05B 15/00 (2006.01)

C05F 11/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.04.2013** **PCT/US2013/037201**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.10.2013** **WO13158900**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.04.2013** **E 13779082 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.08.2017** **EP 2838988**

54 Título: **Uso de microorganismos y nutrientes sinérgicos para producir señales que facilitan la germinación y la colonización de raíces vegetales por hongos micorrizales en ambientes ricos en fósforo**

30 Prioridad:

20.04.2012 US 201261687210 P

15.03.2013 US 201313815856

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

04.12.2017

73 Titular/es:

NOVOZYMES BIOAG A/S (100.0%)

Krogshoejvej 36

2880 Bagsvaerd, DK

72 Inventor/es:

JOHNSON, THOMAS, D.

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 645 083 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

Uso de microorganismos y nutrientes sinérgicos para producir señales que facilitan la germinación y la colonización de raíces vegetales por hongos micorrizales en ambientes ricos en fósforo

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0001] Esta invención se refiere a la combinación de microorganismos sinérgicos para producir las señales que son necesarias para facilitar la germinación y la colonización de raíces vegetales de hongos micorrizales. La colonización de la raíz vegetal por hongos micorrizales da como resultado el aumento de la disponibilidad de nutrientes para las plantas, el control de patógenos y la mejora de la estructura y/o la calidad del suelo. En particular, una realización ilustrativa de la invención se refiere a la combinación de fitato como fuente de nutrientes con una combinación de *Trichoderma virens*, *Bacillus amyloliquefaciens*, y hongos micorrizales, que incluyen las siguientes especies conocidas: *Glomus intraradices*, *Glomus etunicatum*, *Glomus aggregatum*, *Glomus mosseae*, con el fin de reemplazar, duplicar o mejorar el efecto de los compuestos fertilizantes estándar que contienen fósforo, como un fertilizante 10-34-0, 9-18-9, 3-18-18, u otras combinaciones de fertilizantes NPK.

[0002] El ácido fítico [conocido como hexakisfosfato de inositol (IP6) o fitato cuando está en forma de sal] es la principal forma de almacenamiento de fósforo en muchos tejidos vegetales, especialmente en el salvado y las semillas. El fitato es también una forma principal de fósforo orgánico dentro del perfil del suelo, constituyendo típicamente un 20% -50% del fósforo orgánico del suelo.

[0003] *Trichoderma* es un género de hongos que contiene alrededor de 20 especies. Los sinónimos para el nombre del género incluyen *Aleurisma* y *Esporoderma*. *Trichoderma virens*, que también se llama *Gliocladium virens*, es un miembro del género. Los hábitats naturales de estos hongos incluyen la tierra y el material vegetal. Un miembro del género, *Trichoderma harzianum* KRL-AG2 (ATCC 20847) también conocido como cepa T-22, se utiliza como agente de control biológico que se aplica como tratamiento de semillas o de tierra, o en esquejes y trasplantes. Las cepas de la especie, *Trichoderma virens*, también se han utilizado para controlar las enfermedades de putrefacción de semillas en las plantas. Por ejemplo, *Trichoderma (Gliocladium) virens* GI-21 es conocida y está disponible comercialmente a un precio razonable, y se vende bajo la marca registrada SoilGuard® 12G (Número de registro EPA: 70051-3 y Número de establecimiento EPA: 067250-IL-001). Está fabricada por Thermo Trilog Corporation de Columbia, MD. Otras cepas conocidas y disponibles comercialmente de *Trichoderma virens* incluyen las que tienen los siguientes números de acceso ATCC: 10043, 10044, 10045, 13213, 13362, 204067, 204443, 204444, 204445, 20903, 20904, 20906, 24290, 42955, 44327, 44734, 48179, 52045, 52199, 58676, 58677, 58678, 62399, 64271, 74180, 9645, MYA-297, MYA-298, MYA-649 y MYA-650.

[0004] *Bacillus* es un género de bacterias en forma de bastón, gram positivas, aeróbicas o (bajo ciertas condiciones) anaeróbicas. Las especies de *Bacillus* se encuentran en gran cantidad en la tierra y el agua y algunas se han utilizado para controlar las enfermedades de las plantas, incluida la putrefacción de la raíz. *Bacillus amyloliquefaciens* es un miembro formador de esporas del género. La cepa F (ATCC 23350) de *Bacillus amyloliquefaciens* de L.L. Campbell es la cepa tipo para la especie. Otras cepas conocidas y disponibles comercialmente de *Bacillus amyloliquefaciens* incluyen las que tienen los siguientes números de acceso ATCC: 23842, 23843, 23844, 23845, 31592, 49763, 53495 y BAA-390 (Int. J. Sys. Bacteriol. 37: 69-71, 1987; J. Bacteriol. 94: 1124-1130, 1967).

[0005] En el pasado, antes de que el nombre se cambiara oficialmente para reconocer que el microorganismo era una especie nueva, *Bacillus amyloliquefaciens* también fue llamado *Bacillus subtilis* var. *amyloliquefaciens* por algunos investigadores. Una proteasa producida a partir de *Bacillus subtilis* var. *amyloliquefaciens* se usa comúnmente como ablandador para productos cárnicos crudos. De acuerdo con la Agencia de Protección Ambiental de EE. UU. (EPA), la cepa FZB24 de *Bacillus subtilis* var. *amyloliquefaciens* es un microorganismo de origen natural y está muy extendido en el medio ambiente. *Bacillus subtilis* var. *amyloliquefaciens* FZB24 (Número de registro EPA: 72098-5 y el Número de establecimiento EPA: 73386-DEU-001) se conoce y está disponible comercialmente a un precio razonable, vendida bajo la marca comercial Taegro® por Novozymes, Inc. de Brookfield, WI.

[0006] Un hongo micorrizal arbuscular es un tipo de micorriza en el cual el hongo penetra en las células corticales de las raíces de una planta vascular. Los hongos micorrizales arbusculares ayudan a las plantas a capturar nutrientes como el fósforo, el azufre, el nitrógeno y micronutrientes del suelo. Se cree que el desarrollo de la simbiosis micorrícica arbuscular jugó un papel crucial en la colonización inicial del terreno por las plantas y en la evolución de las plantas vasculares.

[0007] El desarrollo de hongos micorrizales arbusculares antes de la colonización de la raíz, conocido como presimbiosis, comprende tres etapas: germinación del propágulo, crecimiento hifal, y reconocimiento de huésped y formación de apresorio. Los propágulos son estructuras de reposo con múltiples núcleos y paredes gruesas. Los propágulos de hongos micorrizales arbusculares pueden germinar dadas las condiciones adecuadas de la

matriz del suelo, la temperatura, la concentración de dióxido de carbono, el pH y la concentración de fósforo. No se cree que la germinación del propágulo esté bajo el control directo de la planta ya que los propágulos han germinado en condiciones experimentales en ausencia de plantas tanto in vitro como en tierra. Sin embargo, la tasa de germinación del propágulo puede aumentarse con los exudados de la raíz hospedadora de la planta.

[0008] El crecimiento de las hifas micorrizales arbusculares a través del suelo está controlado por los exudados de la raíz del huésped y la concentración de fósforo en el suelo. La colonización de hongos micorrizales arbusculares es mayor en suelos pobres en nutrientes, y disminuyó con la adición de fertilizantes fosfatados. Las bajas concentraciones de fósforo en el suelo aumentan el crecimiento y ramificación de la hifa, e inducen la exudación en plantas de compuestos que controlan la intensidad de la ramificación de la hifa. Los hongos micorrizales arbusculares también tienen capacidades quimiotáxicas que permiten el crecimiento hifal hacia las raíces de una planta huésped potencial.

[0009] Un desafío importante para el micorrizólogo es comprender los mecanismos de señalización extremadamente armoniosos del huésped de hongos micorrizales arbusculares y el proceso de colonización. Esta armoniosa relación simbiótica se refleja en la obligada naturaleza biotrófica de los hongos, que no se pueden cultivar en ausencia de un huésped. Si bien se ha alcanzado el éxito en el logro de asociaciones micorrizales eficaces con las plantas de cultivo que crecen en suelo esterilizado, el éxito final para el uso agrícola de los hongos micorrizales vesículoarbusculares (VAM) ocurrirá cuando puedan usarse de manera fiable para mejorar el rendimiento de los cultivos que crecen en suelo no fumigado.

[0010] Esta invención proporciona una señal que produce la germinación del propágulo y posterior colonización de la raíz de las micorrizas de una manera muy sorprendente. Desde hace tiempo se sabe que las semillas almacenan fósforo como fitato (IP6) y que una semilla germinante produce la enzima fitasa para descomponer el fitato en formas utilizables por las plantas para proporcionar nutrientes a la planta. También se sabe que la descomposición del fitato (una molécula de seis fósforos) por la enzima fitasa libera tres moles de fósforo inorgánico (ortofosfato) y mio-inositol trifosfato (IP3). Las plantas necesitan fósforo en forma inorgánica, principalmente ortofosfato, para llevar el nutriente a la raíz. Las plantas usan muy poco fósforo orgánico ya que no poseen un método eficaz para descomponer el fitato. El mio-inositol trifosfato (IP3) se conoce como un segundo mensajero que puede facilitar las comunicaciones y/o las respuestas entre los organismos. La liberación de mio-inositol que se produce a través de la hidrólisis del fitato con fitasa de *B. amyloliquefaciens* tiene un impacto en las interacciones planta-microbio y específicamente interacciones entre plantas y bacterias fijadoras de N. Se desconoce la señal que es responsable de la germinación de las micorrizas y la posterior colonización de la raíz de la planta por hongos micorrizales. Además, no se ha sugerido en la literatura que la señal IP3 tenga ningún vínculo con la respuesta de los hongos micorrizales, la germinación del propágulo o la colonización de la raíz. De hecho, es bien sabido que la colonización de raíces por micorrizas puede lograrse en condiciones de tierra de bajo fósforo, pero es extremadamente difícil producir germinación micorrízica y colonización de raíces en condiciones de tierra con alto contenido de fósforo o un ambiente de rizosfera de fósforo alto. Es, por lo tanto, también un hecho que la literatura desaconseja la noción de que el uso de una enzima fitasa para reducir el fitato y liberar fácilmente fósforo disponible en la planta en la rizosfera daría como resultado una señal que facilita la germinación y posterior colonización de las raíces de las plantas por hongos micorrízicos.

[0011] Es probable que un estudio adicional de esta invención produzca mecanismos de señal dual y tal vez múltiple, ya que se sabe que la germinación de propágulos de micorrizas puede ocurrir en ausencia de la raíz de la planta; sin embargo, la germinación del propágulo es más probable cuando la raíz está presente. Esto sugiere una respuesta de señal desconocida.

[0012] Los antecedentes de la técnica se caracterizan por las patentes EE.UU. N.^{os} 4.476.881; 4.489.161; 4.642.131; 4.668.512; 4.678.669; 4.713.342; 4.724.147; 4.748.021; 4.818.530; 4.828.600; 4.877.738; 4.915.944; 4.952.229; 5.047.239; 5.049.379; 5.071.462; 5.068.105; 5.084.272; 5.194.258; 5.238.690; 5.260.213; 5.266.316; 5.273.749; 5.300.127; 5.344.647; 5.401.655; 5.422.107; 5.455.028; 5.409.509; 5.552.138; 5.589.381; 5.614.188; 5.628.144; 5.632.987; 5.645.831; 5.665.354; 5.667.779; 5.695.982; 5.702.701; 5.753.222; 5.852.054; 5.869.042; 5.882.641; 5.882.915; 5.906.818; 5.916.029; 5.919.447; 5.922.603; 5.972.689; 5.974.734; 5.994.117; 5.998.196; 6.015.553; 6.017.525; 6.030.610; 6.033.659; 6.060.051; 6.103.228; y 7.339.091.

[0013] Tanto CN 102 229 644 como CN 101 531 999 describen una composición que comprende ácido fítico, calcio y enzima fitasa.

[0014] Usman Irshad et al., Plant and Soil, vol. 358, páginas 155-168 describe una composición que comprende plántula, fitato, un basidiomiceto micorrízico y una fitasa que produce *Bacillus subtilis*.

[0015] CN 101 665 374 describe una mezcla de fertilizante que comprende un componente nutritivo, un hongo tal como *Trichoderma* y/o hongo micorrízico, p. ej., *Glomus* y una bacteria como *Bacillus*, así como el uso de la mezcla para aumentar el rendimiento de la planta.

BREVE RESUMEN DE LA INVENCION

[0016] Un aspecto de la invención es que crea una asociación efectiva de hongos micorrizales con la raíz de una planta huésped en un entorno rico en fósforo. Otros aspectos de la invención son la germinación de propágulos de micorrizas y posterior colonización de raíces desencadenada por una molécula de señal. Otro aspecto adicional de la invención es la presencia de la molécula de señal IP3. Otro aspecto adicional de la invención es el uso de una bacteria que produce una enzima fitasa en un entorno alto en fósforo debido a la presencia del gen PhyC. Otro aspecto más de la invención es el uso de un componente microbiano, un hongo de *Trichoderma*, que produce enzimas de fosfatasa que pueden romper los enlaces en compuestos estables tales como fosfato tricálcico y liberar iones de Ca^{++} .

[0017] Tal como se usa en el presente documento, los siguientes términos y variaciones de los mismos tienen los significados que se dan a continuación, a menos que un significado diferente esté pensado claramente por el contexto en el que se usa dicho término:

Debe interpretarse que "uno/a" y "el/la" y referentes similares utilizados en este documento cubren tanto el singular como el plural a menos que su uso en contexto indique lo contrario.

[0018] "Aproximadamente" significa dentro del uno por ciento de un parámetro o medida enumerados, y preferiblemente dentro del 0,1 por ciento de dicho parámetro o medida.

[0019] "Comprender" y las variaciones del término, como "que comprende" y "comprende", no pretenden excluir otros aditivos, componentes, enteros o pasos.

[0020] "E" significa "por 10 elevado a."

[0021] "Ejemplar", "ilustrativo" y "preferido" significan "otro".

[0022] Una realización ilustrativa de la invención comprende una combinación de nutrientes principales, micronutrientes, hongos y bacterias que aumentan el rendimiento de las plantas de una manera que es comparable o superior a la aplicación de una química de fertilizantes estándar.

[0023] En uso, una realización ilustrativa de la invención crea una sinergia que tiene lugar cuando se junta un tipo apropiado y proporciones apropiadas de nutrientes, hongos y bacterias de tal manera que proporcionan a las plantas los nutrientes disponibles que aumentan el rendimiento de la planta o el rendimiento de la semilla.

[0024] Una realización ilustrativa de la invención comprende: una multitud de nutrientes, que pueden o no estar disponibles para plantas, combinados con una multitud de hongos y una multitud de bacterias en presencia de una semilla, una planta o una raíz.

[0025] Una realización ilustrativa de la invención es un método que comprende los siguientes pasos: producir una mezcla que está compuesta de nutrientes, hongos y bacterias de tal manera que produzca una sinergia entre los componentes; aplicar la mezcla a una semilla o aplicar la mezcla en una banda en contacto con la semilla o cerca de la semilla o en una mezcla de tierra en la que dichos hongos y dichas bacterias reducen dichos nutrientes a una forma disponible para la planta, permitiendo así que los hongos micorrizales colonicen la raíz en presencia de los nutrientes disponibles para la planta y aumentar el rendimiento de la planta o el rendimiento de la semilla.

[0026] En una realización ilustrativa, la invención es una composición de materia que comprende: una combinación de fitato y una multitud de microorganismos que comprenden un hongo de *Trichoderma virens* u otro hongo solubilizante de calcio o un componente de calcio soluble, una bacteria de *Bacillus amyloliquefaciens* u otra bacteria que produce enzima fitasa o una enzima fitasa, y un hongo micorrizal o una multitud de hongos micorrizales que se colocan en la vecindad de una raíz vegetal de manera que permite que dicha multitud de microorganismos en la composición de materia colonice dicha raíz de la planta.

[0027] En otra realización ilustrativa, la invención es un método para aumentar el rendimiento de la planta que comprende: colocar una combinación de fitato y una multitud de microorganismos que comprenden un hongo de *Trichoderma virens* u otro hongo solubilizante de calcio o un componente de calcio soluble, una bacteria de *Bacillus amyloliquefaciens* u otra bacteria que produce enzima fitasa o una enzima fitasa y un hongo micorrizal o una multitud de hongos micorrizales en la vecindad de una raíz vegetal de manera que permita que dichos microorganismos colonicen dicha raíz vegetal. Preferiblemente, dicha composición se coloca en la proximidad de dicha raíz vegetal mediante la aplicación a una semilla preplantada, mediante aplicaciones en los surcos a medida que se siembra una semilla, o a voleo sobre una fila de semillas.

[0028] En otra realización preferida, la invención es un método para mejorar la agregación y la calidad de la tierra colocando un hongo de *Trichoderma virens*, una bacteria de *Bacillus amyloliquefaciens* u otra bacteria que produzca una enzima fitasa, y un hongo micorrizal o una multitud de hongos micorrizales en la proximidad de una raíz vegetal de manera que permita que dichos microorganismos colonicen dicha raíz vegetal.

[0029] En otra realización ilustrativa, la invención es una composición de materia que comprende: aproximadamente 30 000 propágulos de micorrizas en aproximadamente cinco galones de agua; aproximadamente un galón de una solución acuosa de aproximadamente un 15 a aproximadamente un 40 por ciento de un fitato; de aproximadamente 6,75E8 a aproximadamente 4,20E9 unidades formadoras de colonias de *Trichoderma virens*; y de aproximadamente 1,35E10 a aproximadamente 8,40E10 unidades formadoras de colonias de *Bacillus amyloliquefaciens*.

[0030] En otra realización ilustrativa, la invención es una composición de materia que comprende: una combinación de un fitato y una multitud de microorganismos que comprenden un hongo de *Trichoderma virens* u otro hongo solubilizante de calcio, una bacteria de *Bacillus amyloliquefaciens* u otra bacteria que produce una enzima fitasa, y un hongo micorrizal o una multitud de hongos micorrizales; donde dicha combinación está operativa para permitir que dicha multitud de microorganismos colonice una raíz vegetal cuando dicha combinación se coloca en la proximidad de dicha raíz vegetal.

[0031] En otra realización ilustrativa más, la invención es una composición de materia que comprende: un fitato o ácido fítico; medios para producir calcio soluble, o calcio soluble; y medios para producir enzima fitasa, o una enzima fitasa.

[0032] En otra realización ilustrativa, la invención es una composición de materia que comprende: una multitud de nutrientes que comprenden un fósforo orgánico (por ejemplo, un fitato o ácido fítico), combinado con una multitud de hongos y una multitud de bacterias en presencia de una semilla, una planta o una raíz.

[0033] En otra realización ilustrativa, la invención es una composición de materia que comprende: un componente de *Trichoderma virens*; un componente de *Bacillus amyloliquefaciens*; un hongo micorrizal o un componente de hongos micorrizales; y un componente de fitato o ácido fítico.

[0034] En otra realización ilustrativa más, la invención es un método que comprende: producir una mezcla que está compuesta por un componente nutriente, un componente fúngico y un componente bacteriano que esté operativo para producir una sinergia entre los componentes; aplicar dicha mezcla a una semilla, o aplicar dicha mezcla en un medio de crecimiento en contacto con dicha semilla o cerca de dicha semilla, o en una mezcla de tierra en donde dicho componente fúngico y dicho componente bacteriano reducen dicho componente nutriente a una forma disponible para la planta; permitiendo que un hongo micorrizal colonice una raíz producida por dicha semilla en presencia de dicha forma disponible para plantas y aumentando el rendimiento de la planta o el rendimiento de la semilla.

[0035] En otra realización ilustrativa, la invención es un método para aumentar el rendimiento de la planta que comprende: colocar una combinación de fitato y una multitud de microorganismos que comprenden un hongo de *Trichoderma virens* u otro componente fúngico solubilizante del calcio, una bacteria de *Bacillus amyloliquefaciens* u otro componente bacteriano productor de enzima fitasa bacteriana y un hongo micorrizal o una multitud de hongos micorrizales en la vecindad de una raíz vegetal de manera que permita que dichos microorganismos colonicen dicha raíz vegetal. En otra realización, el método comprende además: aplicar dicho hongo de *Trichoderma virens* u otro componente fúngico solubilizante de calcio en una concentración que varía de aproximadamente 1,0E7 a aproximadamente 1,0E11 unidades formadoras de colonias por gramo (ufc/g) o unidades formadora de colonias por mililitro (ufc/ml) de *Trichoderma virens* G1-3 viable o esporas de la cepa G1-21 de *Trichoderma virens* por gramo de dicho hongo de *Trichoderma virens* u otro componente fúngico solubilizante del calcio y a una tasa de aplicación de aproximadamente 1,35 g por acre o 1,35 ml por acre. En otra realización, el método comprende además: aplicar dicha bacteria de *Bacillus amyloliquefaciens* u otro componente bacteriano productor de enzima fitasa en una concentración que varía de aproximadamente 1E7 a aproximadamente 5E11 ufc/g o ufc/ml de la cepa viable BAA-3 de *Bacillus amyloliquefaciens* o esporas de la cepa FZB24 de *Bacillus amyloliquefaciens* por gramo de bacteria de *Bacillus amyloliquefaciens* u otro componente bacteriano productor de enzima fitasa y a una tasa de aplicación de aproximadamente 1,35 g o 1,35 ml por acre. En otra realización, dicha combinación se coloca en la proximidad de dicha raíz vegetal mediante la aplicación a una semilla preplantada, mediante aplicación en los surcos a medida que se siembra una semilla, o a voleo sobre una fila de semillas.

[0036] En otra realización ilustrativa, la invención es un método para mejorar la agregación y la calidad de la tierra que comprende: colocar un hongo de *Trichoderma virens* u otro hongo solubilizante de calcio, una bacteria de *Bacillus amyloliquefaciens* u otra bacteria que produce una enzima fitasa, y un hongo micorrizal o una multitud de hongos micorrizales en la vecindad de una raíz vegetal de una manera que permita que dichos hongos y bacterias colonicen dicha raíz vegetal.

[0037] En otra realización ilustrativa, la invención es un método para aumentar el rendimiento de una planta, que comprende: usar una enzima fitasa para reducir el fitato y liberar fácilmente fósforo disponible en la planta en una rizosfera en la que dicha planta está creciendo; y producir una molécula de señal que facilita la germinación de un hongo micorrizal y la posterior colonización de las raíces de la planta por dicho hongo micorrizal. En otra

realización, dicha molécula de señal es mio-inositol trifosfato. En otra realización, el método comprende, además: usar una bacteria de *Bacillus amyloliquefaciens* para producir dicha enzima fitasa en dicha rizosfera. En otra realización, el método comprende, además: usar un microorganismo para producir dicha enzima fitasa. En otra realización, dicha germinación y colonización de la raíz se producen en un entorno alto en fósforo creado al aplicar un fertilizante que comprende fósforo a dicha rizosfera. En otra realización, el método comprende, además: usar un hongo de *Trichoderma* para producir una enzima fosfatasa que está operativa para romper los enlaces en el fosfato tricálcico y liberar iones de calcio. En otra realización, el hongo de *Trichoderma* es *Trichoderma virens* GI-3.

[0038] En otra realización ilustrativa, la invención es un método para aumentar el rendimiento de un cultivo, que comprende: aplicar una composición de materia que comprende los siguientes componentes a cada acre de tierra de cultivo: aproximadamente un cuarto de una solución de fitato del 40 por ciento (en peso); de aproximadamente un galón a 5 galones de agua o agua más un fertilizante NPK estándar; aproximadamente 1,35 g de una composición de esporas de *B. amyloliquefaciens* TJ1000 (a una concentración de aproximadamente 1×10^{10} ufc/g); aproximadamente de 1,35 g de una composición de esporas de *T. virens* GI-3 (a una concentración de aproximadamente $5,0 \times 10^8$ ufc/g); y aproximadamente 0,136 g de una composición de propágulos de micorrizas (a una concentración de aproximadamente 220 000 propágulos/g). En otra realización, el método comprende, además: mezclar la composición de la materia en un tanque aplicador de fertilizantes; y aplicarla a la tierra de cultivo en un surco o una banda muy cerca de un surco de semillas o una raíz vegetal.

[0039] En otra realización ilustrativa, la invención es un método para aumentar el rendimiento de un cultivo, que comprende: aplicar una composición de materia a cada acre de tierra de cultivo; donde dicha composición de materia comprende: aproximadamente 30 000 propágulos de micorrizas en aproximadamente cinco galones de agua, aproximadamente un galón de una solución acuosa de aproximadamente el 15 a aproximadamente el 40 por ciento de un fitato, de aproximadamente $6,75 \times 10^8$ a aproximadamente $4,20 \times 10^9$ unidades formadoras de colonias de *Trichoderma virens* y aproximadamente $1,35 \times 10^{10}$ a aproximadamente $8,40 \times 10^{10}$ unidades formadoras de colonias de *Bacillus amyloliquefaciens*.

[0040] Aspectos adicionales de la invención se harán evidentes a partir de la consideración de los dibujos y la descripción subsiguiente de realizaciones ejemplares de la invención. Un experto en la técnica se dará cuenta de que son posibles otras realizaciones de la invención y que los detalles de la invención pueden modificarse en varios aspectos, todos sin apartarse del concepto. Por lo tanto, los siguientes dibujos y descripciones deben considerarse de naturaleza ilustrativa y no restrictiva.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS VARIAS VISTAS DE LOS DIBUJOS

[0041] Las características de la invención se comprenderán mejor haciendo referencia a los dibujos adjuntos que ilustran realizaciones ejemplares de la invención. En los dibujos:

La Fig. 1 es una tabla que presenta datos de rendimiento de una prueba de campo de una realización ilustrativa de la invención que se realizó cerca de Watertown, SD en 2011. El cultivo del ensayo fue un maíz híbrido de madurez relativa 95. En la Fig. 1, CHK significa control y representa el control no tratado dentro de la prueba, Mico significa hongos micorrizales, ES significa aplicación en surcos, T.V significa *Trichoderma virens*, B.A. significa *Bacillus amyloliquefaciens*, LSD significa diferencia menos significativa y CV significa coeficiente de variación. En las notas a pie de página, "a" indica que el valor correspondiente es significativamente diferente de cualquier otro valor que no contenga la letra "a"; "ab" indica que el valor correspondiente es significativamente diferente de cualquier otro valor que no contenga las letras "ab"; "bcd" indica que el valor correspondiente es significativamente diferente de cualquier otro valor que no contenga las letras "bcd"; "cd" indica que el valor correspondiente es significativamente diferente de cualquier otro valor que no contenga las letras "cd"; "ef" indica que el valor correspondiente es significativamente diferente de cualquier otro valor que no contenga las letras "ef"; "f" indica que el valor correspondiente es significativamente diferente de cualquier otro valor que no contenga la letra "f"; "cde" indica que el valor correspondiente es significativamente diferente de cualquier otro valor que no contenga las letras "cde"; "g" indica que el valor correspondiente es significativamente diferente de cualquier otro valor que no contenga la letra "g".

La Fig. 2 es una tabla que muestra los datos de exploración de raíz de un ensayo de maíz realizado en un cuarto de cultivo. En las notas a pie de página, "a" indica que el valor correspondiente es significativamente diferente de cualquier otro valor que no contenga la letra "a"; "ab" indica que el valor correspondiente es significativamente diferente de cualquier otro valor que no contenga las letras "ab"; "b" indica que el valor correspondiente es significativamente diferente de cualquier otro valor que no contenga la letra "b"; "c" indica que el valor correspondiente es significativamente diferente de cualquier otro valor que no contenga las letras "c".

La Fig. 3 es un diagrama esquemático que ilustra la producción de *Bacillus amyloliquefaciens* de la enzima fitasa y reacción de fitasa en fitato (IP6) y la posterior degradación en 3 moles de fósforo inorgánico y el componente de señal mio-Inositol trifosfato (IP3).

La Fig. 4 es una fotografía producida tiñendo con azul de tripán una raíz de maíz que incorpora una

realización de la invención.

La Fig. 5 es una fotografía de raíces de una planta de maíz de control (a la izquierda) y una planta de maíz tratada con una realización ilustrativa de la invención (a la derecha), respectivamente.

La Fig. 6 es una fotografía que muestra la estructura de hifas micorrizales colonizando dentro de una raíz de una planta tratada con una realización ilustrativa de la invención.

La Fig. 7 es un gráfico que presenta los datos que se recogieron en Carmi, IL con tratamientos sobre maíz híbrido durante la temporada de cultivo de 2012.

La Fig. 8 es un gráfico que muestra la interacción de los componentes de una realización ilustrativa de la invención.

La Fig. 9 es un gráfico que presenta los datos que se recogieron en Ashkum, IL con tratamientos sobre maíz híbrido durante la temporada de cultivo de 2012.

La Fig. 10 es otro gráfico que muestra la interacción de los componentes de una realización ilustrativa de la invención.

La Fig. 11 es un gráfico que presenta los datos que se recogieron en Olivia, MN con tratamientos sobre maíz híbrido durante la temporada de cultivo de 2012.

La Fig. 12 es otro gráfico que muestra la interacción de los componentes de una realización ilustrativa de la invención.

La Fig. 13 es un gráfico que presenta los datos de rendimiento de las semillas de soja que se cultivaron en un ensayo de campo en la Irrigation Research Foundation, Yuma, CO en la temporada de cultivo de 2012.

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

[0042] En una realización ilustrativa, la invención comprende cuatro componentes: un componente de *Trichoderma virens*, un componente de *Bacillus amyloliquefaciens*, un componente de hongos micorrizales y un componente de fitato o ácido fítico.

[0043] Una realización actualmente preferida de la invención se refiere a una composición que comprende lo siguiente:

de $6,75E8 \pm 6,75E6$ a $4,20E9 \pm 4,20E7$ unidades formadoras de colonias de una *Trichoderma virens*, de $1,35E10 \pm 1,35E8$ a $8,40E10 \pm 8,40E8$ unidades formadoras de colonias de un *Bacillus amyloliquefaciens*, 30 000 propágulos de una micorriza en $18,93 \pm 0,1893$ litros de agua ; y una solución acuosa del 15 al 40 por ciento de un fitato o ácido fítico en $3,78 \pm 0,0378$ litros de agua.

[0044] En una realización ilustrativa de la invención, el componente de *Trichoderma virens* (por ejemplo, una composición que comprende *Trichoderma virens* GI-3) se cultiva usando técnicas de sustrato sólido. El cultivo de hongos se realiza primero usando fermentación líquida de cultivo sumergido. El cultivo se evalúa respecto a los contaminantes mediante el hemocitómetro y la dilución en serie en agar papa dextrosa (APD) y luego se incuba a 20 grados centígrados (C) durante 48 horas y en agar de soja tríptico (AST) y luego se incuba a 37 grados C durante 24 y 48 horas para verificar contaminantes en el cultivo. El cultivo líquido puro se rocía uniformemente sobre lechos de fermentación que contienen un sustrato sólido (por ejemplo, cebada, cáscaras de arroz, salvado de trigo o un sustrato nutriente orgánico, tal como pulpa de papel suplementada con fuentes de nutrientes inorgánicos). Se agrega penicilina en esta etapa para asegurar que no haya contaminantes bacterianos presentes. Después de la incubación en los lechos de fermentación, el cultivo se evalúa para determinar los contaminantes usando los métodos descritos anteriormente, y una vez que se determina que el cultivo no tiene contaminantes, se seca hasta el 15 por ciento de humedad en peso. Luego, las esporas se separan del sustrato usando separadores vibratorios y se evalúan para determinar la concentración y la contaminación del título usando dilución en serie cultivada en APD y AST, así como recuentos hemacitométricos. El cultivo se estandariza usando dextrosa hasta 1×10^9 unidades formadoras de colonias por gramo (ufc/g) y la concentración del título final y se realiza la evaluación de contaminantes usando dilución en serie en APD para confirmar la integridad del producto.

[0045] El componente de *Trichoderma virens* (por ejemplo, *Trichoderma virens* G1-3) de la invención tiene una concentración de aplicación preferida de $5E8$ ufc/g (si se trata de una suspensión líquida, ufc/ml) y se aplica preferiblemente a 1,35 g (1,35 ml) por acre. Un rango de concentración aceptable es de $1,0E7$ a $1,0E11$ ufc/g de esporas viables *Trichoderma virens* GI-3 por gramo de componente de *Trichoderma virens*. En una realización ilustrativa, el porcentaje en peso de este componente puede variar entre un 1 por ciento y un 99 por ciento del peso total de las esporas *Trichoderma virens* y las esporas de *Bacillus amyloliquefaciens*.

[0046] Una realización ilustrativa de la invención comprende el aislado G1-3 (ATCC 58678) del hongo de *Trichoderma virens* u otros aislados. Estos microorganismos se pueden obtener de la American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110 y otras colecciones de cultivos o aisladas de la naturaleza.

[0047] Otra realización ilustrativa de la invención comprende el aislado GI-21 de *Trichoderma* (*Gliocladium*) *virens* que es comercializado bajo la marca registrada SoilGuard® 12G por Certis USA L.L.C., 9145 Guilford Road, Suite 175, Columbia, MD 21046.

[0048] Además de la cepa GI-3 de *Trichoderma virens* y la cepa GI-21 *Trichoderma virens*, otras cepas que pueden usarse para hacer esta invención incluyen las siguientes: *Trichoderma virens* T-1 (ATCC 9645), *Trichoderma virens* NCTC 7057 (ATCC 11043), *Trichoderma virens* NCTC 7056 (ATCC 10044), *Trichoderma virens* NCTC 7055 (ATCC 10045), *Trichoderma virens* 167 (ATCC 13213), *Trichoderma virens* UCLA 230 (ATCC 13362), *Trichoderma virens* 031 (ATCC 20903), *Trichoderma virens* 035 (ATCC 20904), *Trichoderma virens* 035 (ATCC 20904), *Trichoderma virens* 41 (ATCC 20906), *Trichoderma virens* ANA 215 (ATCC 24290), *Trichoderma virens* IFO 8349 (ATCC 44734), *Trichoderma virens* NRRL 1828 (ATCC 44734), *Trichoderma virens* ATCC 48179, *Trichoderma virens* GV-P (ATCC 52045), *Trichoderma virens* 290-4 (ATCC 52199), *Trichoderma virens* s GI-17 (ATCC 58676), *Trichoderma virens* GI-9 (ATCC 58677), *Trichoderma virens* TUB F-109 (ATCC 62399), *Trichoderma virens* PREM 47610 (ATCC 64271), *Trichoderma virens* MF5783 (ATCC 74180), *Trichoderma virens* ATCC 204067, *Trichoderma virens* s IBT 7706 (ATCC 20443), *Trichoderma virens* IBT 9354 (ATCC 20444), *Trichoderma virens* s IBT 9355 (ATCC 204445), *Trichoderma virens* G-4 (MYA-297), *Trichoderma virens* G-6 (MYA-298) y *Trichoderma virens* GJS 95-194 (MYA-1298).

[0049] Debido a que *Trichoderma virens* está extendido en el ambiente de tierra, las nuevas cepas pueden aislarse en el futuro y usarse en otras realizaciones de la invención. *Trichoderma virens* puede aislarse muestreando la tierra o el tejido vegetal y utilizando diluciones en serie para poner las muestras en placas de ADP con penicilina (para reducir la contaminación bacteriana). Las colonias se aíslan luego adicionalmente. La confirmación de identidad se realiza a través de la secuenciación del ADN. Otras especies de *Trichoderma* que tienen características similares a *T. virens* y que se puede usar en la invención incluyen *T. viride*, *T. harzanium*, *T. asperellum* y *T. gamsii* y otros. Además, dado que el ion de calcio es vital para la estabilización de la fitasa de *B. amyloliquefaciens*, una realización alternativa implica agregar un componente de calcio soluble u otro hongo solubilizante de calcio a la tierra. Alternativamente, se puede usar cualquier hongo que libere calcio libre a través de un nuevo proceso enzimático que no requiera la acidificación de la molécula de calcio. Los hongos solubilizantes de calcio se pueden obtener a través de colecciones de cultivo (es decir, ATCC; NRRL). Las especies conocidas como solubilizantes de fosfato tricálcico incluyen *T. vixens*, *T. viride* y *T. harzanium*. Se puede obtener una forma soluble de calcio a partir de una cantidad de distribuidores de fertilizantes agrícolas en formas tales como sulfato de calcio o EDTA de calcio. Además, el calcio granular (99,0 %) se puede obtener de proveedores de productos químicos, incluyendo Sigma-Aldrich.

[0050] En una realización ilustrativa de la invención, el componente de *Bacillus amyloliquefaciens* (por ejemplo, *Bacillus amyloliquefaciens* TJ-1000) se cultiva usando fermentación líquida de cultivo sumergido. Los cultivos se someten a control de calidad respecto a la contaminación mediante dilución en serie hasta 10E12 y se cultivan en placas ADP y AST. Las placas se incuban a 37 grados C y se evalúa la contaminación a las 24 y 48 horas. Si la inspección de la placa no revela ninguna contaminación, el cultivo se concentra entonces para eliminar la mayor parte de los medios de fermentación usados. Los gránulos restantes se liofilizan. Después de la liofilización, la concentración del título se determina suspendiendo 10 gramos de polvo de esporas liofilizado en 90 ml de agua estéril que contiene un surfactante. La dilución en serie se usa para determinar la concentración del título de las esporas viables y para verificar la contaminación. El cultivo se mezcla luego con dextrosa para estandarizar el polvo de esporas a 1,0E11 ufc/g.

[0051] Una tasa de aplicación preferida para el componente de *Bacillus amyloliquefaciens* es una tasa de aplicación sólida de 1,35 g por acre a una concentración de 1E10 ufc/g de *Bacillus amyloliquefaciens* o una tasa de aplicación líquida de 1,35 ml por acre a una concentración de 1E10 ufc/ml. El rango de concentración puede variar de 1E7 ufc/g a 5E11 ufc/g. En una realización ilustrativa, el porcentaje en peso de este componente varía de un 1 por ciento a un 99 por ciento del peso total de las esporas de *Trichoderma virens* y las esporas de *Bacillus amyloliquefaciens*.

[0052] Una realización ilustrativa adicional de la invención comprende la bacteria de *Bacillus amyloliquefaciens* TJ1000 o 1BE. Este microorganismo fue depositado en el ATCC el 31 de octubre de 2001 y se le asignó el número de acceso ATCC BAA-390. Las realizaciones alternativas de la invención comprenden otras cepas de *Bacillus amyloliquefaciens* que pueden aislarse de la naturaleza u obtenerse de la ATCC u otras colecciones de cultivo.

[0053] Otra realización ilustrativa de la invención comprende la cepa FZB24 de *Bacillus amyloliquefaciens* que es comercializada bajo la marca registrada Taegro® por Earth Bioscience, Inc., 26 Sherman Court, PO Box 764, Fairfield, CT 06430.

[0054] Otras cepas de *Bacillus amyloliquefaciens* que se pueden usar para hacer la invención incluyen *B. amyloliquefaciens* B-543 (NRRL), *B. amyloliquefaciens* B-644 (NRRL), *B. amyloliquefaciens* B-645 (NRRL), *B. amyloliquefaciens* B-942 (NRRL), *B. amyloliquefaciens* NRS-763 (NRRL), *B. amyloliquefaciens* IFO 15535 (ATCC 23350), *B. amyloliquefaciens* T (ATCC 23842), *B. amyloliquefaciens* SB-1 (ATCC 23844), *B. amyloliquefaciens* P (ATCC 23844), *B. amyloliquefaciens* N (ATCC 23845), *B. amyloliquefaciens* K49 (ATCC 27505), *B. amyloliquefaciens* RUB 500H (ATCC 31592), *B. amyloliquefaciens* RUB 500 (ATCC 49763), *B. amyloliquefaciens* H (ATCC 53495) y *B. amyloliquefaciens* 3002 (ATCC 700385).

[0055] *B. amyloliquefaciens* es una bacteria de origen natural de tierra/plantas y las futuras cepas pueden aislarse o volverse a designar como *B. amyloliquefaciens* y usarse para hacer la invención. Las *B. amyloliquefaciens* pueden obtenerse de la tierra, el tejido vegetal y el ensilado y aislarse utilizando diluciones en serie, y pueden clasificarse mediante secuenciación de ADN (16S RNA).

[0056] Además, en una realización alternativa, el gen *phyC* que produce la enzima fitasa estable dependiente de calcio puede ser producido por otra bacteria que está genéticamente diseñada para producir la enzima, por ejemplo, ver patente EE. UU. N° 7.339.091 Por esta razón, el solicitante cree que cualquier bacteria que exprese el gen *phyC* puede usarse en la invención para estimular la colonización micorrizal. La transferencia de un gen a otro organismo se puede lograr purificando el ADN de un *Bacillus amyloliquefaciens*, diseñando cebadores correspondientes a la secuencia del gen *phyC* y amplificando la secuencia a través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los fragmentos amplificados pueden luego purificarse y transferirse a otro organismo mediante el uso de un vector de clonación. La confirmación de que el gen se ha insertado mediante amplificación por PCR se puede lograr mediante hibridación utilizando los cebadores usados para la amplificación inicial por PCR. Se puede obtener una bacteria que produce una enzima fitasa a través de colecciones de cultivo (es decir, ATTC, NRRL). Las especies conocidas como productores de fitasa incluyen *B. amyloliquefaciens* y *B. subtilis*. También se puede obtener una enzima fitasa a través de proveedores químicos comerciales como Sigma-Aldrich. Además, muchas enzimas fitasa se utilizan como aditivos en piensos para cerdos y pollos. Una de estas enzimas fitasa es Ronozyme®, un producto de DSM.

[0057] En otra realización alternativa, la *B. amyloliquefaciens* se cultiva en un caldo y la fitasa producida se combina con micorrizas, *T. virens* y fitato, produciendo de ese modo una combinación que tiene el mismo efecto que la incorporación de una bacteria de *Bacillus amyloliquefaciens* en la invención. Para la producción de la enzima fitasa, se suplementa un medio de crecimiento simple (por ejemplo, un medio de glucosa) con fitato y calcio. Una *B. amyloliquefaciens* o un organismo genéticamente modificado que contiene el gen *phyC* se inocula en los medios de cultivo. La enzima fitasa se produce en cantidades adecuadas debido a la disponibilidad de fitato y calcio. Las células vegetativas se eliminan de los medios a través de un proceso de centrifugación y los medios de crecimiento de fitasa se usan para producir una realización ilustrativa de la invención.

[0058] El componente de hongos micorrizales de la invención se puede cultivar a través de los siguientes pasos. Las semillas de maíz se esterilizan superficialmente (se pueden usar la mayoría de las semillas de cultivo, pero los cultivos de raíces fibrosas tienden a producir más ramificaciones hifales) y se pregerminan en papel de germinación. Se esteriliza un medio bajo en fósforo para plantas de maíz en crecimiento y se obtienen inóculos de propágulos de *G. intraradices*, *G. etunicatum*, *G. aggregatum* y *G. mossae* de una colección de cultivos. En esta realización, se preparan cuatro lotes de medio separados que contienen una parte por volumen de inóculos micorrizales hasta 20 partes por volumen de medio de cultivo (un lote por cada especie de *Glomus*). Los medios inoculados se agregan a tarros de 6-10 pulgadas. Se plantan cuatro a seis plántulas de maíz por tarro y se dejan crecer durante 14-16 semanas. Las plantas se riegan diariamente y se fertilizan cada semana con un fertilizante de bajo contenido de fósforo.

[0059] Las plantas se recolectan eliminando las raíces de las macetas y cortándolas en pequeños fragmentos de 1 cm a 2 cm de longitud. Los fragmentos de raíz de las cuatro especies de *Glomus* se mezclan preferiblemente entre sí y se usan como el componente de hongos micorrizales de la invención. La tasa de aplicación preferida de las cuatro especies de *Glomus* es de 30 000 propágulos totales por acre (o 0,136 g a 220 000 propágulos/gramo). El intervalo de propágulos por gramo puede variar de 50 propágulos a 220 000 propágulos por gramo. Este componente comprende preferiblemente de un uno por ciento a un 99 por ciento del peso de los otros componentes biológicos de la invención.

[0060] Otra realización ilustrativa de la invención comprende un componente de hongos micorrizales que es comercializado bajo la marca comercial MycoApply® por Mycorrhizal Applications Inc., 810 NW E St., Grants Pass, OR 97526.

[0061] Además de *Glomus intraradices*, *Glomus etunicatum*, *Glomus aggregatum*, y *Glomus mossae*, se pueden usar otras especies de *Glomus* para preparar el componente de hongos micorrizales de la invención, que incluyen las siguientes: *G. albidum*, *G. caledonium*, *C. claroideum*, *G. clarum*, *G. clavispora*, *G. constrictum*, *G. coronatum*, *G. deserticola*, *G. diaphanum*, *G. eburneum*, *G. fragilistratum*, *G. gerosporum*, *G. Globiferum*, *G. hadleyi*, *G. hyalinum*, *G. insculum*, *G. lamellosum*, *G. luteum*, *G. macrocarpum*, *G. manihot*, *G. microaggregatum*, *G. mirificum*, *G. monosporum*, *G. pustulatum*, *G. sinuosum*, *G. spurucum*, *G. tortuosum*, *G. verruculosum*, *G. versiforme* y *G. viscosum* (disponibles en INVAM-West Virginia University). Las siguientes especies endomicorrizales también se pueden usar para preparar el componente de hongos micorrizales de la invención: *Ambisporaceae* spp.; *Archaeosporaceae* spp. [*Ar. leptoticha*, *Ar. gerdemannii* y *A. trappei* (disponibles en INVAM-West Virginia University)] *Geosiphonaceae* spp., *Acaulosporaceae* spp. [*A. colossica*, *A. delicata*, *A. denticulate*, *A. foveata*, *A. koskei*, *A. lacunosa*, *A. laevis*, *A. longula*, *A. mellea*, *A. morrowiae*, *A. rehmi*, *A. scrobiculata*, *A. spinosay*, *A. tuberculata* (disponibles en INVAM-West Virginia University)]; *Enterophosporaceae* spp. (*E. colombiana*, *E. contigua*, *E. infrequens*, *E. kentnesis*), *Dicersisporaceae* spp., *Gigasporaceae* spp. [incluyendo

Gi. Albida, *Gi. decipiens*, *Gi. gigantea*, *Gi margarita* y *Gi. rosea*) (disponibles en INVAM, Universidad de Virginia Occidental)]; *Paraglomus spp.* (*P. brasilianum* y *P. occultum* (disponibles en INVAM-West Virginia University)); y *Scutellospora spp.* (*S. calospora*, *S. cerradensis*, *S. coralloidea*, *S. dipurpurascens*, *S. eritropa*, *S. fulgida*, *S. gregaria*, *S. heterogama*, *S. pellucida*, *S. persica*, *S. reticulada*, *S. rubra*, *S. scutata* y *S. verrucosa* (disponibles en INVAM-West Virginia University)). Los hongos micorrizales arbusculares son hongos de tierra que se producen de forma natural, y pueden descubrirse nuevas cepas y especies en el futuro y usarse para fabricar la invención.

[0062] Otra realización ilustrativa de la invención comprende un componente de fitato o ácido fítico que se puede obtener de Northwest Scientific, Inc., PO Box 1811 Billings, MT 59103. La tasa de aplicación preferida de fitato es de un cuarto por acre de una solución de fitato al 40 por ciento. Debido a que las altas cantidades de fitato no inhiben el crecimiento de las micorrizas o de las plantas, se pueden usar mayores tasas de aplicación. La concentración de fitato en la solución puede variar de un uno por ciento a un 99 por ciento en peso de fitato como un porcentaje del peso de la solución o química de fertilizante estándar, por ejemplo, una solución que contiene 9-18-9 o 10-34-0 Nitrógeno (N) - Fósforo (P) - Potasio (K). Por lo tanto, se puede usar agua o una solución que tenga una química de fertilizante estándar, es decir, 10N-34P-0K como el líquido de suministro para la composición de fitato/biológica. El fitato es generalmente un subproducto del procesamiento de cultivos agrícolas o un subproducto de las instalaciones de tratamiento de estiércol/biorreactor. Por lo tanto, el fitato/ácido fítico se puede obtener a partir de maíz, soja, trigo, arroz, estiércol, etc.

[0063] En una realización ilustrativa, la invención es una composición de materia que comprende: una combinación de fitato y una multitud de microorganismos que comprenden un hongo de *Trichoderma virens*, una bacteria de *Bacillus amyloliquefaciens* y un hongo micorrizal o una pluralidad de hongos micorrizales micorrizas que se colocan en la proximidad de una raíz vegetal de manera que permite que dicha multitud de microorganismos en la composición de la materia colonice dicha raíz vegetal.

[0064] En otra realización, la invención es un método para aumentar el rendimiento de la planta que comprende: colocar una combinación de fitato y una multitud de microorganismos que comprenden un hongo de *Trichoderma virens*, una bacteria de *Bacillus amyloliquefaciens* y una multitud de hongos micorrizales en la vecindad de una raíz vegetal de manera que permita a dichos microorganismos colonizar dicha raíz vegetal. En otra realización, dicha composición se coloca en la proximidad de dicha raíz vegetal mediante la aplicación a una semilla preplantada, mediante aplicación en los surcos a medida que se siembra una semilla, o a voleo sobre una fila de semillas.

[0065] En una realización ilustrativa, la invención es un método que comprende aplicar la siguiente composición de materia a cada acre de tierra de cultivo: aproximadamente un cuarto de una solución de fitato de aproximadamente un 40 por ciento (en peso); de aproximadamente un galón a cinco galones de agua o agua más un fertilizante NPK estándar; 1,35 g de una composición de esporas TJ1000 de *B. amyloliquefaciens* (a una concentración de aproximadamente 1E10 ufc/g); 1,35 g de una composición de esporas GI-3 de *T. virens* (a una concentración de aproximadamente 5,0E8 ufc/g); y 0,136 g de una composición de propágulos de micorrizas (a una concentración de aproximadamente 220 000 propágulos/g). Los componentes biológicos se mezclan preferiblemente en un tanque aplicador de fertilizante y se aplican en el surco o se colocan en bandas en las proximidades del surco o raíz vegetal.

[0066] Con respecto al componente de *Bacillus amyloliquefaciens* de la invención, una formulación liofilizada seca preferida tiene un recuento de esporas de aproximadamente 1E10 ufc/g de esporas TJ1000 de *Bacillus amyloliquefaciens* y se aplica a una tasa preferida de 1,35 gramos de componente de *Bacillus amyloliquefaciens* por acre. Una tasa de aplicación de líquido preferida es de aproximadamente 1,35 ml de componente de *Bacillus amyloliquefaciens* por acre a una concentración de aproximadamente 1E10 ufc/ml de esporas TJ1000 de *Bacillus amyloliquefaciens*. Un rango de concentraciones aceptable para la formulación sólida es de aproximadamente 1E7 ufc/g a aproximadamente 5E11 ufc/g. En una realización preferida de la invención, el componente de *Bacillus amyloliquefaciens* comprende entre aproximadamente el uno por ciento y aproximadamente el 99 por ciento del peso combinado del componente de *Trichoderma virens* y el componente de *Bacillus amyloliquefaciens*. Estos valores también se usan con otras cepas de *Bacillus amyloliquefaciens*.

[0067] Con respecto al componente de *Trichoderma virens* de la invención, la tasa de aplicación preferida para este componente de la invención es de aproximadamente 1,35 gramos por acre a una concentración de aproximadamente 5E8 ufc/gramo, con un rango de concentración preferido de aproximadamente 1E7 ufc a aproximadamente 1E11 ufc de esporas GI-3 viables de *Trichoderma virens* por gramo de componente de *Trichoderma virens*. Este componente como porcentaje en peso puede variar entre aproximadamente un uno por ciento y aproximadamente un 99 del peso combinado del componente de *Trichoderma virens* y el componente de *Bacillus amyloliquefaciens*. Estos valores también pueden usarse con otras cepas de *Trichoderma virens*.

[0068] Con respecto al componente de hongos micorrizales de la invención, la tasa de aplicación preferida de las cuatro especies de *Glomus* es de aproximadamente 30 000 propágulos por acre (aproximadamente 0,136 gramos del componente de hongos micorrizales a una concentración de aproximadamente 220 000

propágulos/gramo). El rango de propágulos por gramo puede variar de aproximadamente 50 propágulos por gramo a aproximadamente 220 000 propágulos por gramo. Este componente comprende preferiblemente desde aproximadamente el uno por ciento hasta aproximadamente el 99 por ciento del peso combinado del componente de *Trichoderma virens* y el componente de *Bacillus amyloliquefaciens*.

[0069] Con respecto al componente de fitato de la invención, una tasa de aplicación preferida de fitato es de aproximadamente un cuarto por acre de una solución de fitato de aproximadamente el 40 por ciento. Debido a que las altas cantidades de fitato no inhiben el crecimiento de las micorrizas o las plantas, se puede usar una cantidad mayor. La concentración de la solución puede variar entre un uno por ciento y un 99 por ciento p/p de fitato/agua o una solución de fertilizante NPK. Las prácticas agrícolas convencionales han estado haciendo uso de iniciadores NPK o fertilizantes emergentes que se aplican con bandas o en surcos en el momento de la siembra. Los componentes de esta invención pueden aplicarse por sí mismos, o mezclados con agua o con fertilizantes NPK.

Ejemplos de trabajo

[0070] En los ejemplos de trabajo, las cuatro micorrizas son *Glomus aggregatum*, *Glomus etunicatum*, *Glomus intraradices* y *Glomus mossae*. La cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* es *Bacillus amyloliquefaciens* TJ-1000 y la cepa de *Trichoderma virens* es *Trichoderma virens* GI-3. Como ha señalado anteriormente, otras especies o cepas de micorrizas y otras cepas de *Trichoderma virens* y otras cepas de *Bacillus amyloliquefaciens* se pueden usar en la práctica de la invención.

[0071] En referencia a la Fig. 1, se presentan los resultados del ensayo de los campos de maíz de Dakota del Sur (SD). En esta prueba de campo, el maíz se plantó en dos bloques: un bloque sin fertilizante aplicado en la siembra y el otro bloque con 4 galones de un fertilizante líquido de fósforo estándar en la industria con un análisis de un 10 por ciento de nitrógeno y un 34 por ciento de fósforo. Los tratamientos dentro de los bloques fueron idénticos y son los siguientes:

Tratamiento 1 - CHK: Este fue el control no tratado que consistió en semillas de maíz que fueron tratadas con el tratamiento estándar de semillas con fungicidas/insecticidas de la industria. Este tratamiento de semillas fue consistente a lo largo de los otros tratamientos y bloques.

Tratamiento 2: Mico ES: este tratamiento fue una aplicación en el surco de propágulos de micorrizas aplicados a una velocidad de 30 000 propágulos por acre con 5 galones de agua por acre como portador.

Tratamiento 3 - Mico + T.V. + B.A.ES: este tratamiento fue una aplicación en el surco de propágulos de micorrizas aplicados a razón de 30 000 propágulos por acre más esporas de *Trichoderma virens* aplicadas a una tasa de 4,05E08 por acre y esporas de *Bacillus amyloliquefaciens* aplicadas a una tasa de 1,35E10 por acre.

Tratamiento 4 - Fitato ES: este tratamiento fue una aplicación en el surco de una solución de fitato al 15 por ciento aplicada a 1 galón por acre más 4 galones de agua para el portador en el bloque no iniciador o 4 galones de fertilizante líquido para el bloque 10-34-0.

Tratamiento 5 - Fitato + Mico ES: este tratamiento fue una aplicación en el surco de propágulos de micorrizas a una tasa de 30 000 propágulos por acre en una solución del 15 por ciento de fitato aplicado a razón de 1 galón por acre más 4 galones de agua para el portador en el bloque no iniciador o 4 galones de fertilizante líquido para el bloque 10-34-0.

Tratamiento 6 - Fitato + T.V. + B.A. ES: Este tratamiento fue una aplicación en el surco de una combinación de esporas de *Trichoderma virens* aplicado a una tasa de 4.05E08 por acre y *Bacillus amyloliquefaciens* aplicado a una tasa de 1,35E10 por acre en una solución de fitato al 15 por ciento a una tasa de 1 galón por acre más 4 galones de agua para el portador en el bloque no iniciador o 4 galones de fertilizante líquido para el bloque 10-34-0.

Tratamiento 7 - Fitato + Mico + T.V. + B.A. ES: Este tratamiento fue una aplicación en el surco de una combinación de propágulos de micorrizas a una tasa de 30 000 por acre más *Trichoderma virens* a una tasa de 4.05E08 por acre más *Bacillus amyloliquefaciens* aplicado a una tasa de 1,35E10 por acre en una solución de fitato al 15 por ciento a una tasa de 1 galón por acre más 4 galones de agua para un portador en el bloque no iniciador o 4 galones de fertilizante líquido para el bloque 10-34-0.

[0072] Conclusión del ensayo: la aplicación de propágulos de micorrizas por sí sola (Tratamiento 2) produjo un aumento significativo en el rendimiento en el bloque no iniciador, pero no produjo un rendimiento significativo en el entorno de fósforo alto en el bloque 10-34-0 por encima del CHK (Tratamiento 1). Esta fue una respuesta esperada, ya que se esperaba que las micorrizas experimentasen dificultades para producir una respuesta de rendimiento en un entorno con alto contenido en fósforo.

[0073] Cuando las micorrizas, *Trichoderma virens* y *Bacillus amyloliquefaciens* se aplicaron juntas (Tratamiento 3) o cuando se añadió fitato por sí mismo (Tratamiento 4) no hubo un aumento significativo en el rendimiento del Tratamiento 2 ni en el bloque no iniciador, ni en el 10-34-0.

[0074] El fitato más las micorrizas (Tratamiento 5) aumentó significativamente el rendimiento cuando se

comparó con las micorrizas solas (Tratamiento 2) en el bloque no iniciador, pero no tuvo un impacto significativo en el rendimiento del bloque 10-34-0 en ese ambiente alto en fósforo.

[0075] *Trichoderma virens* y *Bacillus amyloliquefaciens* más fitato (Tratamiento 6) aumentaron significativamente el rendimiento por encima del fitato solo (Tratamiento 4) en el bloque no iniciador, pero no aumentó el rendimiento en el bloque 10-34-0.

[0076] Las micorrizas, *Trichoderma virens*, *Bacillus amyloliquefaciens*, más fitato (Tratamiento 7) aumentaron significativamente el rendimiento por encima de todas las otras entradas de tratamiento (Tratamientos 1 a 6) tanto en el bloque no Iniciador como en el bloque 10-34-0 con el ambiente de alto contenido en fósforo. Este resultado fue, de hecho, un avance asombroso y una confirmación de que el Tratamiento 7 es a la vez novedoso y sorprendente.

[0077] En resumen, los datos de la Fig. 1 muestran que una composición de hongos micorrizales (Tratamiento 2) aplicada en el surco de la semilla aumentó el rendimiento en condiciones de bajo fósforo. Sin embargo, cuando se aplicó una composición de hongos micorrizales de la misma manera en condiciones de alto contenido de fósforo (es decir, con cuatro galones de un fertilizante 10-34-0) no hubo respuesta de rendimiento. Esta es una respuesta esperada.

[0078] Cuando se aplicó fitato con una combinación de hongos micorrizales más un hongo de *Trichoderma virens* más una bacteria de *Bacillus amyloliquefaciens* con fertilizante no iniciador (Tratamiento 7), el rendimiento del maíz se incrementó a niveles mayores que la aplicación de un fertilizante 10-34-0 por sí solo. Además, la misma combinación aumentó el rendimiento del maíz a niveles más altos incluso bajo condiciones de fósforo elevado y fue el único tratamiento que produjo una respuesta de rendimiento significativa con la aplicación de un fertilizante 10-34-0. Los dos resultados producidos por este tratamiento son sorprendentes. Es bien sabido que los hongos micorrizales son inhibidos de la germinación y colonización de las raíces de las plantas en ambientes de alto fósforo o en presencia de un fertilizante de fósforo aplicado, como un fertilizante 10-34-0.

[0079] El tratamiento 7 combinó un hongo de *Trichoderma virens* y una bacteria de *Bacillus amyloliquefaciens* con fitato (IP6) y una composición de hongos micorrizales para producir una composición que es sorprendentemente efectiva para aumentar el rendimiento del maíz. El hecho de que esta composición aumentara el rendimiento de manera más efectiva que un fertilizante 10-34-0 establece que el solicitante descubrió una solución largamente buscada para aumentar el rendimiento de la planta. La invención permite el reemplazo de un fertilizante químico estándar con uno que es microbiano en su modo de acción. El tratamiento 7 también proporcionó un mecanismo para establecer hongos micorrizales en las raíces de las plantas en presencia de fósforo.

[0080] Haciendo referencia a la Fig. 2, se presentan los resultados de un experimento de cuarto de cultivo de maíz. El maíz se sembró en conos de siembra Deepots™ en una mezcla de arena:tierra de 2: 1 y se repitió aleatoriamente dentro de las bandejas. Los tratamientos se colocaron 1 pulgada hacia el lado y 1 pulgada hacia abajo respecto de donde se plantaron las semillas. Las plantas se cultivaron bajo luces duales de sodio y halogenuros metálicos de alta presión de 1000 vatios con un ciclo de crecimiento de 12 horas de encendido/12 horas de apagado. Las plantas se regaron diariamente con el equivalente a 1 pulgada de agua. Las plantas de maíz se cosecharon 28 días después de la siembra.

Tratamiento 1: control: el tratamiento CHK fue el tratamiento con semilla de fungicida (FST) y el tratamiento con semilla de insecticida (IST) y este tratamiento de semilla fue consistente a lo largo del ensayo. El equivalente de 5 galones de agua se colocó 1 pulgada hacia un lado y 1 pulgada debajo de la semilla.

Tratamiento 2 - Fitato: el equivalente de fitato del 15 por ciento a razón de 1 galón por acre, y agua a razón de 4 galones por acre se colocaron 1 pulgada hacia un lado y 1 pulgada debajo de la semilla.

Tratamiento 3 - Fitato + T.V. + B.A. : El equivalente de esporas de *Trichoderma virens* a 4,05E08 por acre más esporas de *Bacillus amyloliquefaciens* a 1,35E10 por acre más fitato del 15 por ciento a razón de 1 galón por acre y agua a 4 galones por acre.

Tratamiento 3 - Fitato + T.V. + B.A. : El equivalente de esporas de *Trichoderma virens* a 4,05E08 por acre más esporas de *Bacillus amyloliquefaciens* a 1,35E10 por acre más fitato del 15 por ciento a razón de 1 galón por acre y agua a 4 galones por acre.

Tratamiento 4 - Fitato + Mico: el equivalente de propágulos de micorrizas a 30 000 por acre más fitato del 15 por ciento a razón de 1 galón por acre y agua a 4 galones por acre.

Tratamiento 5 - Fitato + Mico + T.V. + B.A. : El equivalente de propágulos de micorrizas a 30 000 por acre más esporas de *Trichoderma virens* a 4,05E8 por acre más esporas de *Bacillus amyloliquefaciens* a 1,35E10 por acre más de fitato del 15 por ciento a 1 galón por acre y agua a razón de 4 galones por acre.

[0081] La adición de fitato en solitario (Tratamiento 2) causó una propiedad antinutritiva, disminuyendo el crecimiento de las plantas. La adición de fitato + T.V. + B.A. (Tratamiento 3) y fitato + mico (Tratamiento 4) aumentaron el crecimiento de las plantas. Fitato + Mico + T.V. + B.A. (Tratamiento 5) produjo el mayor rendimiento para el crecimiento de las plantas, y esto proporciona evidencia de que la adición de fitato,

Trichoderma virens y *Bacillus amyloliquefaciens* puede acelerar la germinación y la colonización de propágulos de micorrizas por encima de un control y por encima de lo que las micorrizas pueden hacer por sí solas. Este ensayo es una confirmación adicional de los resultados de campo presentados en la Fig. 1.

[0082] En resumen, en el ensayo del cuarto de cultivo (Fig. 2), la altura de la planta, la masa de brote y la masa de la raíz del Tratamiento 5 fueron significativamente diferentes de las del tratamiento de control 1. El tratamiento 5 contiene todos los componentes (fitato, *T.virens*, *B.amyloliquefaciens* y hongos micorrizales) que producen sorprendentes resultados. Este ensayo repite la respuesta del ensayo de campo para corroborar aún más los sorprendentes resultados.

[0083] La Fig. 3 representa la reacción de la producción de *Bacillus amyloliquefaciens* de enzima fitasa y el impacto de la enzima fitasa en el fitato (IP6). Esta reacción da como resultado la liberación de 3 moles de fósforo inorgánico más mio-inositol trifosfato (IP3). Es probable que el mio-inositol trifosfato actúe como señal para promover la germinación y/o la colonización de las raíces por las micorrizas.

[0084] El uso de realizaciones ilustrativas de esta invención es ventajoso para el crecimiento de la mayoría de los cultivos de importancia agrícola. La agricultura convencional (aplicaciones de fertilizantes con alto contenido en fósforo, rotación de cultivos, sin cultivos en el suelo durante largos períodos de tiempo, fungicidas químicos / biológicos) reduce las poblaciones de micorrizas nativas. El aumento de la germinación y la colonización de los hongos micorrizales les permite a los agricultores reducir los costos de los insumos y obtener mayores rendimientos mediante la utilización de nutrientes ya presentes en el suelo mientras se mantiene la fertilización de nutrientes inorgánicos adecuada. Los hongos micorrizales arbusculares colonizan el 80 por ciento de las plantas, en su mayoría plantas verdes frondosas y plantas producidas comercialmente. Esta invención encuentra utilidad en el crecimiento de cultivos de importancia agrícola que incluyen alfalfa, cebada, judías (todos), maíz, algodón, mijo, arroz, sorgo, soja, girasol y trigo. Esta invención también es aplicable a una serie de otros cultivos de importancia comercial que incluyen, pero no se limitan a: acacia, agapanto, aliso, almendra, manzana, albaricoque, alcachofa, fresno, espárrago, álamo temblón, aguacate, bambú, plátano, albahaca, arándano, haya, begonia, cereza negra, mora, algarrobo, grama azul, saúco, boj, castaño de Indias, cacao, cactus, camelia, carisa, zanahoria, mandioca, ceanoto, cedro, apio, cereza, crisantemo, cítricos (todos), coco, café, árbol de coral, álamo, caupí, árbol del cangrejo, creosota, cryptomeria, pepino, grosella, ciprés, cornejo, berenjena, olmo, eucalipto, evónimo, helecho, festuca, higo, lino, flores (casi todos), forsitia, fucsia, gardenia, ajo, geranio, uva (todos), hierbas (perennes), fresno verde, guayule, goma, almizcle, espino, cáñamo, hierbas (todos), hibisco, acebo, hostas, impatiens, jatrofa, jojoba, enebro, kiwi, puerro, lechuga, ligustro, lirio, robinia, lichi, caoba, magnolia, mahonia, mango, arces (todos), caléndulas, mezquite, mimosa, dondiego de día, mora, mirto, capuchina, quingombó, olivo, cebolla, tejo del Pacífico, palmas (todos), hierba de pampa, maracuyá, papaya, chirimoya, guisantes, melocotones, cacahuètes, pera, pimientos (todos), pistacho, caqui, azahar de la China, ciruela, podocarpus, flor de Pascua, álamo, patata, calabaza, frambuesa, secuoya, arroz, rosa, caucho, ballico, artemisa, planta de sal, amelanchier, chalote, boca de dragón, acedera, calabacín, fruta de estrella, fresa, suculentas, pasto del Sudán, caña de azúcar, zumaque, goma dulce, batata, sicomoro, taxus, té, tabaco, tomate, violetas, ñame, yuca y sauce.

[0085] La mayoría de las sembradoras modernas tienen un tanque de aplicación de fertilizante/insecticida. En realizaciones ilustrativas de esta invención, la solución de fitato/microorganismos se mezcla con agua y/o fertilizante NPK y se aplica en una banda o en un surco. La solución también se puede repartir mediante la aplicación con un pulverizador antes o después de la siembra de semillas. El fitato también se puede aplicar como un polvo seco, comprimido o recubierto en una prensa con las micorrizas, *B. amyloliquefaciens* y *T. virens*. Se puede aplicar como una banda, en surcos, o repartir en un campo. La combinación también puede aplicarse o mezclarse en la tierra y usarse en invernaderos. La combinación puede aplicarse como un tratamiento de semillas donde los componentes se aplican como tratamiento a la semilla en seco o en una solución líquida.

[0086] En otra realización ilustrativa, la invención implica combinar fitato o ácido fítico (Componente D) con tres microorganismos en un rango de posibles valores de ufc/g. Tres microorganismos constituyen tres componentes de la invención: Componente A, Componente B y Componente C.

[0087] En esta realización, el Componente A es una composición que comprende un hongo de *Trichoderma virens*. Este componente preferiblemente tiene un rango de concentración de *Trichoderma virens* viable de entre aproximadamente 1,0E6 a aproximadamente 1,0E11 ufc por gramo del Componente A. En una realización preferida de la invención, el Componente A comprende preferiblemente entre aproximadamente el uno por ciento y aproximadamente el 99 por ciento del peso combinado del Componente A más el Componente B (denominado Combinación AB). Una tasa de aplicación preferida del Componente A es de aproximadamente 1,35 gramos (a una concentración de aproximadamente 5,0E8 ufc/gramo) por acre de tierra de cultivo, en donde el Componente A comprende aproximadamente el 50 por ciento del peso de la Combinación AB.

[0088] En esta realización, el Componente B es una composición que comprende una bacteria *Bacillus amyloliquefaciens*. Este componente preferiblemente tiene un rango de concentración de *Bacillus amyloliquefaciens* viable de entre aproximadamente 1,0E7 a aproximadamente 5,0E11 ufc por gramo del

Componente B. En una realización preferida de la invención, el Componente B comprende preferiblemente entre aproximadamente el uno por ciento y aproximadamente el 99 por ciento del peso combinado de la Combinación AB. Una tasa de aplicación preferida del Componente A es de aproximadamente 1,35 gramos (a una concentración de aproximadamente 1,0E10 ufc/gramo) por acre de tierras de cultivo, en donde el Componente B comprende aproximadamente el 50 por ciento del peso de la Combinación AB.

[0089] En esta realización, el Componente C es una composición que comprende *Glomus* spp. Este componente preferiblemente tiene un *Glomus* spp. viable. La concentración varía entre aproximadamente 5000 y aproximadamente 220 000 propágulos/gramo. El componente C comprende preferiblemente entre aproximadamente el uno por ciento y aproximadamente el 99 por ciento del peso combinado de la combinación AB. Por ejemplo, la parte biológica de una realización ilustrativa de la invención comprende aproximadamente el 98 por ciento en peso de la Combinación AB y aproximadamente el 2 por ciento en peso del Componente C. Una tasa de aplicación preferida del Componente C es de aproximadamente 0,136 gramos (a una concentración de aproximadamente 220 000 propágulos/gramo) o aproximadamente 30 000 propágulos por acre de tierras de cultivo.

[0090] Si bien existe un límite inferior preferido para la tasa de aplicación de propágulos de *Glomus* (p. ej., 5000 propágulos por acre de tierras de cultivo), no hay ningún límite superior (aparte de los económicos) para la aplicación de propágulos de *Glomus* por acre de tierras de cultivo. El siguiente cuadro describe una proporción mínima y máxima preferida de ufc de *Bacillus amyloliquefaciens* y ufc de *Trichoderma virens* para propágulos de *Glomus*

	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> mínima	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> máxima	<i>Trichoderma virens</i> mínima	<i>Trichoderma virens</i> máxima
Por cada propágulo de <i>Glomus</i>	3,3E2 ufc	1,7E7 ufc	3,3E1 ufc	3,3E6 ufc

[0091] El cuadro anterior muestra los límites inferior y superior de lo que el solicitante cree que es un rango de los números efectivos de esporas de *Bacillus* y esporas de *Trichoderma* por cada propágulo *Glomus*. Se cree que el extremo superior del rango es apropiado para entornos de campo (cultivo), pero las tasas más bajas pueden ser efectivas en entornos más controlados, por ejemplo, en configuraciones de invernadero.

[0092] En esta realización, el Componente D es una composición que comprende fitato. Una tasa de aplicación preferida para el Componente D es de aproximadamente un cuarto de una solución de fitato de aproximadamente el 40 por ciento por acre. La solución puede ser con agua o con agua más un fertilizante estándar (Nitrógeno (N), Fósforo (P), Potasio (K), por ejemplo, un fertilizante 10-34-0). La concentración de fitato puede variar de aproximadamente un 1 por ciento a aproximadamente un 90 por ciento del peso de la solución total. Alternativamente, el componente de fitato también se puede aplicar en forma de sal, es decir, como una molécula de fitato de calcio al 99 por ciento.

[0093] Haciendo referencia a la Fig. 3, se presenta un diagrama esquemático que ilustra la reacción de *Bacillus amyloliquefaciens*. Esta figura ilustra que el uso de una enzima fitasa para reducir el fitato y liberar fácilmente el fósforo disponible en la planta en la rizosfera da como resultado una señal que facilita la germinación y posterior colonización de las raíces de las plantas por hongos micorrizales.

[0094] Haciendo referencia a la Fig. 4, se presenta una fotografía que fue producida tiñendo una raíz de maíz con azul tripán. La raíz del maíz se tomó de un campo donde el tratamiento aplicado fue Fitato + Micorrizas + *T. virens*+*B. amyloliquefaciens* y 3 galones de 10-34-0 en el surco durante la siembra. Cuando la muestra de la raíz se tomó 18 días después de la aparición, la raíz ya mostraba una colonización micorrizal saludable tanto fuera como dentro de la raíz. El aumento de la raíz es 50 veces (50x).

[0095] Haciendo referencia a la Fig. 5, se presenta una fotografía de las raíces de plantas de maíz que tienen 28 días de antigüedad. Esta fotografía proporciona evidencia empírica de que la realización ilustrativa de la invención utilizada es eficaz para producir señales que hacen que los propágulos de micorrizas germinen y colonicen la raíz del maíz en un entorno de alto fósforo. El aumento de la proliferación de raíces es causado por micorrizas que aumentan el crecimiento de las raíces.

[0096] Haciendo referencia a la Fig. 6, se presenta una fotografía de una raíz con micorrizas teñidas de azul con azul tripán y fotografiadas bajo un microscopio con un aumento de 50x. Esta fotografía muestra la estructura de las hifas micorrizales que colonizan dentro de la raíz.

[0097] Haciendo referencia a la Fig. 7, se presenta un cuadro que muestra los datos que se recolectaron en Carmi, IL con tratamientos en maíz híbrido durante la temporada de cultivo de 2012. La ubicación se encontraba bajo una fuerte presión de sequía, como indica el bajo rendimiento. Se espera que el rendimiento del maíz en

condiciones de humedad promedio sea de más de 200 bushels por acre en esta zona. Estos datos muestran que la realización ilustrativa de la invención utilizada fue efectiva bajo condiciones de humedad muy baja. La ubicación tiene una aplicación estándar de fertilizante para un rendimiento de más de 200 bushels, que proporcionaría un entorno alto en fósforo. El uso de la realización ilustrativa de la invención produjo claramente una respuesta de rendimiento mejorada de 16+ bushels por acre que fue proporcionada por la colonización de la raíz de micorriza a pesar de las condiciones altas en fósforo. Estos datos muestran que la aplicación en el surco de Micorrizas + Fitato + *Trichoderma virens* + *Bacillus amyloliquefaciens* incrementó el rendimiento en este ambiente alto en fósforo y baja humedad. Los tratamientos fueron los siguientes:

Base = tratamiento estándar de las semillas con fungicidas e insecticidas de la industria

Base + Mico + Fitato + T.V. + B.A. = tratamiento de semillas base + una aplicación en el surco de 5 galones de una solución que contiene 4 cepas de propágulos de micorrizas a 30 000 propágulos por acre + 40 % de fitato a 1 cuarto por acre + *Trichoderma virens* a 4,20E9 unidades formadoras de colonias por acre, *Bacillus amyloliquefaciens* a 8,40E10 unidades formadoras de colonias por acre.

[0098] En referencia a la Fig. 8, se presentan más datos de Carmi, IL. Este gráfico muestra que la interacción de los componentes de la realización ilustrativa de la invención en una aplicación en el surco no se ve obstaculizada por los ingredientes activos de *T. virens* + *B. amyloliquefaciens* aplicados a la semilla. De hecho, la semilla aplicada combinada de *T. virens* + *B. amyloliquefaciens* y la aplicación en el surco de la invención da como resultado una ventaja de rendimiento de más de 23 bushels por acre. Los tratamientos fueron los siguientes:

Base = tratamiento estándar de las semillas con fungicidas e insecticidas de la industria

Base + T.V. + B.A.-SA = Base + *Trichoderma virens* + *Bacillus amyloliquefaciens* que es la semilla aplicada (SA).

Base + Mico + Fitato + T.V. + B.A. = tratamiento de semillas base + una aplicación en el surco de 5 galones de una solución que contiene 4 cepas de propágulos de micorrizas a 30 000 propágulos por acre + 40 % de fitato a 1 cuarto por acre + *Trichoderma virens* a 4,20E9 unidades formadoras de colonias por acre, *Bacillus amyloliquefaciens* a 8,40E10 unidades formadoras de colonias por acre.

Base + T.V + B.A.-SA + Mico + Fitato + T.V + B.A. = Base + T.V. + B.A. (SA) más una aplicación en el surco de 5 galones de una solución que contiene 4 cepas de propágulos de micorrizas a 30 000 propágulos por acre + 40 % de fitato a 1 cuarto por acre + *Trichoderma virens* a 4,20E9 unidades formadoras de colonias por acre, *Bacillus amyloliquefaciens* a 8,40E10 unidades formadoras de colonias por acre.

[0099] Haciendo referencia a la Fig. 9, se presenta un cuadro que muestra los datos recolectados en Ashkum, IL con tratamientos sobre maíz híbrido durante la temporada de crecimiento de 2012. La ubicación se encontraba bajo una fuerte presión de sequía, como lo indica el bajo rendimiento, sin embargo, la presión de sequía no fue tan grande como en la ubicación de Carmi IL. Se espera que el rendimiento del maíz en condiciones de humedad promedio sea de más de 200 bushels por acre en esta zona. Estos datos muestran que la realización ilustrativa de la invención utilizada es efectiva bajo condiciones de humedad muy baja. La ubicación tiene una aplicación estándar de fertilizante para un rendimiento de más de 200 bushels, que proporcionaría un entorno alto en fósforo. Los datos muestran claramente la respuesta de rendimiento mejorada de más de 32 bushels por acre proporcionados por la colonización de raíces de micorrizas como resultado del uso de una realización ilustrativa de la invención a pesar de las condiciones de alto fósforo. Los datos confirman que la aplicación en el surco de micorrizas + fitato + *Trichoderma virens* + *Bacillus amyloliquefaciens* aumentan el rendimiento en este ambiente alto en fósforo y de humedad baja a media. Los tratamientos fueron los siguientes:

Base = tratamiento estándar de las semillas con fungicidas e insecticidas de la industria

Base + Mico + Fitato + T.V. + B.A. = tratamiento de semillas base + una aplicación en el surco de 5 galones de una solución que contiene 4 cepas de propágulos de micorrizas a 30 000 propágulos por acre + 40 % de fitato a 1 cuarto + *Trichoderma virens* a 4,20E9 unidades formadoras de colonias por acre, *Bacillus amyloliquefaciens* a 8,40E10 unidades formadoras de colonias por acre.

[0100] Haciendo referencia a la Fig. 10, se presentan los datos obtenidos en Ashkum, IL. El cuadro muestra que la interacción de los componentes de una realización ilustrativa de la invención en una aplicación en el surco no se ve obstaculizada por los ingredientes activos de *T. virens* + *B. amyloliquefaciens* aplicados a la semilla. De hecho, la semilla aplicada combinada de *T. virens* + *B. amyloliquefaciens* y la aplicación en el surco de la invención da como resultado una ventaja de rendimiento de más de 38 bushels por acre. Los tratamientos fueron los siguientes:

Base = tratamiento estándar de las semillas con fungicidas e insecticidas de la industria

Base + T.V. + B.A.-SA = Base + *Trichoderma virens* + *Bacillus amyloliquefaciens* que es la semilla aplicada (SA).

Base + Mico + Fitato + T.V. + B.A. = tratamiento de semillas base + una aplicación en el surco de 5 galones de una solución que contiene 4 cepas de propágulos de micorrizas a 30 000 propágulos por acre + 40 % de fitato a 1 cuarto por acre + *Trichoderma virens* a 4,20E9 unidades formadoras de colonias por acre, *Bacillus amyloliquefaciens* a 8,40E10 unidades formadoras de colonias por acre.

Base + T.V + B.A.-SA + Mico + Fitato + T.V + B.A. = Base + T.V. + B.A. (SA) más una aplicación en el surco

de 5 galones de una solución que contiene 4 cepas de propágulos de micorrizas a 30 000 propágulos por acre + 40 % de fitato a 1 cuarto por acre + *Trichoderma virens* a 4,20E9 unidades formadoras de colonias por acre, *Bacillus amyloliquefaciens* a 8,40E10 unidades formadoras de colonias por acre.

[0101] Haciendo referencia a la Fig. 11, se presenta un cuadro que muestra los datos recolectados en Olivia, MN con tratamientos sobre maíz híbrido durante la temporada de crecimiento de 2012. Esta ubicación tenía precipitaciones normales a diferencia de las ubicaciones en Carmi y Ashkum, IL. Se espera que el rendimiento del maíz bajo condiciones de humedad promedio sea de más de 200 bushels por acre en esta zona. Estos datos muestran que la realización ilustrativa de la invención utilizada es efectiva bajo condiciones de humedad adecuadas o normales. La ubicación tiene una aplicación estándar de fertilizante para un rendimiento de más de 200 bushels, que proporcionaría un entorno alto en fósforo. El uso de la realización ilustrativa de la invención produjo claramente una respuesta de rendimiento mejorada de 33+ bushels por acre proporcionados por la colonización de la raíz de micorriza a pesar de las condiciones altas en fósforo. Los datos muestran que la aplicación en el surco de Micorrizas + Fitato + *Trichoderma virens* + *Bacillus amyloliquefaciens* incrementó el rendimiento en este ambiente alto en fósforo y humedad adecuada. Los tratamientos fueron los siguientes:

Base = tratamiento estándar de las semillas con fungicidas e insecticidas de la industria

Base + Mico + Fitato + T.V. + B.A. = tratamiento de semillas base + una aplicación en el surco de 5 galones de una solución que contiene 4 cepas de propágulos de micorrizas a 30 000 propágulos por acre + 40 % de fitato a 1 cuarto por acre + *Trichoderma virens* a 4,20E9 unidades formadoras de colonias por acre, *Bacillus amyloliquefaciens* a 8,40E10 unidades formadoras de colonias por acre.

[0102] Haciendo referencia a la Fig. 12, se presenta un gráfico que muestra los datos de Olivia, MN. El cuadro muestra que la interacción de los componentes de la realización ilustrativa de la invención utilizada en una aplicación en el surco no se ve obstaculizada por los ingredientes activos de *T. virens* + *B. amyloliquefaciens* aplicados a la semilla. De hecho, la semilla aplicada combinada de *T. virens* + *B. amyloliquefaciens* y la aplicación en el surco de la invención da como resultado una ventaja de rendimiento de más de 44 bushels por acre. Los tratamientos fueron los siguientes:

Base = tratamiento estándar de las semillas con fungicidas e insecticidas de la industria

Base + T.V. + B.A.-SA = Base + *Trichoderma virens* + *Bacillus amyloliquefaciens* que es la semilla aplicada (SA).

Base + Mico + Fitato + T.V. + B.A. = tratamiento de semillas base + una aplicación en el surco de 5 galones de una solución que contiene 4 cepas de propágulos de micorrizas a 30 000 propágulos por acre + 40 % de fitato a 1 cuarto por acre + *Trichoderma virens* a 4,20E9 unidades formadoras de colonias por acre, *Bacillus amyloliquefaciens* a 8,40E10 unidades formadoras de colonias por acre.

Base + T.V + B.A.-SA + Mico + Fitato + T.V + B.A. = Base + T.V. + B.A. (SA) más una aplicación en el surco de 5 galones de una solución que contiene 4 cepas de propágulos de micorrizas a 30 000 propágulos por acre + 40 % de fitato a 1 cuarto + *Trichoderma virens* a 4,20E9 unidades formadoras de colonias por acre, *Bacillus amyloliquefaciens* a 8,40E10 unidades formadoras de colonias por acre.

[0103] Haciendo referencia a la Fig. 13 se presenta un gráfico que muestra los datos de rendimiento de las semillas de soja que se cultivaron en un ensayo de campo en la Irrigation Research Foundation, Yuma, CO en la temporada de cultivo de 2012. En este lugar de ensayo, se irrigaron las semillas de soja y se aplicó un fertilizante con el análisis de 15-20-0-2s-.027ZN en surcos a razón de 4,5 galones por acre. Los datos confirman nuevamente que una realización ilustrativa de la invención rinde de manera similar en una legumbre dicotiledónea, en este caso soja, a como lo hace en una monocotiledónea, maíz en presencia elevada de fósforo. Los datos también confirman que el uso de una semilla aplicada (SA) *T. virens* + *B. amyloliquefaciens* continuó para permitir la realización de la invención usada para producir un rendimiento incrementado. El aumento general de los tratamientos combinados fue de 6,7 bushels de soja por acre. Los tratamientos fueron los siguientes:

Base = tratamiento estándar de las semillas con fungicidas e insecticidas de la industria

Base + T.V. + B.A.-SA = Base + *Trichoderma virens* + *Bacillus amyloliquefaciens* que es la semilla aplicada (SA).

Base + T.V + B.A.-SA + Mico + Fitato + T.V + B.A. = Base + T.V. + B.A. (SA) más una aplicación en el surco de 5 galones de una solución que contiene 4 cepas de propágulos de micorrizas a 30 000 propágulos por acre + 40 % de fitato a 1 cuarto por acre + *Trichoderma virens* a 4,20E9 unidades formadoras de colonias por acre, *Bacillus amyloliquefaciens* a 8,40E10 unidades formadoras de colonias por acre.

REIVINDICACIONES

1. Composición que comprende lo siguiente:

5 de $6,75E8 \pm 6,75E6$ a $4,20E9 \pm 4,20E7$ unidades formadoras de colonias de una *Trichoderma virens*, de $1,35E10 \pm 1,35E8$ a $8,40E10 \pm 8,40E8$ unidades formadoras de colonias de un *Bacillus amyloliquefaciens*, 30 000 propágulos de una micorriza en $18,93 \pm 0,1893$ litros de agua ; y una solución acuosa del 15 al 40 por ciento de un fitato o ácido fítico en $3,78 \pm 0,0378$ litros de agua.

10 2. Composición según la reivindicación 1, en la que la *Trichoderma virens* se selecciona del grupo que consiste en *Trichoderma virens* G1-3 y el aislado de *Trichoderma virens* G1-21.

15 3. Composición según la reivindicación 1-2, en la que el *Bacillus amyloliquefaciens* se selecciona del grupo que consiste en *Bacillus amyloliquefaciens* TJ-1000, *Bacillus amyloliquefaciens* 1BE y *Bacillus amyloliquefaciens* FZB24.

4. Composición según la reivindicación 1-3, en la que las micorrizas se seleccionan del grupo que consiste en *Glomus aggregatum*, *Glomus etunicatum*, *Glomus intraradices* y *Glomus mossae*.

20 5. Método para aumentar el rendimiento de un cultivo, que comprende:

aplicar una composición que comprende

25 un *Trichoderma virens* aplicado a una tasa de $6,75E8 \pm 6,75E6$ a $4,20E9 \pm 4,20E7$ unidades formadoras de colonias,
un *Bacillus amyloliquefaciens* aplicado a una tasa de $1,35E10 \pm 1,35E8$ a $8,40E10 \pm 8,40E8$ unidades formadoras de colonias,
una micorriza aplicada a una tasa de 30 000 propágulos en $18,93 \pm 0,1893$ litros de agua; y
30 una solución acuosa del 15 al 40 por ciento de un fitato o ácido fítico aplicado a una tasa de $3,78 \pm 0,0378$ litros de agua.

por 4046,856 metros cuadrados de tierras de cultivo.

35 6. Método según la reivindicación 5, en el que la composición se coloca en la proximidad de una raíz de planta mediante la aplicación a una semilla preplantada, mediante aplicación en el surco a medida que se siembra una semilla o a voleo sobre una fila de semillas.

40 7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 5-6, en el que la colocación de la composición permite que los hongos y la bacteria colonicen la raíz de la planta.

8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 5-7, en el que el *Trichoderma virens* se selecciona del grupo que consiste en *Trichoderma virens* G1-3 y el aislado de *Trichoderma virens* G1-21.

45 9. Método según cualquiera de las reivindicaciones 5-8, en el que el *Bacillus amyloliquefaciens* se selecciona del grupo que consiste en *Bacillus amyloliquefaciens* TJ-1000, *Bacillus amyloliquefaciens* 1BE y *Bacillus amyloliquefaciens* FZB24.

10. Método según cualquiera de las reivindicaciones 5-9, en el que las micorrizas se seleccionan del grupo que consiste en *Glomus aggregatum*, *Glomus etunicatum*, *Glomus intraradices* y *Glomus mossae*.

50 11. Método según cualquiera de las reivindicaciones 5-10, que comprende además: mezclar la composición en un tanque aplicador de fertilizantes; y aplicarlo a la tierra de cultivo en un surco o una banda muy cerca de un surco de semillas o una raíz de planta.

55 12. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-4 y método según cualquiera de las reivindicaciones 5-11 que comprende además un fertilizante NPK.

2011 Watertown, SD ensayos de selección de maíz

N.º	Nombre	No iniciador		Rango	10-34-0		Rango
1	CHK	121,05	g	7	135,37	cde	4
2	Mico ES	132,72	f	4	133,39	ef	5
3	Mico+T.V.+B.A. ES	129,22	ef	6	127,77	g	7
4	Fitato ES	130,96	ef	5	136,24	cde	3
5	Fitato+Mico ES	137,39	cd	3	132,11	ef	6
6	Fitato+T.V.+B.A. ES	144,57	ab	2	137,73	bcd	2
7	Fitato+Mico+T.V.+B.A. ES	147,44	a	1	146,39	a	1
LSD (P=10)		4,274			3,475		
Desviación estándar		4,822			3,921		
CV		3,59			2,92		

FIG 1

Trt	Tratamiento	Altura de la planta (cm)		Masa de brote (g)		Masa de la raíz (g)		Longitud (cm)		Área superficial (cm ²)		Volumen de raíz (cm ³)		Puntas	
1	CHK	62,43	c	6,03	c	1,44	b	2935,07	a	340,74	a	3,16	a	6336,71	b
2	Fitato ES	58,29	c	6,17	c	1,56	b	3124,72	a	359,25	a	3,31	a	6119,67	b
3	Fitato+T.V.+ B.A. ES	69,29	b	8,56	b	1,74	b	3245,09	a	398,12	a	3,95	a	7443,14	b
4	Fitato+Mico ES	70,43	ab	8,37	b	2,01	b	3108,2	a	411,87	a	4,47	a	7861,57	ab
5	Fitato+Mico +T.V.+B.A. ES	76,02	a	11,52	a	3,09	a	3333,75	a	450,8	a	4,89	a	9249,42	a
LSD (P=,05)		5,886		1,598		0,917		453,694		84,09		1,306		1711,908	
Desviación estándar		5,322		1,445		0,829		410,239		76,035		1,181		1547,939	
CV		7,91		17,77		42,09		13,03		19,39		29,86		20,91	
Media total		67,29		8,13		1,97		3149,37		392,16		3,96		7402,08	
Bartlett X2		6,503		5,073		6,26		1,991		4,893		7,69		5,371	
P (Bartlett X2)		0,165		0,28		0,181		0,737		0,298		0,104		0,251	
Friedman X2		18,286		18,743		11,4		5,6		9,714		8,8		10,171	
P (Friedman X2)		0,001		0,001		0,022		0,231		0,046		0,066		0,038	

FIG 2

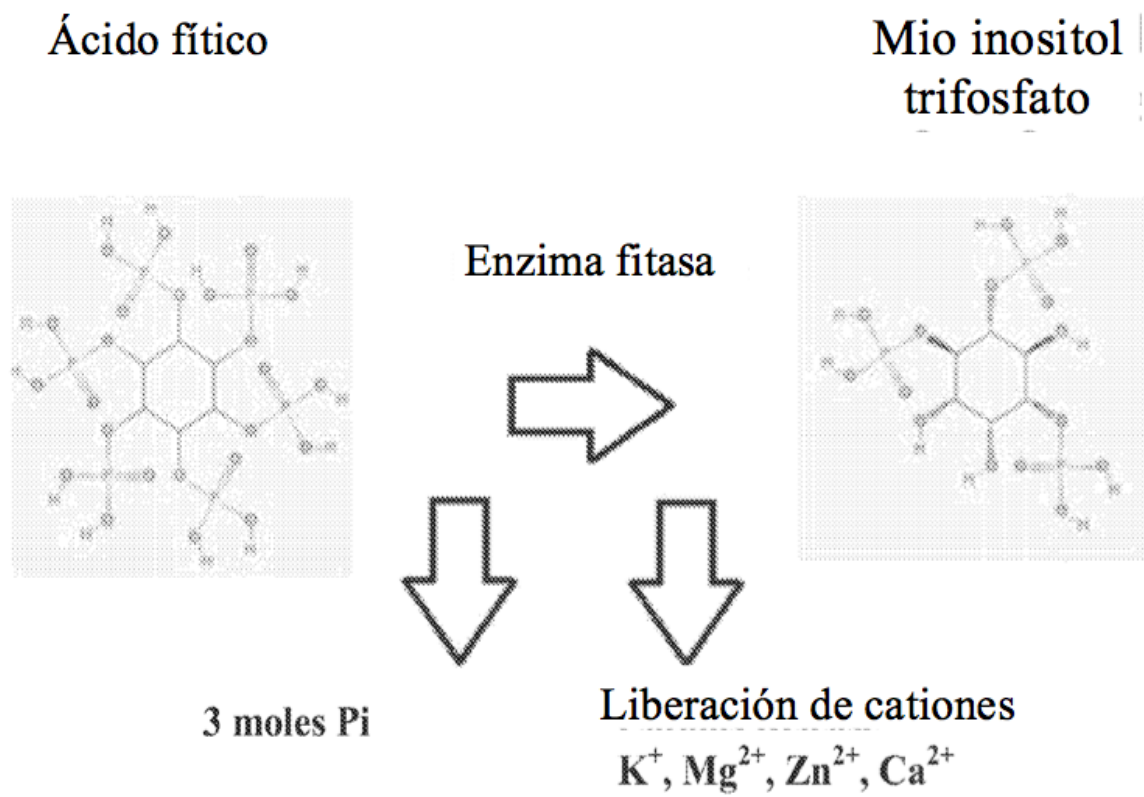


FIG. 3

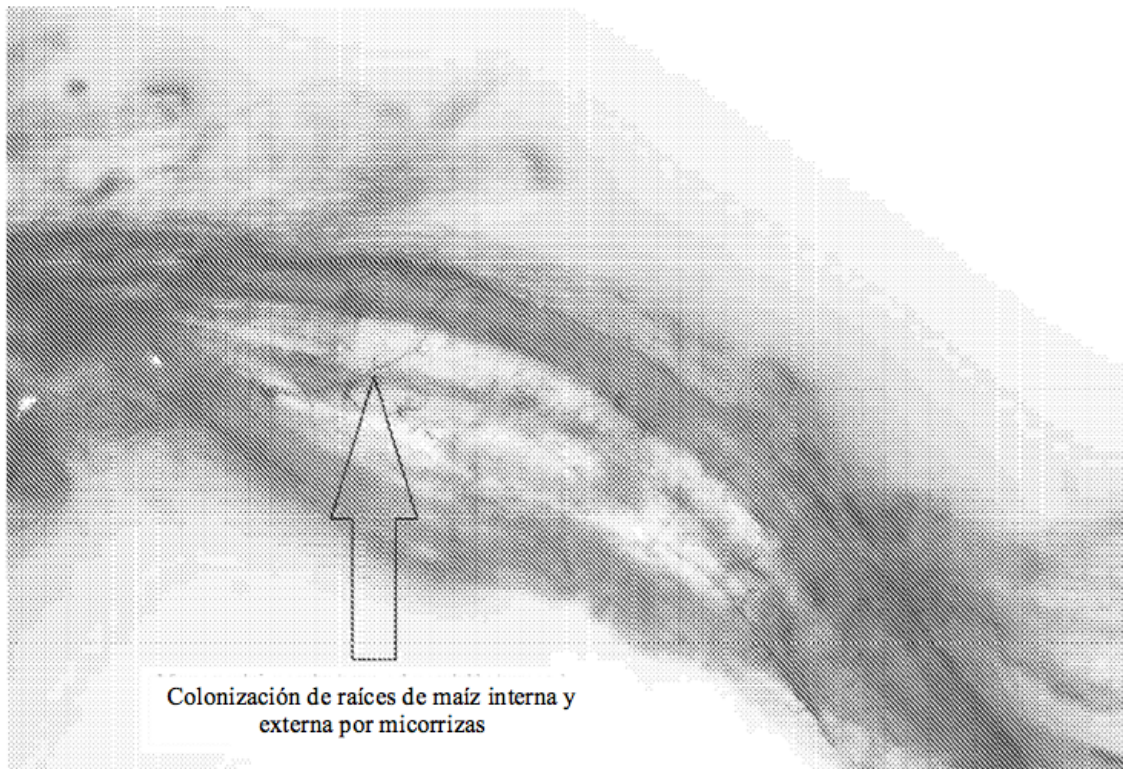


FIG. 4

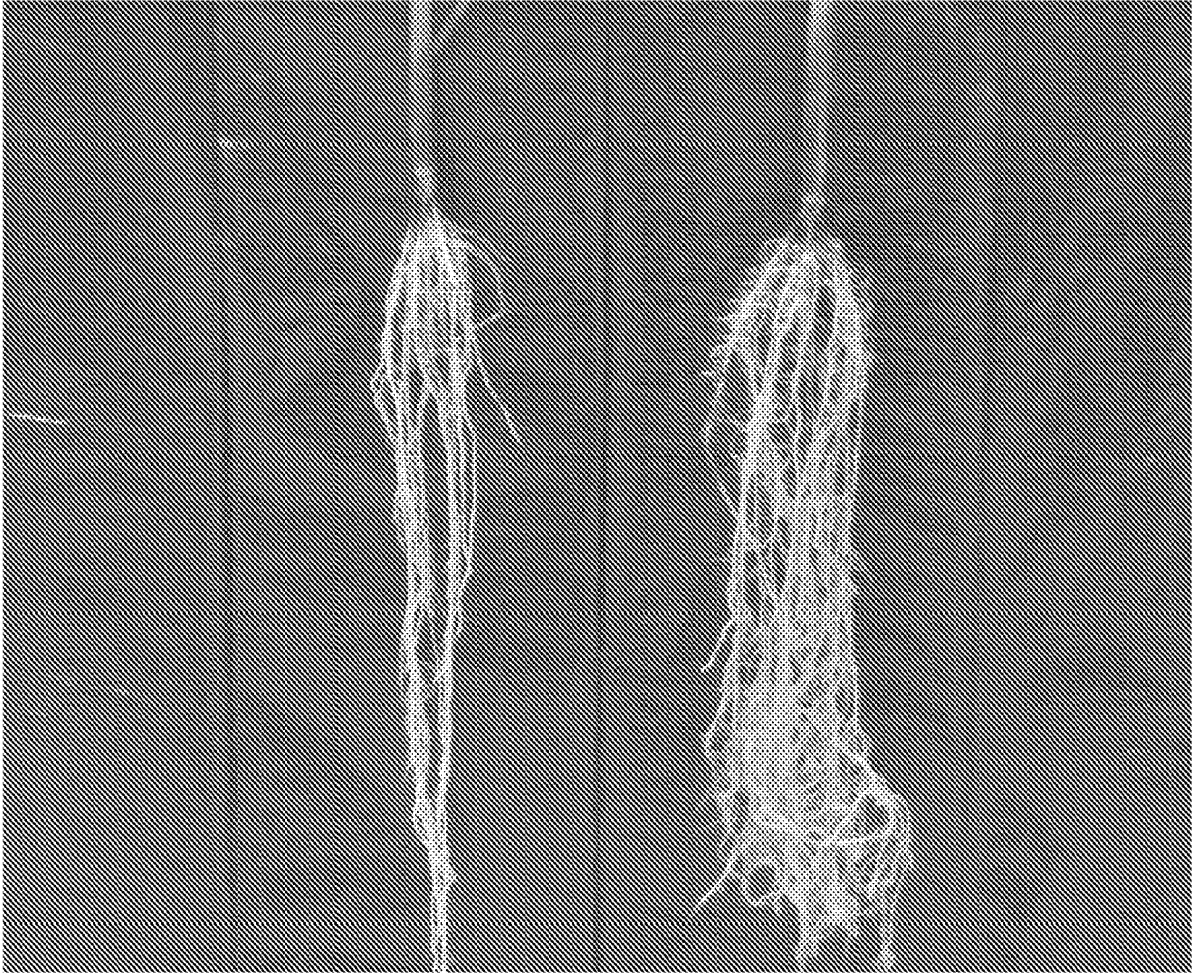


FIG. 5

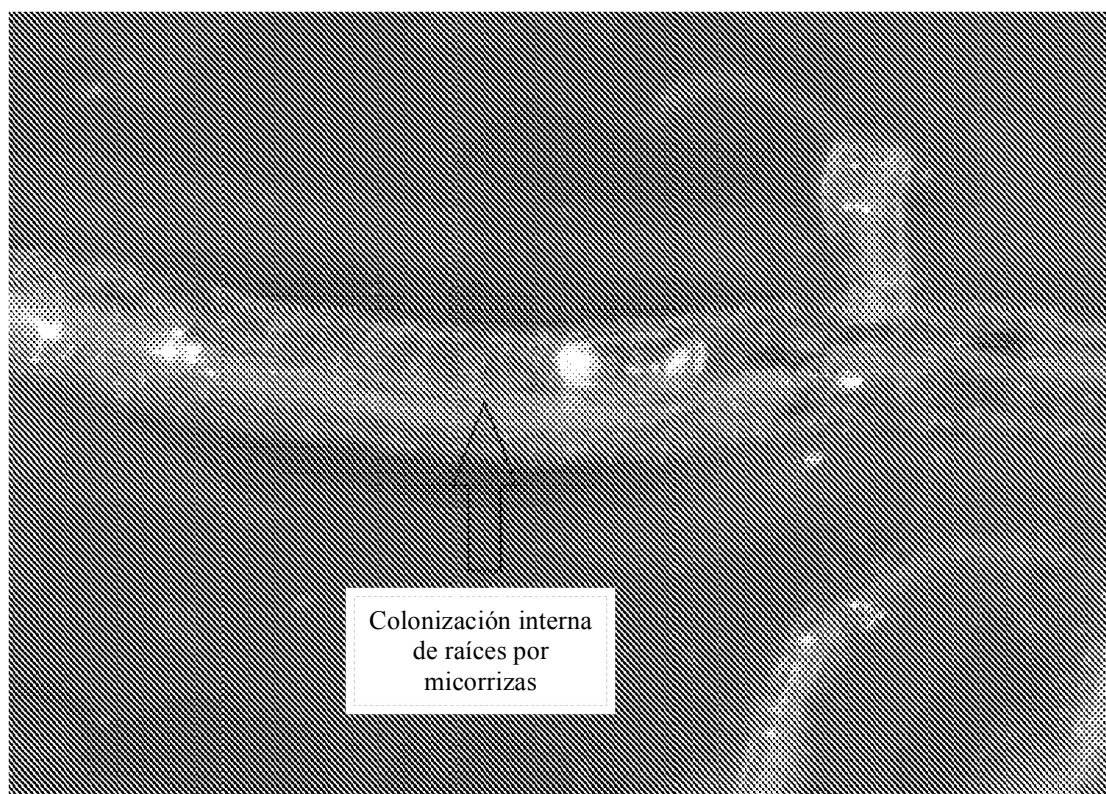


FIG. 6

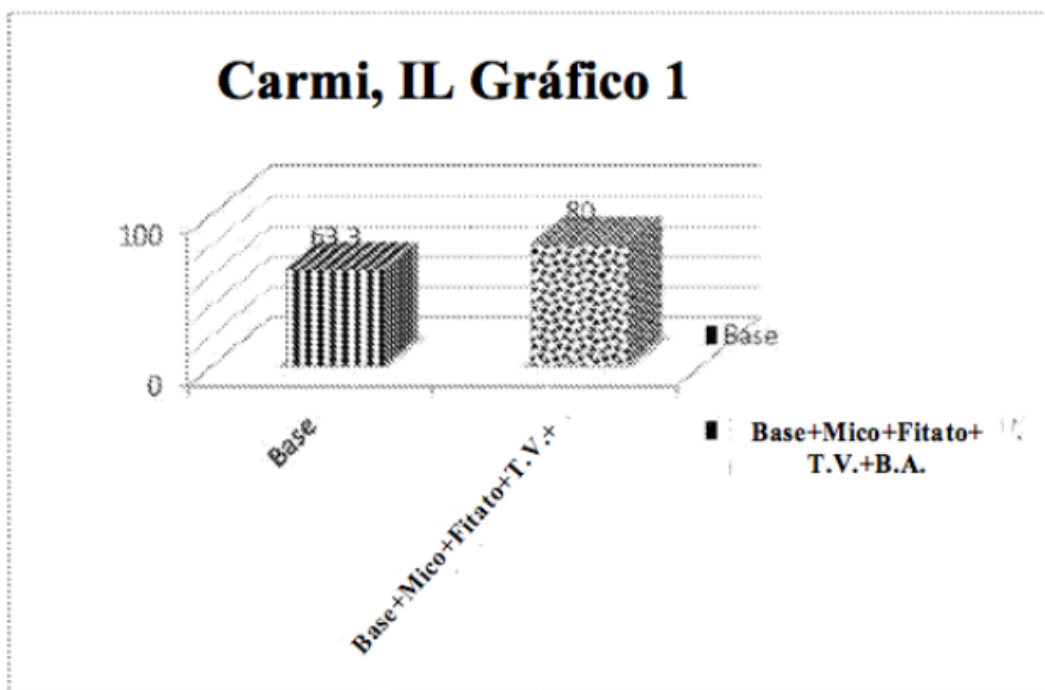


Fig. 7

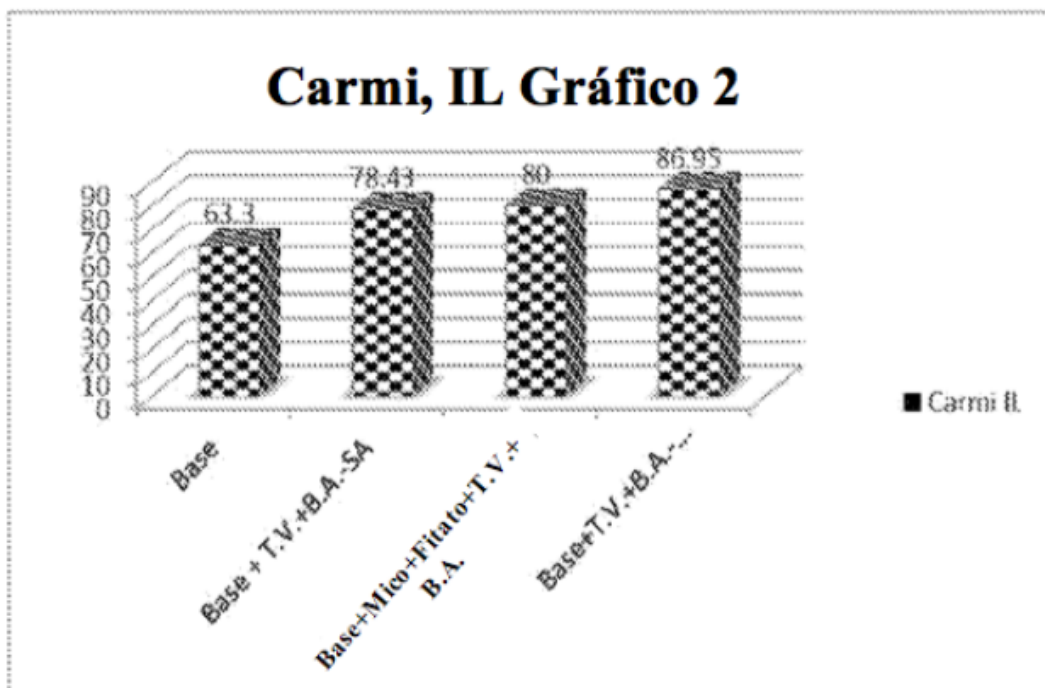


FIG. 8

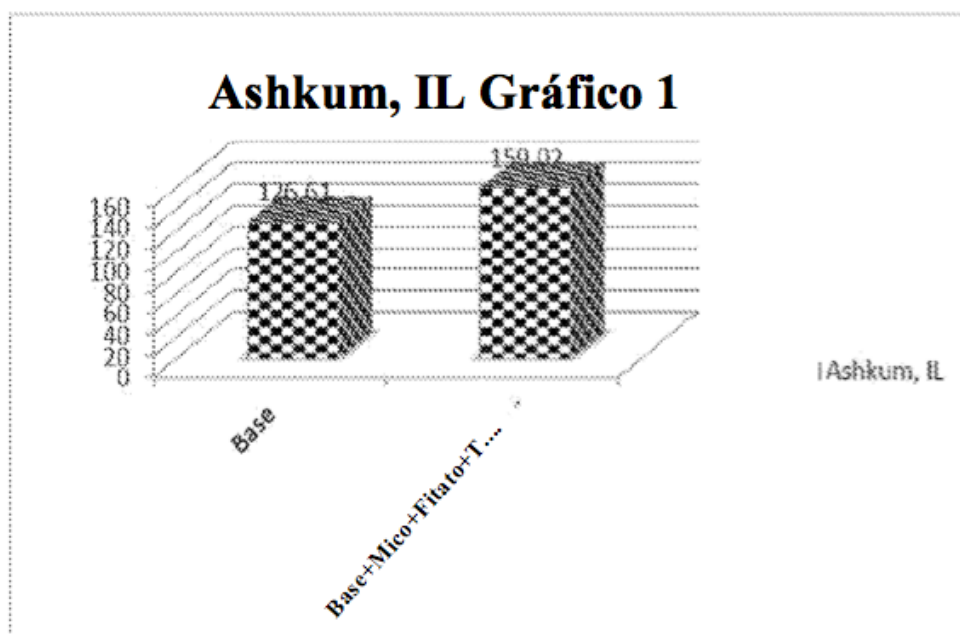


FIG. 9

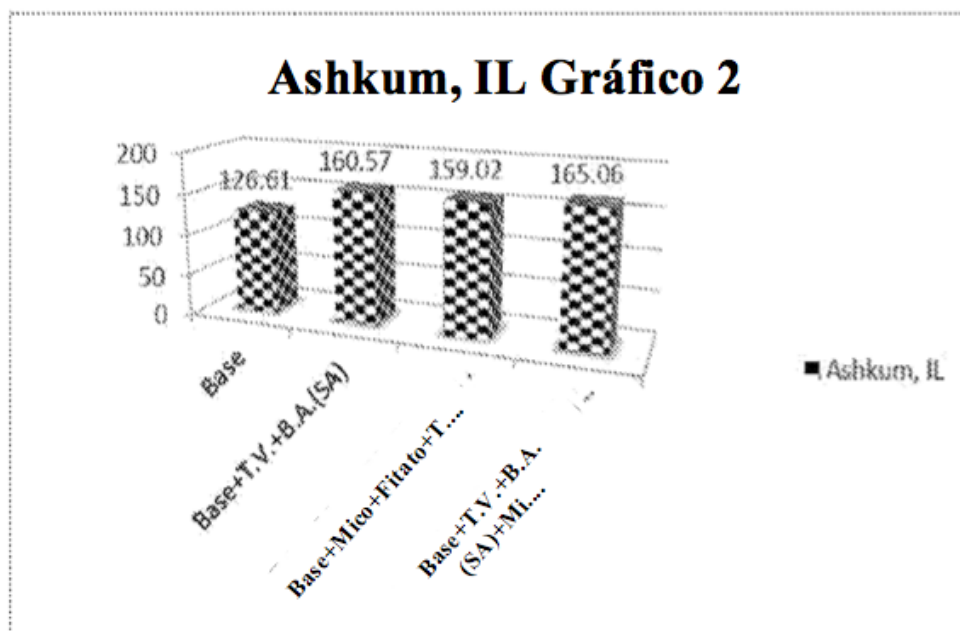


FIG. 10

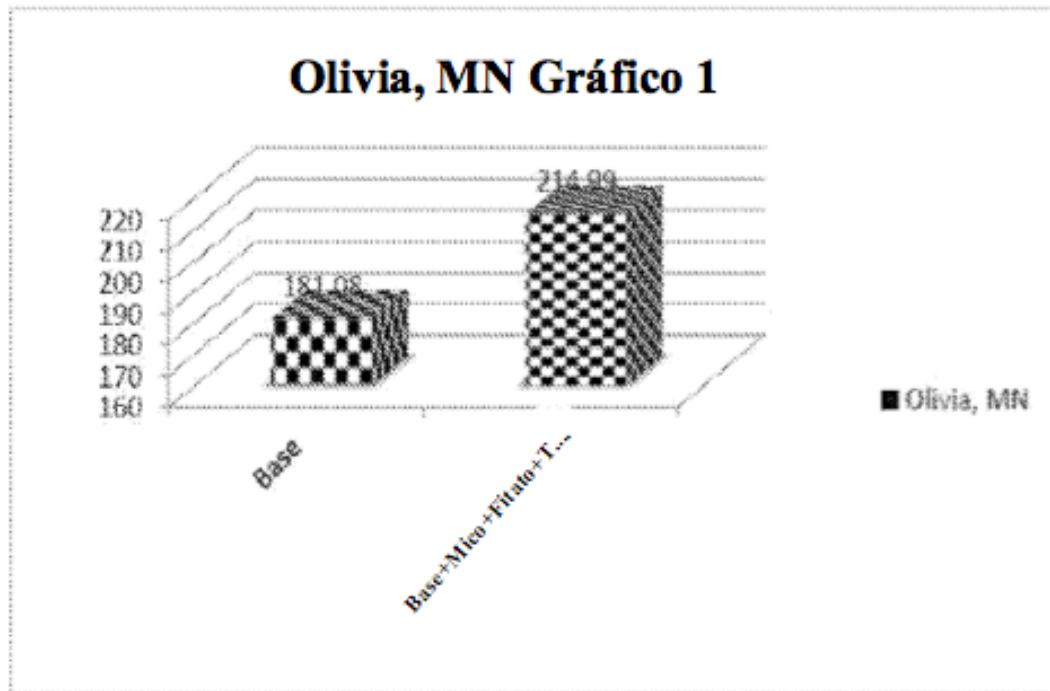


FIG. 11

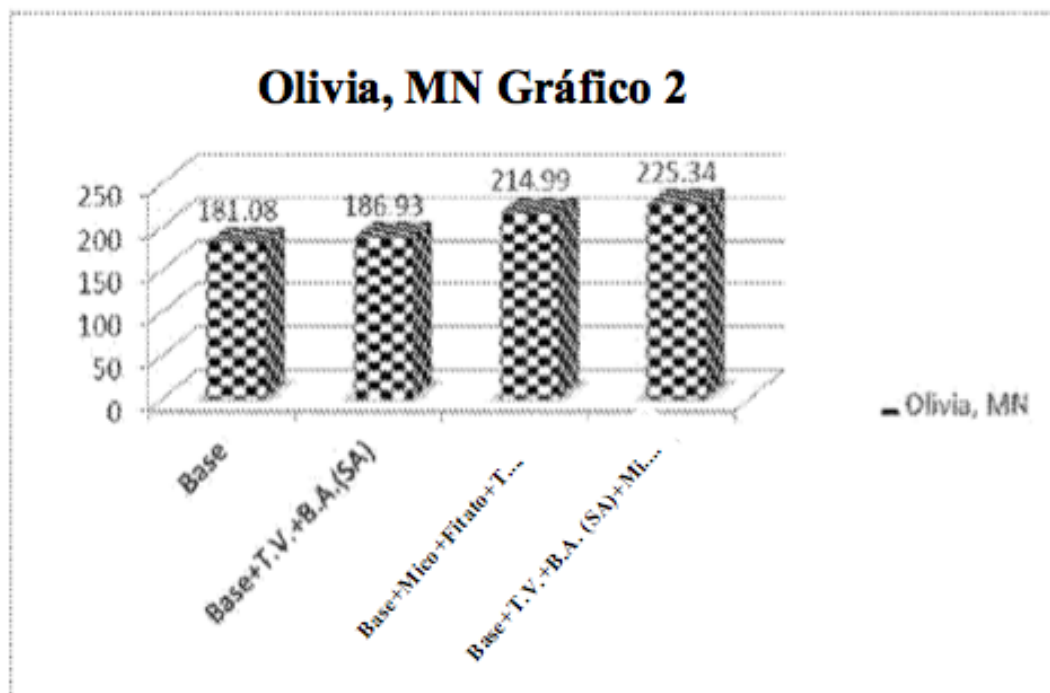


FIG. 12

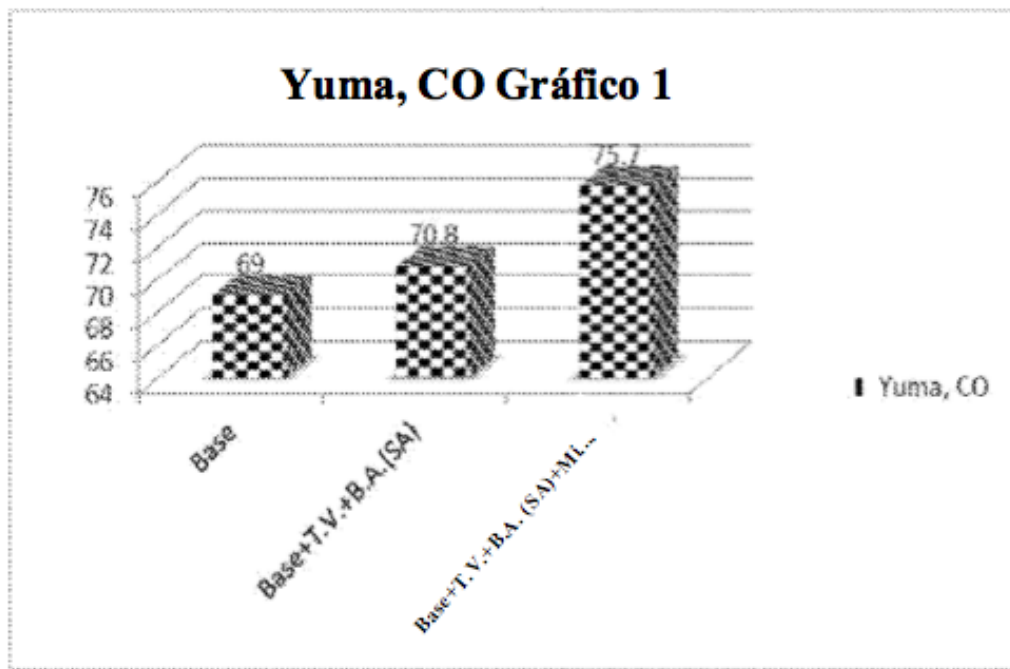


FIG. 13